

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

# Untersuchungen zum Radikal-katalytischen Mechanismus und zur DNA-Schadens-Erkennung der Sporen-Photoprodukt-Lyase

Andrea Christa Kneuttinger

aus

Straubing, Deutschland

2014



### Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 7 der Promotionsordnung der LMU München vom 28. November 2011 von Herrn Prof. Dr. Thomas Carell von der Fakultät für Chemie und Pharmazie vertreten.

### Eidesstattliche Versicherung

Diese Dissertation wurde eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, den 14.05.2014

Andrea Christa Kneuttinger

Dissertation eingereicht am: 16.05.2014

1. Gutachter: Prof. Dr. T. Carell

2. Gutachter: Prof. Dr. H. Zipse

Mündliche Prüfung am: 23.07.2014

„Gute Informationen sind schwer zu bekommen.

Noch schwerer ist es, mit ihnen etwas anzufangen.“

Sir Arthur Conan Doyle (u.a. in *Die Abenteuer des Sherlock Holmes*)



Teile dieser Arbeit wurden bereits publiziert oder auf Konferenzen vorgestellt

## Publikationen

K. Heil, A.C. Kneuttinger, S. Schneider, U. Lischke, T. Carell, *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 9651–9657.

*Crystal structures and repair studies reveal the identity and the base-pairing properties of the UV-induced spore photoproduct DNA lesion.*

A. C. Kneuttinger, K. Heil, G. Kashiwazaki, T. Carell, *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 722–724.

*The radical SAM enzyme spore photoproduct lyase employs a tyrosyl radical for DNA repair.*

A. C. Kneuttinger, G. Kashiwazaki, S. Prill, K. Heil, M. Müller, T. Carell, *Photochem. Photobiol.* **2014**, *90*, 1–14.

*Formation and direct repair of UV-induced dimeric DNA pyrimidine lesions.*

## Weitere Publikationen

D. Globisch, D. Pearson, A. Hienzsch, T. Brückl, M. Wagner, I. Thoma, P. Thumbs, V. Reiter, A. C. Kneuttinger, M. Müller, S. A. Sieber, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 9739–9742

*Systems-based analysis of modified tRNA bases.*

V. Reiter, D. M. Matschkal, M. Wagner, D. Globisch, A. C. Kneuttinger, M. Müller, T. Carell, *Nucleic Acids Res.* **2012**, *40*, 6235–6240

*The CDK5 repressor CDK5RAP1 is a methylthiotransferase acting on nuclear and mitochondrial RNA.*

C. Brandmayr, M. Wagner, T. Brückl, D. Globisch, D. Pearson, A. C. Kneuttinger, V. Reiter, A. Hienzsch, S. Koch, I. Thoma, P. Thumbs, S. Michalakis, M. Müller, M. Biel, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *51*, 11162–11165

*Isotope-based analysis of modified tRNA nucleosides correlates modification density with translational efficiency.*

## **Konferenz-Beiträge**

Posterpräsentation: „*New insights in direct repair and duplex distortion properties of the spore photoproduct.*“

SFB749-Symposium **2011**, München

Posterpräsentation: „*Spore photoproduct lyase and its substrate in double stranded oligonucleotides.*“

GBM-Konferenz *Molecular Life Sciences* **2011**, Frankfurt am Main

Vortrag: „*New insights into the repair of the spore photoproduct UV-lesion.*“

SFB749-Symposium **2012**, Wildbad Kreuth

Vortrag: „*Mechanism and structure of the spore photoproduct lyase.*“

SFB749-Symposium **2013**, Wildbad Kreuth

Posterpräsentation: „*New mechanistic proposal for the radical SAM enzyme spore photoproduct lyase.*“

Gordon-Research-Konferenz *Enzymes, Coenzymes & Metabolic Pathways* **2013**, Waterville Valley, NH, USA

## **Danksagungen**







# Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung .....	V
Summary.....	XI
1. Einleitung.....	1
1.1. DNA.....	1
1.2. DNA-Photoschäden in vegetativen Zellen .....	4
1.3. DNA-Photoschäden in bakteriellen Sporen.....	6
Sporenbildung.....	6
Morphologie der DNA in Endosporen .....	6
Verbreitung UV-induzierter Schäden .....	9
Das Sporen-Photoprodukt .....	10
Struktur des Sporen-Photoprodukts.....	11
DNA-Destabilisierung durch das Sporen-Photoprodukt .....	13
1.4. Photolyase-vermittelte DNA-Reparatur in vegetativen Zellen.....	14
CPD-Photolyasen .....	15
(6–4)-Photolyasen.....	18
Homologe der Photolyasen.....	20
1.5. Exkurs: Die Familie der Radikal-SAM-Enzyme .....	20
1.6. SP-Lyase-vermittelte DNA-Reparatur in bakteriellen Sporen .....	26
2. Aufgabenstellung .....	33
3. Ergebnisse und Diskussion .....	35
3.1. Charakterisierung der SP-Lyase und ihrer Mutanten .....	35
Sequenzvergleich und Vorkommen der SPL-Familie .....	35
Expression und Proteinaufreinigung der SP-Lyase .....	37
Charakterisierung des 4Fe4S-Clusters.....	39
Vergleich der Sekundär- und Tertiärstruktur im Circular-Dichroismus .....	42
Einflüsse auf Stabilität und Aktivität.....	44

Fazit.....	46
3.2. Enzym-Aktivität und Substrat-Analyse .....	47
Vergleich der Reparatur-Effizienz der SP-Lyase mit unterschiedlichen SP-Substraten..	47
Katalytische Effizienz $k_{cat}/K_m$ der <i>B.st.</i> –SPL und <i>G.tn.</i> –SPL .....	53
Produktinhibition .....	55
Fazit.....	57
3.3. Mechanistische Studien.....	58
Katalytische Effizienz der Aktivitätsmutanten C140A/G und Y98F .....	59
Die Mutante C140G .....	63
UV-Vis-spektroskopischer Ansatz zum Nachweis von Aminosäure-Radikalen .....	64
Suche nach organischen Radikalen mit der EPR-Spektroskopie.....	66
Korrektur zur UV-Vis-Spektroskopie .....	75
Fazit.....	77
3.4. Wird SAM im Mechanismus der SP-Lyase regeneriert? .....	78
Ausblick .....	87
3.5. Der Schadens-Erkennungs-Prozess der SP-Lyase .....	88
Kristallisationsstudien.....	88
Initiale Bindungsstudien .....	89
Der Schadens-Such-Prozess der SP-Lyase .....	93
Potentielles Bindungsmodell der SP-Lyase mit dsDNA.....	95
Aminosäuren beteiligt an der DNA-Bindung und dem Flipp-Mechanismus .....	98
Weiterführende Spekulationen zur Bindung an AB-DNA .....	103
Fazit.....	105
Ausblick .....	106
4. Experimentalteil .....	109
4.1. Material .....	109
Wichtige (Mess-)Geräte .....	109
Primer.....	110

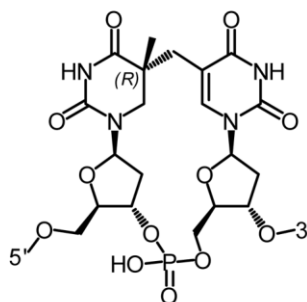


Mikrobiologische Utensilien .....	113
Sonstige molekularbiologische, proteinchemische und enzymologische Utensilien .....	114
Medien, Lösungen und Puffer .....	115
SPL-Substrate / Oligo-2'-Desoxynukleotide (ODNs) .....	117
4.2. Molekularbiologische Methoden .....	119
Klonierung der SPL-Expressionsvektoren .....	119
Ortsspezifische Mutagenese .....	122
Agarose-Gel-Elektrophorese .....	123
Konzentrationsbestimmung von DNA .....	124
Überprüfung von Plasmiden .....	124
4.3. Mikrobiologische Methoden .....	125
Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen .....	125
Cryokonservierung transformierter <i>E. coli</i> -Zellen .....	125
Isolierung von Plasmid-DNA aus transformierten <i>E. coli</i> -Zellen .....	125
4.4. Proteinchemische Methoden .....	126
Proteinexpression in <i>E. coli</i> -Zellen .....	126
Chemischer Zellaufschluss .....	127
His <sub>6</sub> -Affinitäts-Chromatographie .....	127
Heparin-Affinitäts-Chromatographie .....	128
Konzentrierung und Anpassung des Puffer-Systems .....	129
Rekonstitution des 4Fe4S-Clusters in der SP-Lyase .....	129
SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (PAGE) .....	130
Konzentrationsbestimmung von Proteinen .....	131
4.5. Arbeitsablauf unter anaeroben Bedingungen .....	132
4.6. Enzym-Analysen .....	132
Theoretischer Aminosäure-Sequenz-Vergleich .....	132
Tryptischer Verdau von Proteinen und Sequenz-Analyse via LC-ESI-MS/MS .....	133
Bestimmung des Eisen- und Sulfid-Gehalts in der SP-Lyase .....	133

UV-Vis-Spektroskopie.....	135
Circular-Dichroismus-(CD)-Spektroskopie .....	136
Aktivitäts-Messungen der SP-Lyase .....	137
Umkehrphasen-Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie (RP-HPLC) .....	140
Elektronen-Paramagnetische-Resonanz-(EPR)-Spektroskopie .....	141
Kristallisationsansätze.....	142
Fluoreszenz-Polarisation (FP).....	142
Kurze Anmerkung zur Fehlerrechnung.....	144
Appendix .....	147
Abkürzungsverzeichnis.....	153
Literaturverzeichnis .....	159

## Zusammenfassung

Sporenbildende Bakterien, insbesondere ihre toxischen Mitglieder, rücken immer wieder in den Fokus der Nachrichten. Sie verursachen Krankheiten wie Tetanus (*Clostridium tetani*), Botulismus (*Clostridium botulinum*) und Anthrax (*Bacillus anthracis*) und ihre Sporen wurden als Biowaffen im Bioterrorismus eingesetzt (*Bacillus anthracis*).<sup>[1-2]</sup> Die Sporen dieser Bakterien sind langlebig und haben Mechanismen entwickelt, um ihre DNA zu schützen und dadurch später unter besseren Bedingungen lebensfähig keimen zu können.<sup>[3]</sup> Nach UV-Bestrahlung solcher Sporen können kaum UV-Schäden in der DNA gefunden werden, die in vegetativen Zellen vorwiegend auftreten (CPD-, (6–4)- und Dewar-Schäden).<sup>[4]</sup> Stattdessen wird überwiegend ein Photodimer aus nebeneinander liegenden Thymidinen gebildet, das fast ausschließlich in bakteriellen Sporen vorkommt.<sup>[4]</sup> Dies ist das 5-( $\alpha$ -ThyminyI)-5,6-dihydrothymine, welches auch als Sporen-Photoprodukt (SP) bezeichnet wird (Abbildung 1).<sup>[5]</sup>

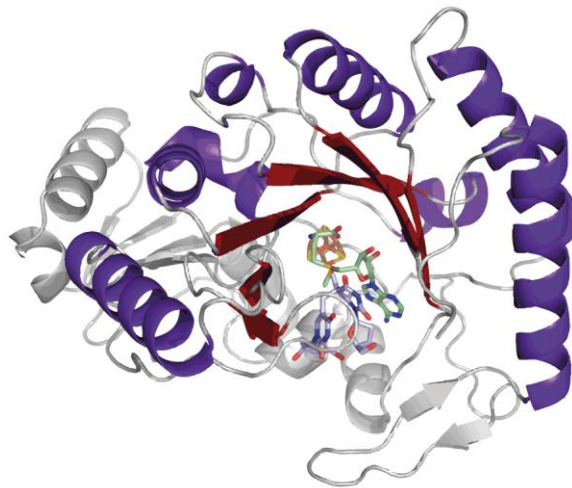


**Abbildung 1:** Struktur des UV-induzierten Sporen-Photoprodukt-Schadens in bakteriellen Sporen.

Das Sporen-Photoprodukt wird in keimenden Sporen zum Großteil von der Sporen-Photoprodukt-Lyase durch Spaltung der Methylenbrücke repariert.<sup>[6]</sup> Die SP-Lyase ist Mitglied der sogenannten Radikal-SAM-Enzym-Familie.<sup>[7]</sup> Als solches besitzt sie ein *TIM-Barrel*-Struktur-Motiv und bindet *S*-Adenosyl-Methionin (SAM) und sein Substrat, das Sporen-Photoprodukt, in der Nähe eines  $4\text{Fe}4\text{S}^{2+}$ -Clusters, der im Inneren des *TIM-Barrels* durch Enzym-Reste koordiniert wird (Abbildung 2).<sup>[8]</sup> Die Reduktion dieses Clusters führt zum Elektronen-Transfer auf den SAM-Cofaktor, der sich in Methionin und ein 5'-Desoxyadenosyl-Radikal spaltet.<sup>[9]</sup> Dieses Radikal initiiert den radikal-katalytischen Reparatur-Mechanismus des Sporen-Photoprodukts.<sup>[10-11]</sup>

Zur Untersuchung der Reparatur- und Schadens-Erkennungs-Mechanismen der SP-Lyase wurden in dieser Arbeit die SP-Lyasen aus *Geobacillus stearothermophilus* und *Geobacillus thermodenitrificans* mit Hilfe von *Escherichia coli*-Expressionssystemen überexprimiert und im Anschluss aufgereinigt. Die SP-Lyase aus *Geobacillus thermodenitrificans* wurde zusätzlich zu

der in der *Carell*-Gruppe vorab etablierten SP-Lyase aus *Geobacillus stearothermophilus*<sup>[12]</sup> verwendet, um die Ergebnisse mit der Proteinstruktur vergleichen zu können; die Struktur wurde mit der SP-Lyase aus *Geobacillus thermodenitrificans* gelöst (Abbildung 2).<sup>[8]</sup> Die beiden SPL-Varianten wurden bezüglich ihrer Aminosäure-Sequenz, ihrer Sekundär- und Tertiärstruktur, ihrer FeS-Cluster-Beladung im nativen Zustand, sowie ihrer Affinität zu SP-dsDNA-Substraten untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass sich die beiden SP-Lyasen in allen Charakterisierungspunkten sehr ähnlich sind.

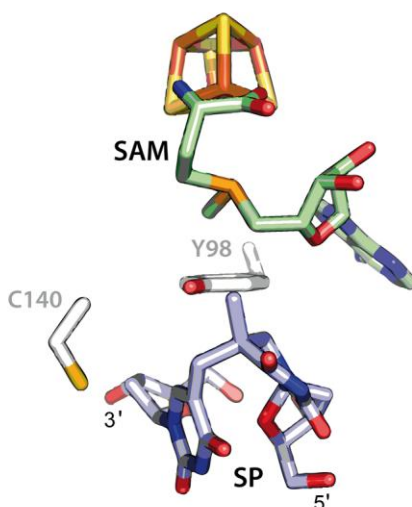


**Abbildung 2:** Globale Struktur der Sporen-Photoprodukt-Lyase, dem Reparatur-Enzym des Sporen-Photoprodukts. Das TIM-Barrel-Struktur-Motiv ist in Violett ( $\alpha$ -Helices) und Rot ( $\beta$ -Faltblätter) dargestellt. Der SAM-Cofaktor ist in Grün und das Sporen-Photoprodukt in Blau gezeigt. PDB 4FHD

In dieser Arbeit wurde die katalytische Effizienz der SP-Lyase mit unterschiedlichen SP-Substraten verglichen. Die Länge der SP-DNA-Substrate und die Anwesenheit des Phosphats zwischen den beiden Nukleosiden des Sporen-Photoprodukts waren für die Effizienz der Reparatur entscheidend, aber der Einfluss des Phosphats auf die Umsatzgeschwindigkeit war größer. Das am effizientesten reparierte SP-Substrat war SP-dsDNA, da nur mit diesem Substrat mehr als ein Sporen-Photoprodukt pro gespaltenem SAM-Molekül repariert werden konnte. Für SP-dsDNA wurde im Folgenden die katalytische Effizienz als  $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ -Wert bestimmt, welcher vergleichbar mit dem Literaturwert für SP-Dinukleosid-Monophosphat<sup>[13]</sup> war.

Um im nächsten Schritt den Reparatur-Mechanismus untersuchen zu können, wurden die Aminosäure-Reste C140 und Y98 im aktiven Zentrum der *Geobacillus*-SP-Lyasen mutiert (Abbildung 3). Die Analyse der katalytischen Eigenschaften zeigte, dass in den Mutanten der Knock-Out der Radikal-Funktion durch Substitution mit Alanin beziehungsweise Phenylalanin zu einer Blockade des Katalyse-Mechanismus führte. Diese Blockade äußerte sich als Substratinhibitions-Effekt in der Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstante. Auch der katalytische

Umsatz wurde in diesen Mutanten stark beeinträchtigt, da die Messungen zeigten, dass für jeden Katalyse-Zyklus mindestens ein neues SAM-Molekül gebunden wurde.



**Abbildung 3:** Einblick in das aktive Zentrum der SP-Lyase mit den Aminosäure-Resten C140 und Y98, welche für Aktivitäts-Studien in dieser Arbeit mutiert wurden. Grün: SAM-Cofaktor, Blau: SP-Dinukleosid. PDB 4FHD

Im Folgenden wurde versucht, intermediär gebildete Radikale des Katalyse-Zyklus, insbesondere Aminosäure-Radikale des C140 und Y98, mit Hilfe von UV-Vis- und EPR-Spektroskopie zu detektieren. Mit der UV-Vis-Spektroskopie konnte jedoch nur eine Beeinträchtigung im 4Fe4S-Cluster-Signal, welche vermutlich aus der Bindung des SAM-Cofaktors beziehungsweise seiner Spaltprodukte an den Cluster resultierte, nachgewiesen werden. Die Bedingungen für die empfindlichere EPR-Spektroskopie konnten dagegen soweit optimiert werden, dass minimale Signale potentieller organischer Radikale im SPL-Wildtyp detektiert werden konnten. In der C140A-Mutante konnte mit denselben Bedingungen ein starkes Signal potentieller organischer Radikale gemessen werden; ein C140-Radikal kann für dieses Signal ausgeschlossen werden, doch könnte das Signal von einem Tyrosyl- oder einem 5'-Desoxyadenosyl-Radikal stammen. Die Signale waren in beiden SPL-Varianten stärker mit ungeschädigter dsDNA als mit spezifischem SP-dsDNA-Substrat, was darauf hindeutet, dass die potentiellen Radikale bereits vor der Bindung des Sporen-Photoprodukts im aktiven Zentrum gebildet werden.

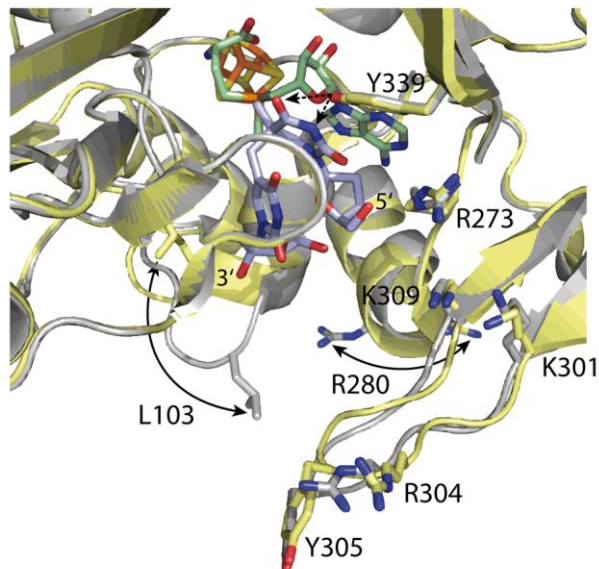
Die Ergebnisse bildeten die Grundlage zur Diskussion des radikal-katalytischen Reparatur-Mechanismus. Die bisher stark vertretene Hypothese, dass der SAM Cofaktor regeneriert werden könnte,<sup>[14]</sup> wird in dieser Arbeit unter strukturellen,<sup>[8]</sup> energetischen,<sup>[15-16]</sup> biochemischen<sup>[10-11]</sup> und den hier erhaltenen spektroskopischen Aspekten kritisch diskutiert. Unter denselben Aspekten wird hier eine neue Hypothese vorgeschlagen, in dem das 5'-Desoxyadenosyl-Radikal vor der Bindung des Sporen-Photoprodukts im aktiven Zentrum gebildet würde. Dieses Radikal könnte

dann mit dem benachbarten Y98, und dieses schließlich mit C140, interagieren und potentielle intermediäre Aminosäure-Radikale bilden. Nach Bindung des Sporen-Photoprodukts könnte das Radikal von den Aminosäure-Resten auf 5'-Desoxyadenosin zurück transferiert werden, wodurch das 5'-Desoxyadenosyl-Radikal den Reparatur-Zyklus initiieren könnte. Zwischen zwei Reparatur-Zyklen könnte das Radikal erneut an den Aminosäure-Resten zwischen gelagert werden. Diese Hypothese unterscheidet sich von der SAM-Regenerierungs-Strategie insofern, dass nur das 5'-Desoxyadenosyl-Radikal, jedoch nicht der komplette SAM-Cofaktor, kurzzeitig regeneriert würde, um einen neuen Reparatur-Zyklus zu initiieren.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden zur Untersuchung des Schadens-Erkennungs-Mechanismus die Bindungsstärken der beiden SP-Lyasen an dsDNA bestimmt. Die  $K_d$ -Werte lagen im Bereich mittlerer Bindungsstärke und die Bindung erfolgte mit geringer Sequenzspezifität. Die Bindungsstärke nahm mit zunehmender DNA-Länge zu. Weitere Versuche zeigten, dass die SP-Lyase zur Schadens-Suche vermutlich an der DNA entlang gleitet, wobei dieser Prozess ohne Direktionalität erfolgte.

In den Bindungsstudien verursachten steigende Proteinkonzentrationen einen Effekt zunehmender Affinität der SP-Lyase an die DNA. Um eine mögliche Erklärung dieses Effekts zu geben, wurde eine Hypothese aufgestellt, in der die SP-Lyase eine Konformationsänderung in der DNA verursachen könnte, die wiederum die Affinität zur SP-Lyase erhöhen könnte. Physiologisch betrachtet könnte solch eine Konformationsänderung der DNA wichtig beim Herausflippen des Sporen-Photoprodukts aus dem DNA-Duplex in das aktive Zentrum sein oder auf eine höhere Affinität der SP-Lyase an die sporenspezifische AB-DNA<sup>[17]</sup> hindeuten.

Abschließend wurden ausgewählte Aminosäure-Reste, die in der potentiellen DNA-Bindungstasche liegen oder offensichtliche Strukturänderungen nach Bindung des Sporen-Photoprodukts im aktiven Zentrum unterlaufen (*Abbildung 4*),<sup>[8]</sup> mutiert. Von diesen Mutanten wurden die  $K_d$ -Werte und ihre relative Aktivität bestimmt, um eine Rolle der entsprechenden Aminosäuren bei der DNA-Bindung oder dem Flipp-Prozess des Sporen-Photoprodukts abwägen zu können. Die Mutanten der Reste K301, R304, Y305 und K309 waren vorwiegend in ihrer DNA-Bindungseigenschaft beeinträchtigt, wodurch auch die Aktivität der SP-Lyase sank. Die entsprechenden Reste könnten bei der Schadens-Erkennung beteiligt sein. Die anderen Reste, L103, R273, R280 und Y339, könnten eine direkte oder indirekte Rolle im Flipp-Prozess und bei der Stabilisierung des Sporen-Photoprodukts im aktiven Zentrum spielen, da ihre relative Aktivität stärker beeinträchtigt wurde als ihre Bindungs-Eigenschaften.



**Abbildung 4:** Darstellung der Aminosäure-Reste, welche für die Untersuchung des Schadens-Erkennungs-Mechanismus der SP-Lyase mutiert wurden. Grün: SAM-Cofaktor, Blau: SP-Dinukleosid, Grau: SP-Lyase vor Bindung des SP-Dinukleosids, Gelb: SP-Lyase nach Bindung des SP-Dinukleosids. PDB 4FHC und 4FHD

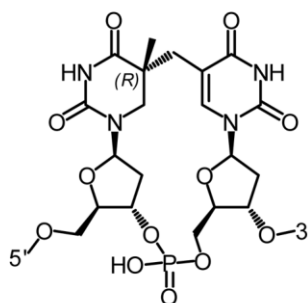
Zusammengenommen konnten in dieser Dissertation durch Studien mit ausgewählten Mutanten und biophysikalischen Messungen ein neuer Mechanismus der SP-Reparatur durch die SP-Lyase postuliert sowie erste Einblicke in den Schadens-Erkennungs-Mechanismus der SP-Lyase erhalten werden.





## Summary

Spore-forming bacteria, in particular their toxic members, are continually of interest in the news. They cause diseases such as tetanus (*Clostridium tetani*), botulism (*Clostridium botulinum*) and anthrax (*Bacillus anthracis*) and their spores are common weapons in bio-terrorism (*Bacillus anthracis*).<sup>[1-2]</sup> The spores of those bacteria are persistent and they have developed mechanisms to protect their DNA to germinate later on under better environmental conditions.<sup>[3]</sup> Upon UV-irradiation of such spores, almost none of the UV-lesions commonly generated in vegetative cells (CPD-, (6-4)- and Dewar-lesions) are found in spore DNA.<sup>[4]</sup> Instead, a photo dimer of adjacent thymidins is prevalently formed, that occurs almost exclusively in bacterial spores.<sup>[4]</sup> This is the 5-( $\alpha$ -thyminyl)-5,6-dihydrothymine, also known as spore photoproduct (SP) (*Figure 1*).<sup>[5]</sup>

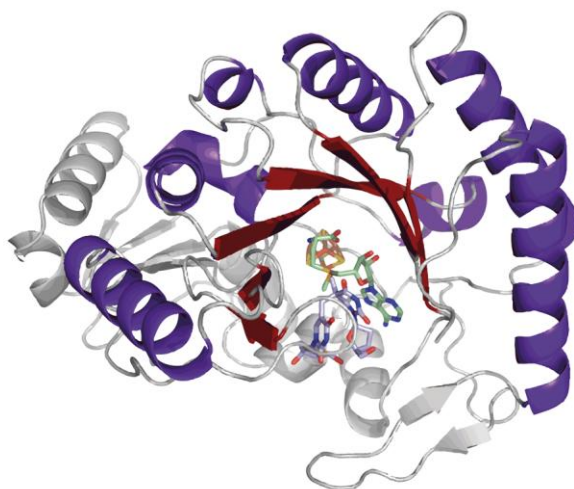


**Figure 1:** Structure of the UV-induced spore photoproduct lesion in bacterial spores.

The spore photoproduct is primarily repaired by the spore photoproduct lyase, which cleaves the methylene bridge, during spore germination.<sup>[6]</sup> The SP-lyase is a member of the so-called radical SAM family of enzymes.<sup>[7]</sup> As such, it comprises a TIM barrel structure motif and binds *S*-adenosylmethionine (SAM) and its substrate, the spore photoproduct, in close proximity to a  $4\text{Fe}4\text{S}^{2+}$  cluster.<sup>[8]</sup> This cluster is coordinated by enzyme residues in the interior of the TIM barrel (*Figure 2*). Reduction of this cluster leads to an electron transfer to the SAM cofactor, which subsequently cleaves into methionine and a 5'-desoxyadenosyl radical.<sup>[9]</sup> This radical initiates the radical-based repair mechanism of the spore photoproduct.<sup>[10-11]</sup>

In order to analyze the repair and lesion recognition mechanisms of the SP-lyase in this thesis, the SP-lyases of *Geobacillus stearothermophilus* and *Geobacillus thermodenitrificans* were overexpressed via an *Escherichia coli* expression system and subsequently purified. The SP-lyase of *Geobacillus thermodenitrificans* was used in addition to the SP-lyase of *Geobacillus stearothermophilus*, previously established in the Carell-Group,<sup>[12]</sup> so that the results could be compared to the protein structure; the structure was solved with the SP-lyase of *Geobacillus thermodenitrificans* (*Figure 2*).<sup>[8]</sup> The two SP-lyase proteins were characterized with respect to

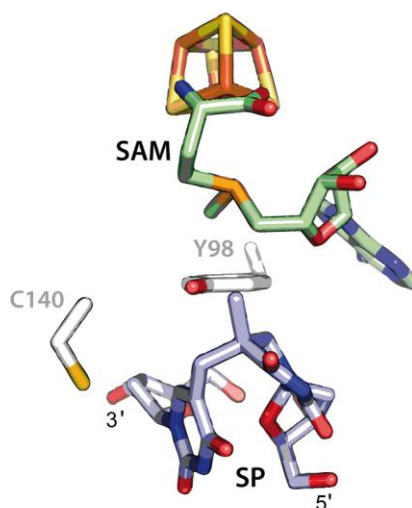
their amino acid sequence, their secondary and tertiary structure, their loading with FeS clusters in native conditions as well as their affinity to SP-dsDNA substrates. The results revealed that both SP-lyases are very similar in all of these aspects.



**Figure 2:** Overall structure of the spore photoprotect lyase, the repair enzyme of the spore photoprotect. The TIM barrel structure motif is shown in purple (α-helices) and red (β-sheets). The SAM cofactor is given in green and the spore photoprotect in blue. PDB 4FHD

Given these first characteristics, the catalytic efficiency of the SP-lyase was compared for varying SP substrates. The phosphate, linking the two nucleosides of the spore photoprotect, as well as the length of the SP-DNA substrates were found to be decisive for the repair, but the phosphate had a greater influence on turnover. The most efficiently repaired SP substrate was SP-dsDNA; only with this substrate more than one spore photoprotect could be repaired with one SAM molecule that was cleaved. Consequently, the catalytic efficiency  $k_{cat}/K_m$  was measured for SP-dsDNA, which was comparable to the published value for SP dinucleoside monophosphate.<sup>[13]</sup>

In order to further analyze the repair mechanism, the active site amino acids C140 and Y98 of the *Geobacillus* SP-lyases were mutated (*Figure 3*). The radical function of the mutants was knocked out by substitution to alanine and phenylalanine, respectively. This led to a block of the catalytic mechanism. This block expressed itself as substrate inhibition effect in the determination of the *Michaelis-Menten* constant. Likewise, the catalytic turnover was strongly perturbed in these mutants, as the experiments showed, that at least one new molecule of SAM was required for each catalytic cycle.



**Figure 3:** Zoom into the active site of the SP-lyase showing the amino acid residues C140 and Y98, which were mutated for further activity studies in this thesis. Green: SAM cofactor, blue: SP dinucleoside. PDB 4FHD

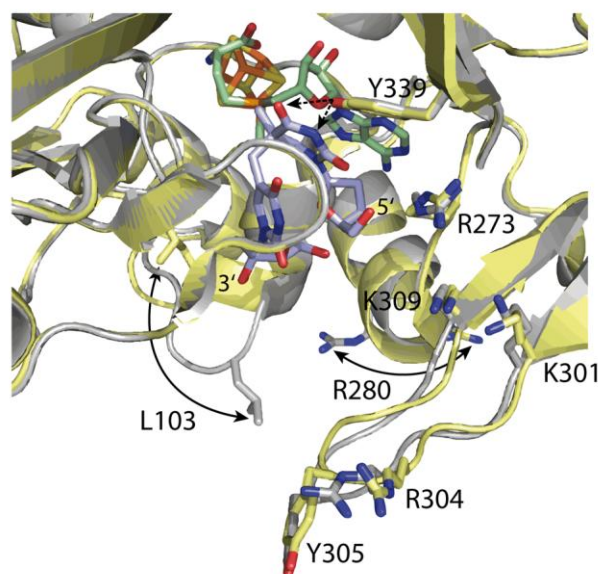
Additionally, experiments were started to detect intermediary radicals within the catalytic cycle, in particular amino acid radicals of C140 and Y98, using UV-Vis and EPR spectroscopy. In the UV-Vis approach, only an impairment of the 4Fe4S cluster signal likely resulting from binding of the SAM cofactor or its cleavage products, could be identified. The settings for the more sensitive EPR spectroscopy, however, could be optimized, so that minimal signals of potential organic radicals were detected in wildtype SPL. For the C140A mutant, a strong signal of potential organic radicals could be measured with the same settings; a C140 radical can be ruled out for this signal, however, the signal could result from a tyrosyl or 5'-desoxyadenosyl radical. The signals in both SPL proteins were stronger with non-damaged dsDNA than with specific SP-dsDNA substrate. This indicates, that the potential radicals are already formed prior to the binding event of the spore photoproduct in the active site.

The results provided the basis for further discussion of the radical-based repair mechanism. The so far strongly supported hypothesis, that the SAM cofactor could be regenerated,<sup>[14]</sup> is in this thesis critically discussed in terms of structural,<sup>[8]</sup> energetic,<sup>[15-16]</sup> biochemical<sup>[10-11]</sup> and the here presented spectroscopic aspects. Regarding the same aspects, a new hypothesis is proposed, in which the 5'-desoxyadenosyl radical would be formed prior to the binding of the spore photoproduct in the active site. It could then interact with the adjacent Y98, and this eventually with C140, to form potential intermediary amino acid radicals. Upon binding of the spore photoproduct, the radical could be transferred from the amino acid residues back to the 5'-desoxyadenosine, enabling the initiation of the repair cycle by the 5'-desoxyadenosyl radical. In between two repair cycles, the radical could, once more, be stored intermediately at the amino acid residues. This hypothesis differs from the SAM regeneration strategy inasmuch as only the 5'-desoxyadenosyl

radical, but not the complete SAM cofactor, would be regenerated for a short time in order to initiate a new repair cycle.

In the second part of this thesis binding strengths of both SP-lyases to dsDNA were measured to analyze the lesion recognition mechanism. The  $K_d$  values presented an average binding strength and the binding occurred with low sequence specificity. The binding affinity increased with increasing DNA length. Further experiments have shown, that the SP-lyase could slide along the DNA to search for its substrate, and that this process occurred without directionality.

In the binding studies, increasing protein concentrations showed an effect of increasing affinity of the SP-lyase to the DNA. In order to give a possible explanation for this effect, a hypothesis was proposed, in which the SP-lyase could cause a conformational change of the DNA, which could in turn enhance the affinity of the SP-lyase to DNA. Physiologically, the conformational change could be decisive for the flipping process of the spore photoproduct from the DNA duplex into the active site or it could indicate that the SP-lyase could bind with higher affinity to AB-DNA<sup>[17]</sup> specific for bacterial spores.



**Figure 4:** Representation of the amino acid residues, which were mutated for the analysis of the lesion recognition mechanism of the SP-lyase. Green: SAM cofactor, blue: SP dinucleoside, grey: SP-lyase prior to the binding event of the SP dinucleoside, yellow: SP-lyase after binding of the SP dinucleoside. PDB 4FHC and 4FHD

Finally, selected amino acid residues were mutated, that are located in the potential DNA binding site or that undergo apparent structural changes upon binding of the spore photoproduct in the active site (*Figure 4*).<sup>[8]</sup> The  $K_d$  values and the relative activity of these mutants were measured to evaluate the role of the respective amino acids during the processes of DNA binding or flipping of the spore photoproduct. The mutants of the residues K301, R304, Y305 and K309 were impaired

primarily in their binding affinity to dsDNA, so that the activity of the SP-lyase sank as well. The respective residues could take part in lesion recognition. The mutants of the other residues, L103, R273, R280 and Y339, were impaired stronger in their relative activity than in their binding affinity to dsDNA. The respective residues could play a direct or indirect role in the flipping process or in the stabilization of the spore photoproduct in the active site.

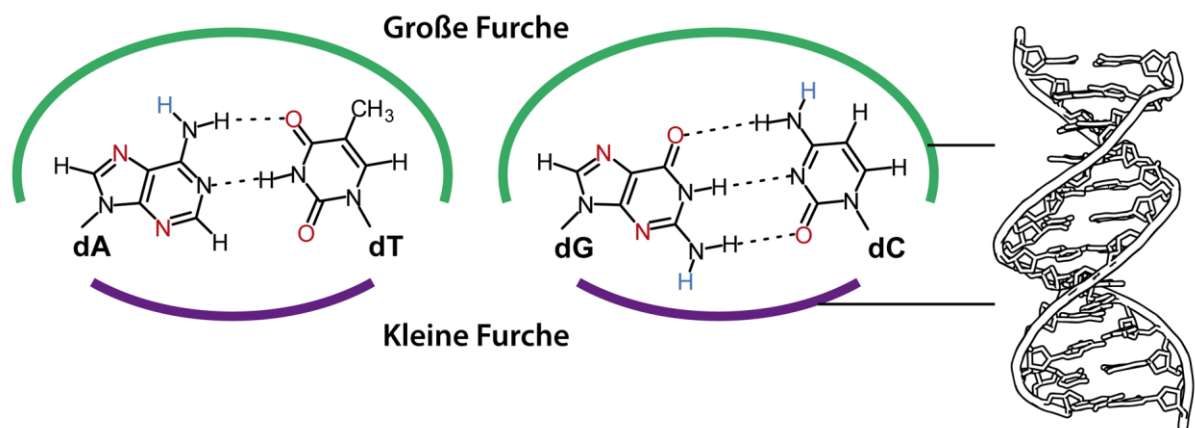
Taken together, in this thesis a new mechanism of the SP repair by SP-lyase is postulated and first insights into the lesion recognition mechanism of the SP-lyase are given based on the analysis of selected mutants and biophysical data.



# 1. Einleitung

## 1.1. DNA

Die Desoxyribonukleinsäure ist der zentrale Informationsspeicher allen Lebens. Sie besteht aus einer Sequenz von vier Nukleotiden, 2'-Desoxyadenosin (dA), 2'-Desoxyguanosin (dG), Thymin (dT) und 2'-Desoxycytidin (dC), die über Phosphodiesterbindungen miteinander verknüpft sind. Diese Bindungen verbrücken die Zucker der Nukleotide am sogenannten DNA-Rückgrat zwischen ihrer 5'- und 3'-Position. Damit wird der DNA-Strang polarisiert und erhält ein 5'- und ein 3'-Ende. Zwei zueinander komplementäre Stränge sind antiparallel polarisiert und können sich zu einer Doppelhelix zusammenlagern. Diese Struktur wurde Mitte des 20. Jahrhunderts von *Watson und Crick*, mit großer Beteiligung von *Franklin, Gosling* und *Wilkins* entschlüsselt.<sup>[18-21]</sup> Die beiden Stränge werden dabei von spezifischen Wasserstoffbrücken-Bindungen zwischen den komplementären Nukleobasen der beiden Stränge stabilisiert. Adenin paart über zwei Wasserstoffbrücken mit Thymin, und Guanin über drei Wasserstoffbrücken mit Cytosin (*Abbildung 1*). Nach ihren Entdeckern wurden diese Wechselwirkungen als *Watson-Crick-Basenpaarungen* benannt. Die aromatischen Ringe der Nukleobasen sind parallel zueinander sowie fast senkrecht zum Zucker-Phosphat-Rückgrat ausgerichtet, so dass hydrophobe Stapelkräfte wirken können, die zusätzlich die Doppelhelix-Struktur stabilisieren.<sup>[22]</sup>



**Abbildung 1:** Die Watson-Crick-Basenpaarungen der DNA-Doppelhelix wie sie von der großen und kleinen Furche aus gesehen werden. Adenin (dA) paart mit Thymin (dT) und Guanin (dG) paart mit Cytosin (dC). Wasserstoffbrücken-Akzeptoren sind in Rot und Wasserstoffbrücken-Donoren sind in Blau dargestellt. Die große Furche trägt mehr spezifische Merkmale der Basenpaare und ist damit der vorwiegende Angriffspunkt für DNA-bindende Proteine. PDB 264D

Da die glykosidischen Bindungen der Basenpaare zu ihren jeweiligen Zuckern diametrisch nicht genau gegenüber liegen, bildet die DNA-Doppelhelix zwei unterschiedliche Bereiche, in denen

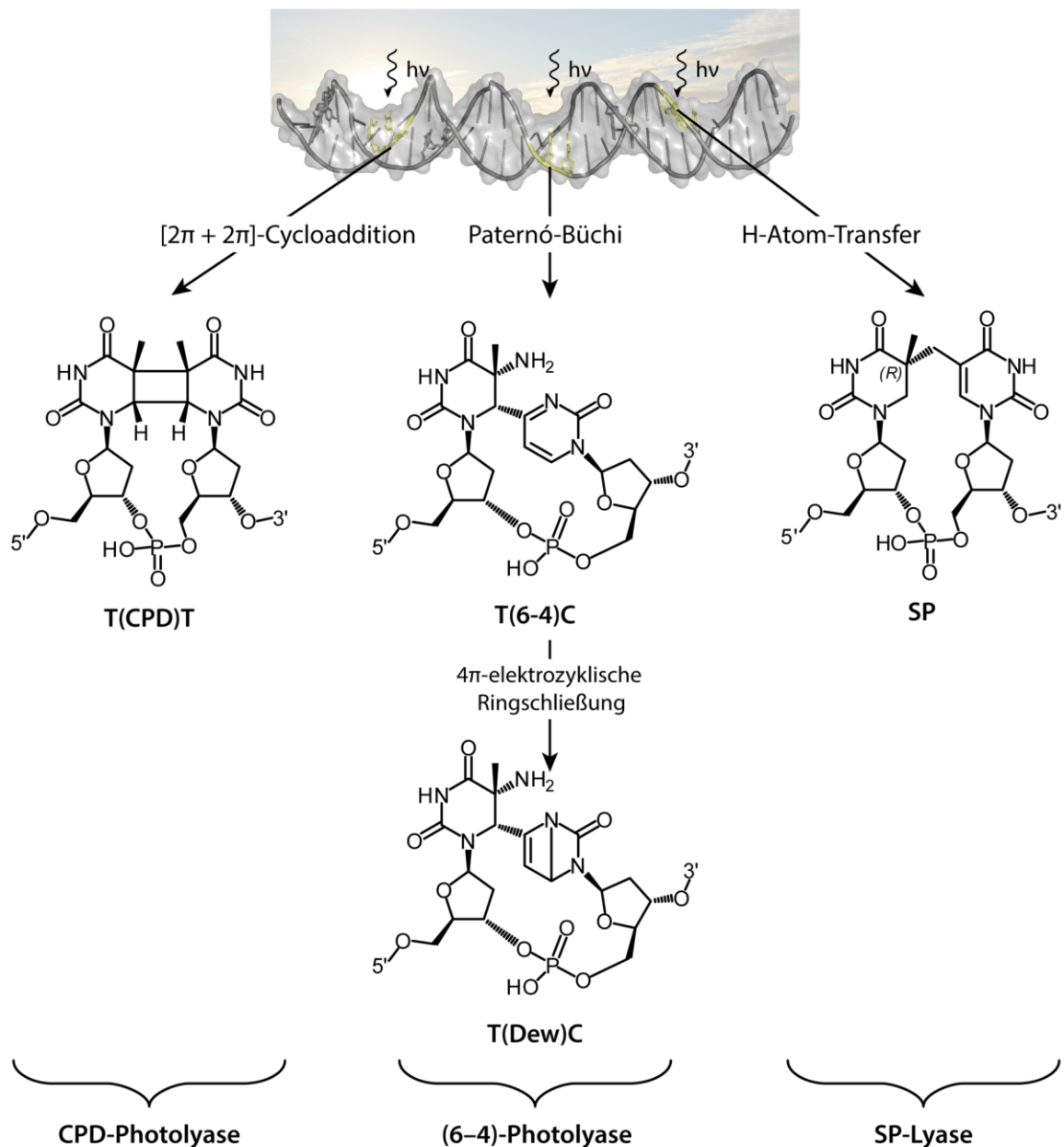
die Basen dem Lösungsmittel ausgesetzt sind: die große und die kleine Furche.<sup>[23]</sup> Wie in *Abbildung 1* dargestellt, werden die Furchen von unterschiedlichen Kombinationen an potentiellen Wasserstoffbrücken-Donoren und -Akzeptoren ausgekleidet. Die große Furche enthält zudem noch die Methylgruppe des Thymins und weist damit mehr Merkmale zur spezifischen Unterscheidung der Basenpaare AT und GC auf als die kleine Furche. Aus diesem Grund, und weil dieser Bereich zugänglicher ist, binden Proteine bevorzugt an die große Furche.<sup>[22]</sup>

Kurz vor der Aufklärung der Struktur des DNA-Moleküls wurde bewiesen, dass die DNA der Träger der vererbaren genetischen Information ist.<sup>[24-26]</sup> Als solche ist es umso wichtiger sie vor exogenen und endogenen Schadensquellen zu schützen, welche verschiedenste Modifikationen an der DNA auslösen können.<sup>[27]</sup> Eine der gefährlichsten Schadensquellen ist UV-Strahlung aus Sonnenlicht oder künstlich erzeugtem Licht, wie Sterilisierungslampen.<sup>[28]</sup> UV-Licht ist in drei Sektionen unterteilbar: UV-A (320–400 nm), UV-B (280–320 nm) und UV-C (200–280 nm). Obwohl alle Sektionen im Spektrum des Sonnenlichts enthalten sind, erreichen effektiv nur UV-A und UV-B die Erdoberfläche. UV-C wird von der in der Stratosphäre gelegenen Ozonschicht zurück gehalten. Während UV-A nur schwach karzinogen ist, zeigen UV-B- und UV-C-Strahlung stark mutagene, karzinogene, und auch letale Effekte in lebenden Zellen.<sup>[29]</sup> Beim Menschen zeichnet sich dies zunächst in Form von Hautrötungen ab und kann letzten Endes zu Hautkrebs führen.<sup>[30]</sup> Der Grund für diese unterschiedlichen Effekte liegt im Absorptionsbereich der DNA, der von den Nukleobasen definiert wird. Das Maximum dieses Bereichs liegt bei 260 nm,<sup>[19]</sup> weswegen UV-B- und UV-C-Strahlung stärker von den Basen absorbiert wird als UV-A.<sup>[4]</sup> Durch die Absorption dieser energiereichen Strahlung werden die Nukleobasen in eine höher liegende Energie-Ebene angeregt,<sup>[31-38]</sup> was zu Schäden in der DNA führen kann. UV-A kann diesen Effekt nur über sogenannte Photosensibilisatoren (engl.: *photosensitizer*) erzielen, welche die vom UV-A-Licht aufgenommene Energie an die DNA weiterleiten.<sup>[4]</sup>

Die bekanntesten und am häufigsten vorkommenden UV-Schäden in der DNA sind Pyrimidin-Dimere.<sup>[39-42]</sup> Zu einem kleinen Prozentsatz sind auch Purin-Basen photoreaktiv, und es können Hydrat- und Oxidations-Schäden durch UV-Strahlung entstehen,<sup>[4]</sup> doch auf diese soll hier nicht weiter eingegangen werden. *Abbildung 2* zeigt die vier Untergruppen der Pyrimidin-Dimere. Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere (CPDs), Pyrimidin-(6–4)-Pyrimidon-Photoprodukte sowie ihre Dewar-Valenz-Isomere werden in vegetativen Zellen gebildet. Die Dewar-Schäden entstehen aus einer sekundären, UV-angeregten (300–350 nm) Reaktion zu fast 100% aus den (6–4)-Schäden.<sup>[30]</sup> Die vierte Untergruppe – das Sporen-Photoprodukt – wird nur unter außergewöhnlichen Bedingungen, wie sie vor allem in bakteriellen Sporen vorkommen, gebildet.<sup>[23]</sup> Allen



gemeinsam ist die Notwendigkeit der Reparatur, da sie ohne solche im Genom akkumulieren und letztendlich zum Zelltod führen können.<sup>[28,43]</sup>



**Abbildung 2:** Die vier Untergruppen der UV-induzierten DNA-Dimere. Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere werden überwiegend an Dithymidin-Stellen gebildet, während (6-4)-Photoprodukte und ihre sekundär gebildeten Dewar-Valenz-Isomere vorzugsweise an 5'-TC-3'-Stellen gebildet werden. Vom Sporen-Photoprodukt entsteht nur ein Isomer, das in 5' → 3' Richtung generierte (5R)-SP.

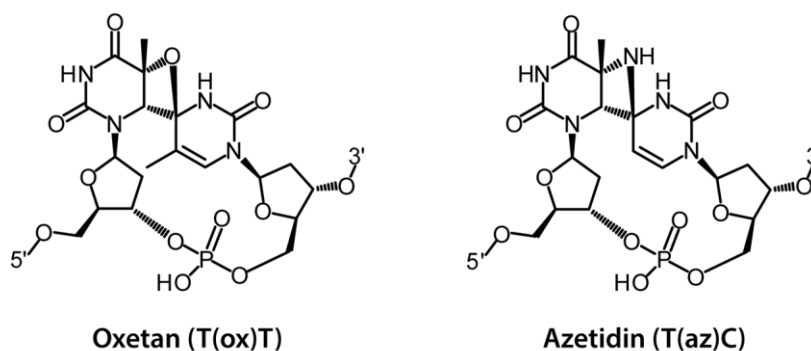
Um dem entgegen zu wirken, haben alle Organismen spezifische DNA-Reparatursysteme entwickelt, welche DNA-Schäden erkennen und entfernen.<sup>[44-45]</sup> Besonders bemerkenswert sind Reparatur-Enzyme, die Photoschäden über eine einzige, direkte Reaktion in ihre Dithymidin-Sequenz umwandeln können.<sup>[40,45-47]</sup> Für die CPDs, (6-4)-Schäden und Dewar-Schäden ist dies

die Enzym-Familie der Photolyasen, für das spezielle Sporen-Photoprodukt ist es die Familie der Sporen-Photoprodukt-Lyasen (SPL).

## 1.2. DNA-Photoschäden in vegetativen Zellen

Von den drei bekannten UV-induzierten DNA-Schäden, die in vegetativen – Mitose betreibenden – Zellen gefunden werden, werden die CPD-Photoprodukte am häufigsten gebildet. Nur 20–30% aller Photoprodukte sind (6–4)- und Dewar-Schäden.<sup>[29]</sup> Obwohl die Quantenausbeute für die einzelnen Photoreaktionen relativ gering ist, entstehen aufgrund der massiven UV-Belastung der DNA und der großen Angriffsfläche eines DNA-Moleküls signifikante Mengen an Pyrimidin-Dimeren.<sup>[48–49]</sup> Die exakten Ausbeuten dieser Photoreaktionen und der Dimer-Typ sind stark abhängig von der DNA-Sequenz sowie von ihrer Struktur und Krümmung.<sup>[50–54]</sup> So werden CPD-Schäden vor allem an TT-Stellen, (6–4)-Schäden jedoch mit höherer Effizienz an TC-Stellen, generiert.<sup>[55–56]</sup> Die Strukturen dieser Photoprodukte sind in *Abbildung 2* dargestellt. Für die Bildung der CPDs ist eine  $[2\pi + 2\pi]$ -Cycloaddition zwischen zwei benachbarten Pyrimidin-Resten in der DNA notwendig. Diese Reaktion könnte theoretisch mehrere Konfigurationsisomere bilden, doch entsteht wegen der fixierten Konformation der DNA-Basen relativ zur DNA-Doppelhelix fast ausschließlich die *cis-syn* Konfiguration des Cyclobutans.<sup>[39]</sup> Erfolgt die  $[2\pi + 2\pi]$ -Cycloaddition nicht zwischen den beiden C5=C6-Doppelbindungen der Pyrimidine, sondern zwischen der C5=C6-Doppelbindung und der Thymin-Carbonylgruppe beziehungsweise dem tautomerisierten Cytosin-Imin zweier benachbarter Pyrimidin-Basen, so entstehen stattdessen (6–4)-Photoprodukte.<sup>[38]</sup> Diese sogenannte *Paternó-Büchi*-Reaktion zu den (6–4)-Photoprodukten liefert zunächst ein Oxetan-Intermediat, wenn der 3'-Bindungspartner ein Thymin ist, beziehungsweise ein Azetidin-Intermediat, wenn der Bindungspartner ein Cytosin ist (*Abbildung 3*). Aufgrund ihrer Instabilität bei Raumtemperatur, öffnen diese Intermediate ihre Cyclostruktur zu den entsprechend stabilen (6–4)-Schäden.<sup>[38]</sup>

Infolge der teils erhalten gebliebenen Aromatizität des (6–4)-Schadens, weist dieser eine zusätzliche Absorptionsbande bei 325 nm auf.<sup>[57]</sup> Licht mit einer Wellenlänge nahe 300 nm kann nun diese Photoprodukte gezielt anregen<sup>[58–59]</sup> und zu einer  $4\pi$ -elektrozyklischen Ringschließung führen.<sup>[41,60–61]</sup> Die dadurch entstehenden Dewar-Valenz-Isomere akkumulieren in der DNA, da sie die Absorptionseigenschaft der Nukleobasen verloren haben und damit nicht zum (6–4)-Schaden zurück reagieren können. Trotz der stark verzerrten Nukleotid-Struktur des Dewar-Schadens, ist dieser erstaunlich stabil im DNA-Duplex.<sup>[40]</sup>



**Abbildung 3:** Oxetan- und Azetidin-Intermediate der *Paternó-Büchi*-Reaktion zweier benachbarter Pyrimidine zu (6–4)-Photoprodukten.

Bekanntlich verzerren alle UV-Schäden die DNA um einige Grade und verursachen damit eine lokale DNA-Destabilisierung.<sup>[62-63]</sup> Durch ihre veränderten Basenpaarungseigenschaften können sie sogar die Aktivität von DNA- und RNA-Polymerasen reduzieren beziehungsweise vollständig blockieren. Dies kann schließlich zu einem Nukleotid-Fehleinbau oder zum Abbruch der DNA-Replikation beziehungsweise -Transkription führen.<sup>[64-67]</sup> Am hochgradigsten mutagen von den drei Photoprodukten in vegetativen Zellen sind Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere, die mindestens eine Cytosin-Gruppe enthalten.<sup>[68-71]</sup> Die 5,6-Dihydrocytosin-Substruktur deaminiert um sechs Größenordnungen schneller als normale Cytosine zum entsprechenden, stabileren 5,6-Dihydro-uracil.<sup>[68-71]</sup> Nach Replikation dieses sekundären Photoschadens, erfolgt eine C zu T Transitionsmutation, da der Uracil-Anteil im CPD mit Adenin paart. Aber auch wenn diese Umwandlung der Cytosin-Anteile im CPD nicht stattfindet, ist eine Transition zum T sehr wahrscheinlich hinsichtlich der „A“-Regel der DNA-Polymerasen:<sup>[72]</sup> Können diese ihr Substrat nicht erkennen, wird grundsätzlich ein Adenin im neu replizierten Strang eingebaut.<sup>[72]</sup> Bei (6–4)-Photoprodukten tritt der Effekt der Deaminierung nur dann auf, wenn der Cytosin-Rest an der 5'-Position des Schadens liegt. Mittels *in-vivo*-Versuchen konnte nachgewiesen werden, dass diese enorme Mutagenität von entscheidender Wichtigkeit bei der Initiation von Hautkrebs ist,<sup>[30,73-76]</sup> besonders wenn solch eine UV-induzierte Mutation in einem Tumor-Suppressor-Gen erfolgt.<sup>[77-78]</sup> Weitere biologische Reaktionen auf diese Schäden sind Apoptose und Immunsuppression.<sup>[79-80]</sup> Es ist daher unumgänglich für den Organismus, dass diese Schäden effizient repariert werden.

### 1.3. DNA-Photoschäden in bakteriellen Sporen

Im Gegensatz zu vegetativen Zellen, ist die Resistenz von bakteriellen Sporen gegenüber UV-Strahlung um einiges größer.<sup>[3]</sup> Die Sporen haben Mechanismen entwickelt, um zu überleben und unter besseren Bedingungen wieder zu keimen.<sup>[3]</sup> Da aber UV-C-Licht zu Sterilisierungszwecken verwendet wird,<sup>[81]</sup> führt die Resistenz der Sporen zu einem beständigen Problem in der Lebensmittel- und Gesundheitsbranche.<sup>[82-83]</sup> Auch in der Bekämpfung des Bioterrorismus spielt die Resistenz der Sporen eine wichtige Rolle, vor allem im Hinblick auf die Verwendung von Anthrax-Sporen als Biowaffe.<sup>[2]</sup> Wie genau sich bakterielle Sporen von vegetativen Zellen unterscheiden, dass solch eine drastische Veränderung in der Photochemie auftritt, soll in diesem Kapitel besprochen werden.

#### **Sporenbildung**

Befinden sich sporenbildende Bakterien in einer Umgebung mit ungünstigen Umweltfaktoren, wie zum Beispiel Mangel an Nährstoffen, so wird der Prozess der Sporenbildung eingeleitet.<sup>[84]</sup> Dieser einzigartige Prozess dient ausschließlich dem Überleben des Mikroorganismus. Die meisten Erkenntnisse über den Ablauf der Sporulation wurden von *Bacillus subtilis* gewonnen.<sup>[4,84-89]</sup> Genauen Einblick in diese extrem komplexen, zellulären Entwicklungsprozesse liefert außerdem die Wissens-Plattform SporeWeb (<http://sporeweb.molgenrug.nl>).<sup>[90]</sup> Aus diesen Quellen kann die Sporulation wie folgt beschrieben werden: Eine asymmetrische Zellteilung in Mutter- und Vorderspore ist der erste wichtige Schritt der Sporenbildung. Nach der Expression spezifischer Gene in den beiden Zellen, internalisiert die Mutterzelle die Vorderspore. Der erste Schutzmechanismus wird etabliert, indem der Zwischenraum der beiden Zellen mit Zellwand-Material aufgefüllt und eine äußere Schicht, der sogenannte Sporenmantel, aufgebaut wird. Durch Aufnahme von Dipicolinsäure (DPA) aus der Mutterzelle und Produktion spezifischer DNA-bindender Proteine (SASPs) wird die DNA in der Vorderzelle dehydriert und verdichtet, was einen zusätzlichen Schutz bietet. Als finaler Schritt wird die nun reife Endospore durch Lyse der Mutterzelle in die Umgebung frei gelassen. In diesem Zustand, ohne erkennbaren Metabolismus, können Sporen bis zu Millionen von Jahren überdauern,<sup>[91-92]</sup> um unter geeigneten Bedingungen wieder zu keimen.<sup>[3]</sup>

#### **Morphologie der DNA in Endosporen**

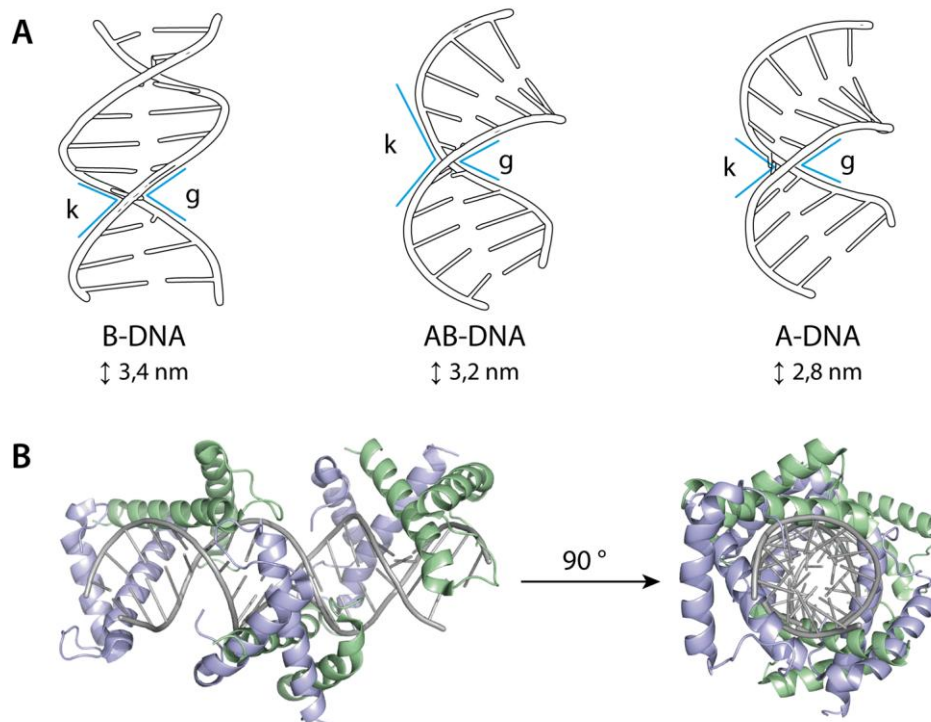
In dem langen Dauerzustand der Endosporen ist es unerlässlich, dass keine beziehungsweise nur wenige Schäden an der DNA akkumulieren. Effiziente Reparaturprozesse sind in der dormanten Spore jedoch ausgeschlossen, da aufgrund des fehlenden Metabolismus energiereiche Verbindun-

gen fehlen und praktisch alle Enzyme inaktiviert sind.<sup>[93]</sup> Somit ist die DNA vollständig auf passive und physikalische Schutzmechanismen angewiesen. Ein erster Beitrag wird bereits von dem Sporenmantel geliefert, dessen Melanin-artige Pigmente einen Großteil der UV-A- und UV-B-Strahlung absorbieren.<sup>[4]</sup> Hauptsächlich wird der Schutz aber durch Faktoren vermittelt, welche die Morphologie der DNA in den Endosporen einzigartig verändern.

Das Chromatin in der sich entwickelnden Vorderspore, über den Dauerzustand als Endospore hinweg, bis zu den keimenden Sporen ist dicht gepackt.<sup>[94-96]</sup> Dies ist den sogenannten kleinen, säurelöslichen Proteinen (SASPs) zuzuschreiben,<sup>[87,93,97-99]</sup> die in der dormanten Spore für 10–20% des Trockengewichts verantwortlich sind. Diese Gruppe besteht aus unterschiedlichen Untergruppen.  $\alpha/\beta$ -SASPs sind 5–7 kDa große Proteine, die Sequenz-unabhängig an die DNA binden.<sup>[96]</sup> Dabei werden sie in so hohem Grad produziert, dass sie das komplette Chromatin ab-sättigen und helikale Filamente in einer ringförmigen Konformation bilden.<sup>[96]</sup> Auf diese Weise üben sie einen signifikanten Effekt auf die Genexpression während der Sporulation und der Keimung aus.<sup>[100]</sup> Für  $\gamma$ -SASPs ist bislang noch keine Funktion bekannt. Sie könnten einzig und allein als Aminosäure-Quelle für die Proteinexpression während dem Keimungsprozess eingelagert werden.<sup>[100]</sup>

Vor knapp 50 Jahren wurde die Hypothese aufgestellt, dass die DNA in Endosporen nicht als B-DNA, sondern als A-DNA vorliegen könnte.<sup>[5,101]</sup> Dies wurde durch IR- und CD-Experimente bekräftigt, in denen SspC, ein  $\alpha/\beta$ -SASP, Konformationsänderungen an der DNA zu einer A-DNA-artigen Struktur auslöste.<sup>[102-103]</sup> Da SASPs generell die Eigenschaft haben durch die dichte hydrophobe Packung eine Dehydrierung in der unmittelbaren Umgebung der DNA hervorzurufen,<sup>[17,96]</sup> scheint dies mehr als plausibel zu sein. A-DNA erscheint vorwiegend in dehydrierten DNA-Fasern und bindet effektiv weniger Wassermoleküle als B-DNA. EM-Studien zeigten hingegen, dass SASPs keinen Einfluss auf die DNA-Länge haben.<sup>[104]</sup> Mit einer Ganghöhe von 3,2 nm ist Sporen-DNA somit ähnlicher zur B-DNA (3,4 nm) als zur A-DNA (2,8 nm).<sup>[96,104]</sup> Diese Uneinigkeit konnte schließlich mit einer Kristallstruktur eines SspC-DNA-Komplexes geklärt werden, der zeigte, dass die DNA tatsächlich Eigenschaften von A- und B-DNA aufweist (*Abbildung 4*).<sup>[62]</sup> Diese besondere Konformation wird als AB-DNA bezeichnet. Auf den ersten Blick (*Abbildung 4A*) sieht die AB-DNA der A-DNA sehr ähnlich, da sie wie diese eine Verdrehung der Helix aufgrund einer C3'-endo Zuckerkonformation anstatt einer C2'-endo wie in B-DNA aufweist.<sup>[62]</sup> Damit haben sich auch die kleine und große Furche entscheidend geändert. Da SspC als Dimer an die kleine Furche bindet<sup>[62]</sup> (*Abbildung 4B*) ist diese entsprechend ausgeweitet, während die große Furche um einiges enger und tiefer wird als in

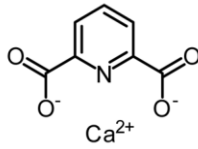
B-DNA üblich. Obwohl die Ganghöhe der AB-DNA mehr der in B-DNA ähnelt, liegt der Wert der Basenpaare pro Windung mit 11,5 näher an der in A-DNA (11,0).<sup>[62]</sup>



**Abbildung 4:** Die DNA in bakteriellen Sporen liegt in einer durch SASPs induzierten AB-Konformation vor. **(A)** Vergleich von B-, AB- und A-DNA. Die unterschiedlichen Ganghöhen sind unter der jeweiligen Helix gegeben. Die kleine (k) und große (g) Furche sind in Blau hervorgehoben. PDB 264D, 2Z3X und 440D **(B)** SspC-DNA-Komplex. Die SspC-Proteine bilden Dimere (Blau, Grün) an der kleinen Furche der DNA. PDB 2Z3X

Mit Hilfe der SspC-DNA-Kristallstruktur lassen sich einige Resistenzeffekte der Sporen erklären. Die SspC-Dimere assoziieren miteinander (*Abbildung 4B*), so dass die DNA effizient umwickelt wird und der Protein-DNA-Komplex letzten Endes eine starre Konformation annimmt.<sup>[62]</sup> Dadurch könnte die Zugänglichkeit der DNA für genotoxische Chemikalien eingeschränkt werden. Die veränderte Reaktivität der DNA nach UV-Einwirkung lässt sich jedoch unter anderem der veränderten Konformation zuschreiben.<sup>[62]</sup> Die für die Bildung von CPDs und (6–4)-Schäden notwendige Flexibilität der DNA<sup>[105]</sup> ist hier nicht mehr gewährleistet. Dieser Umstand scheint auch der Grund für die reduzierte Bildung von abasischen Stellen zu sein.<sup>[106-107]</sup>

Ein weiterer Faktor der entscheidend zur dehydrierten Morphologie der DNA in Sporen beiträgt ist Dipicolinsäure (DPA, *Abbildung 5*). Diese stellt 5–10% des Trockengewichts in Endosporen<sup>[4,93,108-109]</sup> und tritt vorwiegend als 1:1 Komplex mit  $\text{Ca}^{2+}$  auf.<sup>[108]</sup> Es bindet vermutlich durch Interkalation<sup>[110]</sup> an die DNA und bewirkt damit eine zusätzliche Reduktion des Hydrationszustandes der DNA.<sup>[111]</sup>



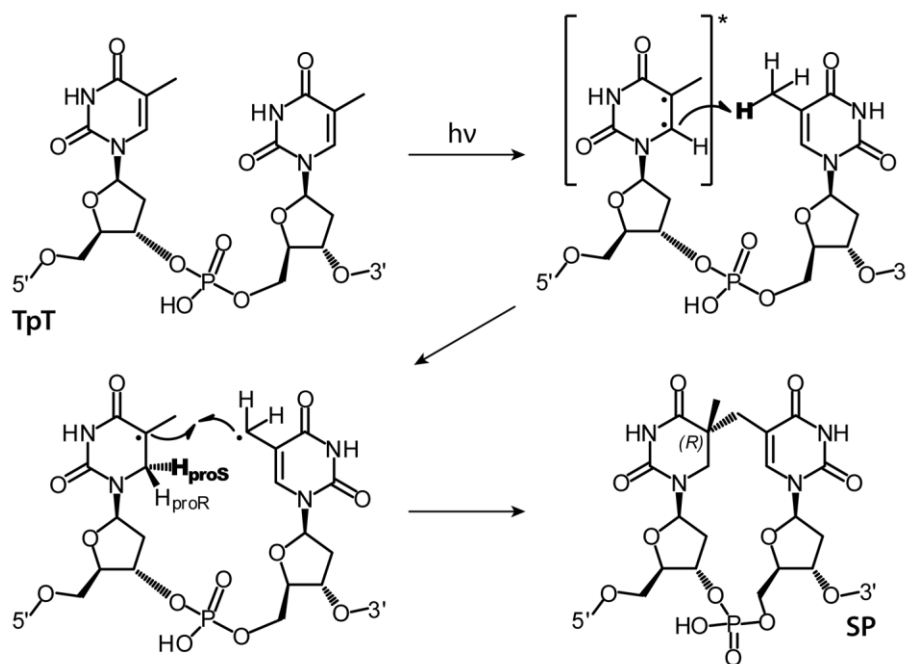
**Abbildung 5:** Dipicolinsäure komplexiert mit  $\text{Ca}^{2+}$ .

### **Verbreitung UV-induzierter Schäden**

Die Resistenz von bakteriellen Sporen gegenüber UV-Licht äußert sich dadurch, dass nur sehr geringe Mengen an CPDs, (6–4)-Schäden sowie Doppelstrangbrüche nach UV-C-Bestrahlung von Endosporen entstehen.<sup>[112]</sup> Stattdessen wird überwiegend ein neues Photodimer gebildet, das Sporen-Photoprodukt (SP, *Abbildung 2*).<sup>[4-5,14,113-114]</sup> Der SP-Schaden bildet einen Anteil von 95% aller Photoschäden,<sup>[115]</sup> sowie ungefähr 8% aller Thymin-Basen<sup>[108,116]</sup> in der DNA der Endospore. Diese erstaunlich hohe Bildungsrate ist unter anderem abhängig von der Wellenlänge des UV-Lichts. Werden Sporen mit einer Mischung aus UV-B und UV-A bestrahlt, sinkt die Ausbeute des Sporen-Photoprodukts um drei bis vier Größenordnungen, während die Bildung von CPDs zunimmt.<sup>[112,117]</sup> Diese stellen aber immer noch den geringeren Anteil der Photoschäden. Weitere Faktoren, welche die SP-Bildung fördern, sind die bereits beschriebenen Dehydrierungs- und Verdichtungs-Effekte von SASPs und DPA.<sup>[4]</sup> In UV-C-bestrahlten Endosporen, deren SASPs-Anteil auf 15% vom Wildtyp gesenkt wurde, werden 50% weniger SPs und dafür 40-fach mehr CPDs gebildet.<sup>[118]</sup> Wird der Versuch mit Endosporen durchgeführt, die nur geringe Mengen DPA besitzen, kann man ebenfalls eine minimierte Produktion von SP und eine Erhöhung der CPD-Bildung nachweisen.<sup>[119]</sup> Zusätzlich zu den Dehydrierungseffekten von DPA, scheint dieses noch eine Rolle als Photosensibilisator zu spielen.<sup>[12,108,119]</sup> Tatsächlich absorbiert DPA stark im UV-C-Bereich,<sup>[109,120]</sup> wodurch es einen selektiven Energietransfer auf die Thymin-Base initiieren könnte.<sup>[119]</sup> Ein solch selektiver Transfer könnte wiederum erklären, wieso SP exklusiv zwischen zwei benachbarten Thyminen gebildet wird und nicht, wie andere Photoprodukte, mit Beteiligung von Cytosin.<sup>[119,121]</sup> Fehlen sowohl SASPs als auch DPA in den Sporen, kehrt sich die Verteilung der Photoschäden um. Von allen gebildeten Photodimeren, stellen SPs nur mehr 2%, CPDs jedoch 38% und (6–4)-Schäden 40%.<sup>[119]</sup> Somit lässt sich die veränderte Photochemie der DNA zum Großteil der veränderten Konformation durch SASPs sowie der starken Dehydrierung zuschreiben. Die letztere scheint dabei die größere Rolle zu spielen.<sup>[4]</sup> Neben diesen chemischen Eigenschaften der Sporen selbst können auch physikalische Faktoren der Umgebung die SP-Bildung beeinflussen. Atmosphären-Druck<sup>[122]</sup> und eine Temperatur von  $-80\text{ °C}$ <sup>[123]</sup> begünstigen die Photoreaktion des SPs.

## Das Sporen-Photoprodukt

Ursprünglich wurde das Sporen-Photoprodukt – die korrekte chemische Bezeichnung lautet 5-( $\alpha$ -Thyminyl)-5,6-dihydrothymine – in bakteriellen Sporen im Jahr 1965 entdeckt.<sup>[5]</sup> Ein Jahr später konnte das SP auch in mit UV-Licht bestrahlten, tiefgefrorenen *Escherichia coli* Zellen gefunden werden<sup>[124]</sup> und vor kurzem wurde es sogar in *Mycobacterium parafortuitum* Zellen als dominanter DNA-Photoschaden nachgewiesen.<sup>[125]</sup> Die SP-Bildung erfordert, dass sich die Mycobakterien in der Luft bei 20–40% relativer Humidität befinden. Es scheint somit, dass die Sporen-Photoprodukt-Bildung nicht ausschließlich auf bakterielle Endosporen beschränkt ist, sondern dass das SP auch unter anderen, besonderen Umständen gebildet werden kann.



**Abbildung 6:** Vorgeschlagener Mechanismus zur Bildung des Sporen-Photoprodukts. \*: angeregter Zustand.

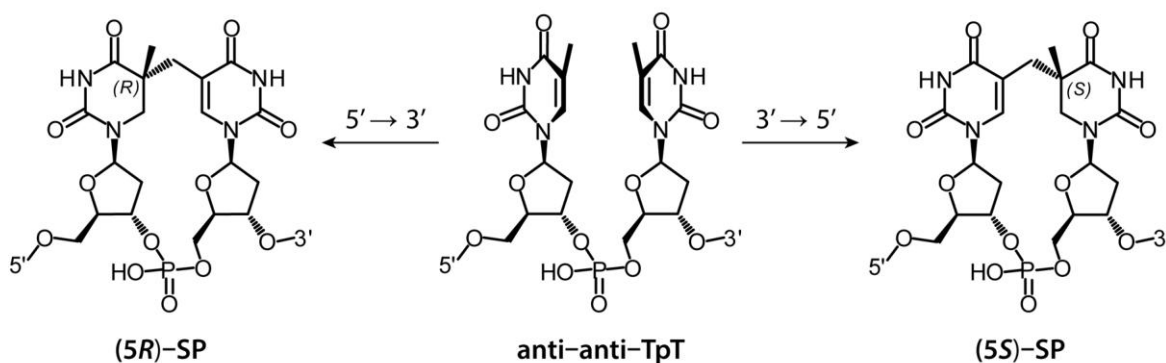
SPs werden nicht wie CPDs und (6–4)-Schäden mittels einer  $[2\pi + 2\pi]$ -Cycloaddition generiert. Stattdessen erfolgt ein intramolekularer H-Atom-Transfer.<sup>[126-127]</sup> Der exakte Entstehungsmechanismus ist bislang noch nicht im Detail geklärt. Die aktuellsten Ergebnisse aus Studien mit Deuterium-markierten Modellverbindungen<sup>[126]</sup> bekräftigen aber einen bereits vorgeschlagenen konsekutiven Mechanismus (Abbildung 6).<sup>[128-129]</sup> In diesem Mechanismus wird zunächst die C5=C6-Doppelbindung des 5'-Thymins durch UV-Licht angeregt, wodurch ein Triplett-Zustand, den man als Radikalpaar beschreiben kann, entsteht. Durch den Transfer eines H-Atoms von der Methylgruppe des 3'-Thymins zur C6-Position des 5'-Thymins entstehen ein 5- $\alpha$ -Thyminyl- und ein 5,6-Dihydrothymine-5-yl-Radikal. Dieser geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist stereoselektiv, da das transferierte H-Atom strikt in die proS-Position eingebaut wird. Letztendlich



rekombinieren die beiden Radikale zum Sporen-Photoprodukt. Bemerkenswert ist, dass die Reaktion nur in der beschriebenen  $5' \rightarrow 3'$ -Richtung abläuft. Eine Reaktion in  $3' \rightarrow 5'$ -Richtung konnte nicht nachgewiesen werden.<sup>[126]</sup> Die Alternative zum konsekutiven Mechanismus ist ein konzentrierter Mechanismus, in welchem die beiden Radikalspezies nicht explizit entstehen.<sup>[130]</sup> Dieser kann nicht ganz ausgeschlossen werden, da es für die beiden Radikale des Ersteren bislang nur indirekte Beweise gibt,<sup>[131-133]</sup> sie aber *per se* noch nicht beobachtet werden konnten.

### Struktur des Sporen-Photoprodukts

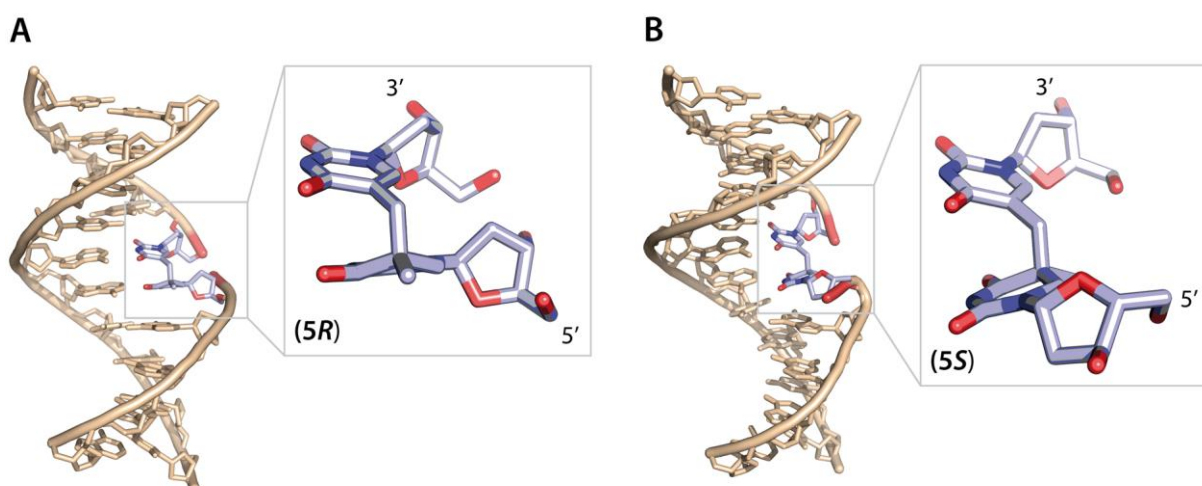
Der SP-DNA-Schaden wird fast ausschließlich zwischen zwei benachbarten Thyminen desselben DNA-Stranges gebildet. Da die Reaktion zum SP jedoch in zwei Richtungen,  $5' \rightarrow 3'$  oder  $3' \rightarrow 5'$ , ablaufen kann und die C5-Position des 5,6-Dihydrothymin-Restes ein Chiralitätszentrum ist,<sup>[121]</sup> können theoretisch vier Isomere des Schadens entstehen.<sup>[4]</sup> Die Bildung dieser hängt zusätzlich von der Ausrichtung der Nukleobasen im Strang ab. Unter der Annahme, dass Thymin-Basen in der AB-DNA aufgrund sterischer Gründe sehr wahrscheinlich nur eine anti-anti-Stellung einnehmen, entstehen nach erfolgter  $5' \rightarrow 3'$ - oder  $3' \rightarrow 5'$ -Reaktion nur mehr zwei Isomere: (5*R*)-SP beziehungsweise (5*S*)-SP (Abbildung 7).<sup>[4]</sup> Mittels Säurehydrolyse von Sporen-DNA konnte man jedoch lediglich ein Isomer des SPs nachweisen.<sup>[5,13,134]</sup>



**Abbildung 7:** Die beiden SP-Isomere, welche durch Bildung aus einer Anti-Anti-Dithymidin-Sequenz (TpT) gebildet werden können. Die natürliche Ausrichtung von zwei Thyminen im DNA-Duplex ist Anti-Anti. (5*R*)-SP entsteht theoretisch aus der  $5' \rightarrow 3'$ -Reaktion, (5*S*)-SP aus der  $3' \rightarrow 5'$ -Reaktion.

Dem heutigen Wissenstand zufolge wird das SP nur in  $5' \rightarrow 3'$ -Richtung gebildet (Abbildung 6).<sup>[126]</sup> Folglich sollte das (5*R*)-SP dem natürlich generierten Sporen-Photoprodukt-Schaden entsprechen. Erste NMR-Studien an synthetisch hergestellten SP-Isomeren sprachen dem natürlichen Schaden tatsächlich die (5*R*)-SP-Konfiguration zu.<sup>[135]</sup> Spätere Studien konnten dies bestätigen.<sup>[136]</sup> Diese wiesen den Vorteil auf, dass sie das SP durch UV-Belichtung aus unmodifiziertem Dithymidin-Monophosphat (TpT) gewannen. Auf diese Weise wird automatisch

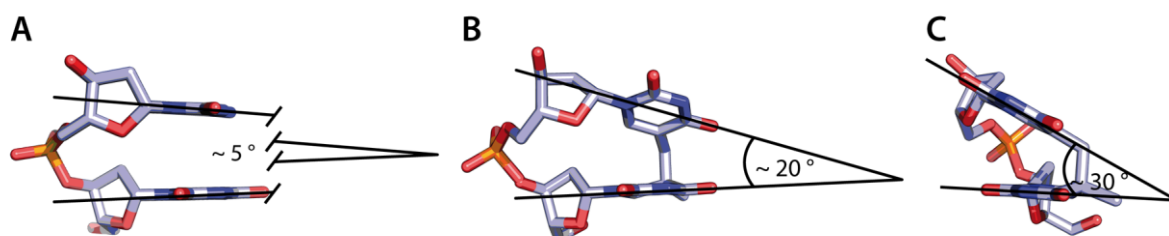
nur das natürliche, in Sporen-DNA nachgewiesene<sup>[13]</sup> Isomer gebildet. Darum erscheint es erstaunlich, dass die SP-Lyase, das Reparaturenzym des SP-Schadens, in enzymatischen Studien unserer Gruppe scheinbar nur die (5*S*)-SP-Konfiguration umsetzen konnte.<sup>[137-138]</sup> Die Konfiguration der synthetisch hergestellten Dinukleosid-Substrate in diesen Studien wurden über NMR-Spektroskopie vergleichbarer SP-Modellverbindungen zugewiesen. Eine ähnliche Studie aus dem Labor von *Joan Broderick* zeigte wiederum, dass die SP-Lyase (5*R*)-SP, aber nicht (5*S*)-SP reparieren konnte.<sup>[139]</sup> Dieser Widerspruch konnte geklärt werden durch die Kristallisation zweier kurzer Oligonukleotide mit eingebautem 5' → 3'-SP-Dinukleosid in (5*R*)- und (5*S*)-Konfiguration.<sup>[140]</sup> Um den Schaden in einer natürlichen B-DNA-Umgebung zu analysieren, wurden die Stränge im Komplex mit der Polymerase I aus *Geobacillus stearothermophilus* (*B.st.*) kristallisiert. Die Ergebnisse zeigten deutlich, dass die Bildung von (5*R*)-SP bevorzugt ist über der des (5*S*)-SPs.<sup>[140]</sup> Der 5,6-Dihydrothymin-Rest des (5*S*)-SPs ist in der Struktur komplett umgedreht, so dass das 5'-Zuckerende aus dem Duplex hinaus zeigt (*Abbildung 8B*). Dies führt zu einer erheblichen Verzerrung des DNA-Rückgrats. Das (5*R*)-SP dagegen fügt sich sehr gut in den DNA-Duplex ein (*Abbildung 8A*). In die Lücke zwischen den beiden SP-Resten des Dinukleosids, konnte sehr effizient eine Phosphatgruppe modelliert werden (*Abbildung 9B,C*). Zudem bildet das Dimer zwei fast perfekte *Watson-Crick*-Basenpaarungen mit den gegenüberliegenden Adeninen aus.<sup>[140]</sup> Eine SP-Lyase Reaktion mit den beiden Isomeren im doppelsträngigen DNA-(dsDNA)-Duplex konnte zusätzlich klären, dass in der Tat (5*R*)-SP repariert wird. Die Unstimmigkeit in früheren Publikationen wurde dadurch erklärt, dass die Entstehungsrichtung 5' → 3' des SP nicht genauestens beachtet wurde.<sup>[140]</sup>



**Abbildung 8:** Kristallstruktur des in 5' → 3'-Richtung gebildeten (5*R*)-SPs (**A**) und (5*S*)-SPs (**B**) fixiert im B-DNA-Duplex. Die Rückgrat-Verzerrung des (5*S*)-SPs ist enorm, weswegen dieser Schaden vermutlich nicht in der Natur gebildet wird. PDB 2Y1J und 2Y1I

## DNA-Destabilisierung durch das Sporen-Photoprodukt

Die erhaltene Kristallstruktur des SP-Dinukleosids in DNA<sup>[140]</sup> stimmt sehr gut mit der gleichzeitig publizierten Struktur eines SP-Dinukleosids mit Formacetal-Linker, anstatt eines Phosphats, überein.<sup>[141]</sup> Der einzige grundlegende Unterschied zwischen beiden Strukturen ist die Konformation des Zuckers im Rückgrat. In der Dinukleosid-Formacetal-Struktur<sup>[141]</sup> nehmen die Zuckereinheiten eine C3'-endo-Konformation ein, welche passend für AB-DNA<sup>[17]</sup> ist. In der DNA-Struktur<sup>[140]</sup> dagegen, nehmen die Zucker-Einheiten eine C2'-endo-Konformation an, die sich dadurch begründen lässt, dass der Duplex in eine B-DNA-Konformation gezwungen wurde. In der B-DNA-Konformation<sup>[140]</sup> hat der SP-Schaden nur wenig Einfluss auf die Gesamtstabilität des Duplexes. Der Winkel zwischen den beiden glykosidischen Bindungen der Nukleotide wird sehr oft als Indikator für die Stärke der Rückgrat-Distorsion von DNA-Schäden heran gezogen. In einer Dipyrimidin-Sequenz liegen die beiden Nukleotide fast parallel zueinander (*Abbildung 9A*). Der SP-Schaden verursacht im Vergleich dazu nur eine geringe Verzerrung des Rückgrats von circa 20° (*Abbildung 9B*), wobei die beiden Heterozyklen nicht mehr parallel zueinander liegen (*Abbildung 9C*).<sup>[140]</sup> CPD-DNA-Schäden verursachen vergleichsweise eine Verzerrung des Rückgrats um circa 30° und eine Verdrehung der Heterozyklen zueinander von circa 50°.<sup>[142]</sup> Die DNA-Verzerrungen durch (6–4)- und Dewar-Schäden sind noch dramatischer.<sup>[143–144]</sup>



**Abbildung 9:** Rückgrat-Verzerrung des (5S)-SP-DNA-Schadens. In einer normalen Dipyrimidin-Sequenz liegen die beiden Nukleotide fast parallel zueinander (**A**). SP verzerrt die Rückgratstruktur um circa 20° gemessen an den glykosidischen Bindungen (**B**) und um circa 30° gemessen an der Ausrichtung der Heterozyklen zueinander (**C**). PDB 1NJY und 2Y1J

Obwohl die DNA-Struktur des SPs<sup>[140]</sup> entscheidend zur endgültigen Aufklärung der Konformation des Schadens beitrug, können keine sicheren Schlüsse über den Einfluss auf die Duplex-Stabilität gezogen werden. Kräftigere Aussagen hätten eventuell getroffen werden können, wenn der SP-Schaden in einer AB-DNA-Umgebung anstatt einer B-DNA-Umgebung fixiert worden wäre. Schmelzkurven-Analysen konnten bereits zeigen, dass das SP die DNA vermutlich stärker verzerrt als es in der DNA-Struktur erscheint.<sup>[145–146]</sup> Eingebautes SP vermindert die Stabilität des DNA-Duplex dramatisch. Die Änderung der freien Enthalpie liegt abhängig von der Sequenzlänge bei 10–21 kJ mol<sup>-1</sup>.<sup>[146]</sup> Bei CPD-Schäden liegt dieser Wert bei nur 5,7–8,4 kJ mol<sup>-1</sup>.<sup>[147]</sup>

Weitere Experimente sind daher notwendig, um den tatsächlichen Verzerrungsgrad des DNA-Duplex durch SP unter geeigneten Bedingungen zu bestimmen.

Dies ist insofern wichtig, um die Effekte von nicht repariertem SP auf keimende Sporen zu erfassen. Bislang ist nur bekannt, dass nicht repariertes SP letal für die Zellen ist.<sup>[93,148]</sup> Allerdings ist unklar, ob diese Letalität ausgelöst wird durch eine hohe Mutagenität des Schadens oder durch einen herbeigeführten Replikationsstopp. Erste Hinweise darauf lieferte *Dr. J. Carsten Pieck* in seiner Dissertationsarbeit.<sup>[149]</sup> Replikationsstudien mit unterschiedlichen Polymerasen zeigten, dass das SP tatsächlich die Polymerasen entweder komplett blockiert oder ihre Replikationseffizienz reduziert.<sup>[149]</sup> Konnte eine Polymerase über den DNA-Schaden hinweg lesen, wurden zwei Adenosine gegenüber dem SP eingebaut. *In-vivo*-Versuche bekräftigten diese Ergebnisse.<sup>[149]</sup> Es scheint somit, dass die letalen Effekte des SPs weniger auf Mutagenität als auf der Beeinträchtigung der Replikation beruhen.<sup>[149]</sup> Da ein Replikationsstopp mitunter auf einer starken Verzerrung der DNA beruht, ist es durchaus möglich, dass das SP in Lösung einen stärkeren Einfluss auf die Duplex-Stabilität hat als von der DNA-Struktur<sup>[140]</sup> anzunehmen ist.

#### **1.4. Photolyase-vermittelte DNA-Reparatur in vegetativen Zellen**

Durch die bereits angesprochene hohe Mutagenität der UV-induzierten DNA-Schäden in vegetativen Zellen, insbesondere von CPD-Schäden,<sup>[150]</sup> ist es unerlässlich, dass diese so schnell wie möglich von der Zelle erkannt und repariert werden. Dafür stehen den Organismen unterschiedlichste Reparaturprozesse zur Verfügung.<sup>[29]</sup> Ein viel genutzter Mechanismus zur Entfernung von UV-Schäden in Prokaryoten und Eukaryoten, unter anderem dem Menschen, ist die Nukleotid-Exzisions-Reparatur (NER).<sup>[151-153]</sup> Dabei wird der Schaden während der Transkription aufgrund der Verformung der DNA-Struktur erkannt und durch einen speziellen Exzisions-Nuklease-Komplex mit mehreren Nukleotiden um den Schaden herum aus der DNA geschnitten.<sup>[151-153]</sup> Die so entstandene Lücke wird von einer Polymerase wieder aufgefüllt und von einer Ligase an den Schnittpunkten geschlossen. Auf einem ähnlichen Prinzip beruht die Basen-Exzisions-Reparatur (BER).<sup>[154-155]</sup> Bei dieser werden DNA-Schäden von einer für den Schaden spezifischen Glykosylase erkannt, welche die glykosidische Bindung zwischen modifizierter Base und entsprechender Desoxyribose spaltet.<sup>[154-155]</sup> Das übrig gebliebene Zucker-Phosphat wird dann von speziellen Endonukleasen entfernt und die Lücke wiederum von einer Polymerase und einer Ligase geschlossen. Für Pyrimidin-Dimere existieren nur in Prokaryoten und niederen Eukaryoten spezifische Glykosylasen.<sup>[156]</sup> Bei intensiver Schädigung der DNA wird zudem ein Schadenstole-

rierungs-Mechanismus (engl.: *translesion synthesis*) genutzt, bei dem spezielle Polymerasen eingesetzt werden, die nicht von dem Schaden geblockt werden.<sup>[44,157-158]</sup>

Organismen, die dem Sonnenlicht extrem ausgesetzt sind, wie Pflanzen und Mikroorganismen, haben außerdem einen direkten Reparaturmechanismus entwickelt.<sup>[159-161]</sup> Dabei werden Enzyme produziert, welche die DNA-Schäden spezifisch erkennen und eine direkte Rückreaktion zu den unmodifizierten Nukleotiden katalysieren.<sup>[47]</sup> Diese Art von Reparatur ist im Gegensatz zu den anderen Mechanismen sehr selektiv, doch auch hochgradig fehlerfrei.<sup>[47]</sup> Die Familie der Photolyasen repariert auf diese Weise UV-induzierte Pyrimidin-Dimere.<sup>[40]</sup> Dazu drehen die Enzyme das beschädigte Dinukleotid um fast 180° aus dem DNA-Duplex heraus (flippen), so dass es in ihrer aktiven Tasche zu liegen kommt,<sup>[156]</sup> und nutzen Licht im UV-A- und sichtbaren Bereich (320–500 nm)<sup>[42,44,159,162-176]</sup> zur Initiation der Dimer-Spaltung. Die einzelnen Mechanismen sind spezifisch an das zu reparierende Dimer angepasst.

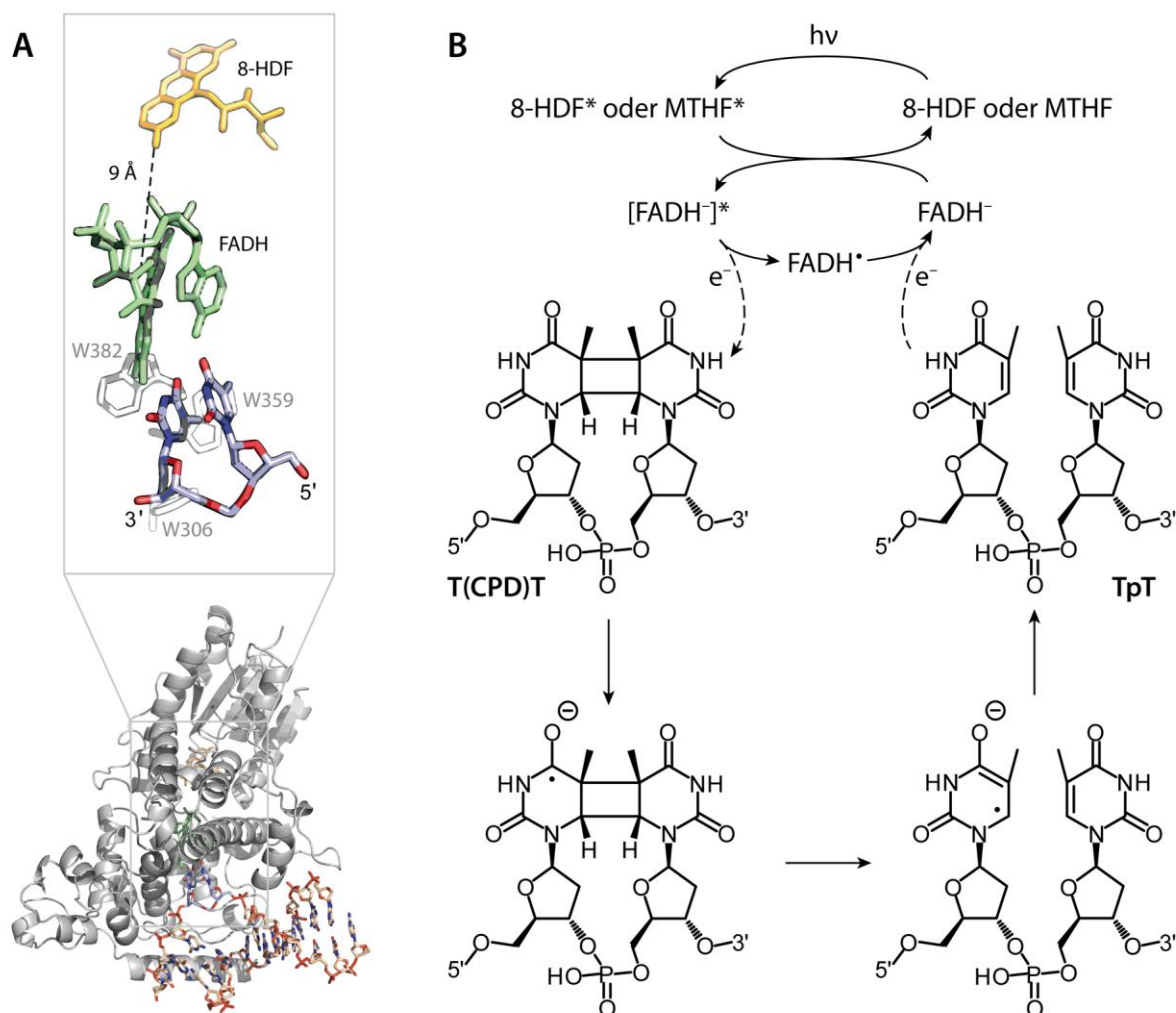
### **CPD-Photolyasen**

Die Familie der CPD-Photolyasen kann basierend auf einem Sequenzvergleich in drei Klassen eingeteilt werden.<sup>[177-178]</sup> Die Vertreter der Klasse I kommen nur in Mikroorganismen vor, die der Klasse II in Pflanzen, Archaeen, bestimmten Viren und höheren Eukaryoten – jedoch keinen Säugtieren – und die der Klasse III nur in Bakterien. Klasse-I-Photolyasen ähneln dabei sehr den Enzymen der (6–4)-Photolyase-Familie und Klasse-III-Photolyasen denen der Cryptochrom-Familie.<sup>[161,179]</sup>

Photolyasen besitzen eine globuläre Struktur, die aus zwei wichtigen Teilen besteht, einer C-terminalen,  $\alpha$ -helikalen Domäne und einer N-terminalen  $\alpha\beta$ -Domäne.<sup>[180-181]</sup> Die Erstere birgt den essentiellen Flavin-Adenin-Dinukleotid-Cofaktor (FAD).<sup>[182-183]</sup> Die meisten Photolyasen bedienen sich noch eines weiteren Cofaktors, der an der Schnittstelle zwischen beiden Domänen lokalisiert ist, etwa 9 Å vom FAD entfernt. Für gewöhnlich ist dies ein Methenyltetrahydrofolat (MTHF) oder ein Deazaflavin (8-HDF).<sup>[159,184]</sup> Bemerkenswert ist, dass der FAD-Cofaktor für die spezifische Bindung der CPD-Photolyasen an UV-induzierte Dimere in DNA benötigt wird.<sup>[185]</sup> Nur so können sie effizient zwischen unspezifischen DNA-Sequenzen und Photodimeren unterscheiden.<sup>[185]</sup> Die Messungen von Dissoziationskonstanten der Photolyasen aus verschiedenen Organismen zeigten deutlich eine um vier Größenordnungen schwächere Bindung an unspezifische DNA.<sup>[178,186-187]</sup> Ein wesentlicher Bestandteil der spezifischen DNA-Bindung ist das Flippen des CPD-Schadens in das aktive Zentrum des Enzyms.<sup>[178,188-189]</sup> Zwei Kristallstrukturen der Photolyasen aus *Anacystis nidulans* (Abbildung 10A)<sup>[189]</sup> und *Methanosarcina mazei*<sup>[178]</sup> im

Komplex mit einem kurzen, doppelsträngigen Oligonukleotid mit eingebautem CPD-Schaden lieferten detaillierte Einblicke in den Flipp-Mechanismus:<sup>[178,189]</sup>

In der aktiven Tasche wird das Dinukleotid über Wasserstoffbrücken-Bindungen zu benachbarten Aminosäure-Resten sowie zu Wassermolekülen stabilisiert. Die ansonsten sehr hydrophobe Bindungstasche enthält noch einen Tryptophan-Rest, welcher den Schaden über  $\pi\pi$ -Interaktionen zusätzlich im geflippten Zustand hält. Auf diese Weise wird das grundsätzlich energetisch ungünstige Flippen bewerkstelligt und der Schaden gleichzeitig in die unmittelbare Nähe ( $\sim 3.1 \text{ \AA}$ )<sup>[178]</sup> zum katalytisch wirksamen FAD gebracht. Durch diesen Prozess entsteht im DNA-Duplex jedoch eine Lücke, die durch Interaktionen zwischen DNA-Basen und Aminosäure-Resten stabilisiert wird. Die DNA selbst nimmt eine B-Konformation an, wird aber ziemlich stark, um circa  $50^\circ$ ,<sup>[178,189]</sup> von der Photolyase gekrümmt.



**Abbildung 10:** Struktur und Mechanismus der CPD-Photolyase. **(A)** Kristallstruktur der CPD-Photolyase aus *A. nidulans* und Zoom in das aktive Zentrum. Das gesplittene CPD ist in Hellblau dargestellt. PDB 1TEZ **(B)** Energie- und Elektronentransfer-basierter Mechanismus der CPD-Reparatur in Photolyasen. Gestrichelte Pfeile deuten einen Elektronentransfer zwischen dem FAD-Cofaktor und der Dithymidin-Sequenz an.

In *Abbildung 10A* ist ein vergrößerter Einblick in das aktive Zentrum dargestellt. Das CPD-Analogon mit Formacetal-Linker,<sup>[190]</sup> anstelle eines Phosphates, zwischen den beiden Nukleosiden wurde im Kristall durch die Synchrotron-Strahlung in ein Dithymidin gespalten. FAD bildet eine U-förmige Konformation, in der sich das Adenin zur Ribitylkette zurückfaltet.<sup>[178,189]</sup> Es liegt direkt über dem Schaden und circa 9 Å entfernt vom 8-HDF-Cofaktor.<sup>[189]</sup> In der Struktur der *M. mazei*-Photolyase<sup>[178]</sup> existiert kein zweiter Cofaktor, doch FAD und das intakte CPD sind vergleichbar ausgerichtet.

In isolierten Photolyasen liegt der FAD-Cofaktor üblicherweise als inaktives, semireduziertes FADH-Radikal ( $\text{FADH}^\bullet$ ) vor. Für die Reparatur des CPDs ist eine sogenannte Photoaktivierung zum  $\text{FADH}^-$  notwendig.<sup>[191-193]</sup> Dabei wird das  $\text{FADH}^\bullet$  zunächst durch Licht im sichtbaren Bereich angeregt ( $^*\text{FADH}^\bullet$ ). Dieses zerfällt innerhalb von 30 ps zum  $\text{FADH}^-$  indem es ein Elektron aus einer Tryptophan-Triade ( $^*\text{FADH}^\bullet \rightarrow \text{W382} \rightarrow \text{W359} \rightarrow \text{W306}$  in *A. nidulans*, *Abbildung 10A*) bezieht.<sup>[194]</sup> Das dadurch zunächst entstandene Tryptophan-Radikal-Kation  $\text{W382}^{++}$  wird vom benachbarten W359 und dieses wiederum vom an der Proteinoberfläche gelegenen W306 reduziert. Das  $\text{W306}^{++}$  gibt nun ein Proton an das Lösungsmittel ab, wodurch das Radikal im Tryptophan gefangen gehalten wird, ohne Möglichkeit zum Rücktransport an das  $\text{FADH}^-$ .<sup>[194]</sup> Ein exogenes Reduktionsmittel könnte schließlich das  $\text{W306}^\bullet$  regenerieren. Die Tryptophan-Triade wird außerdem im Radikaltransfer von Tyrosin-Resten unterstützt.<sup>[178,195]</sup>

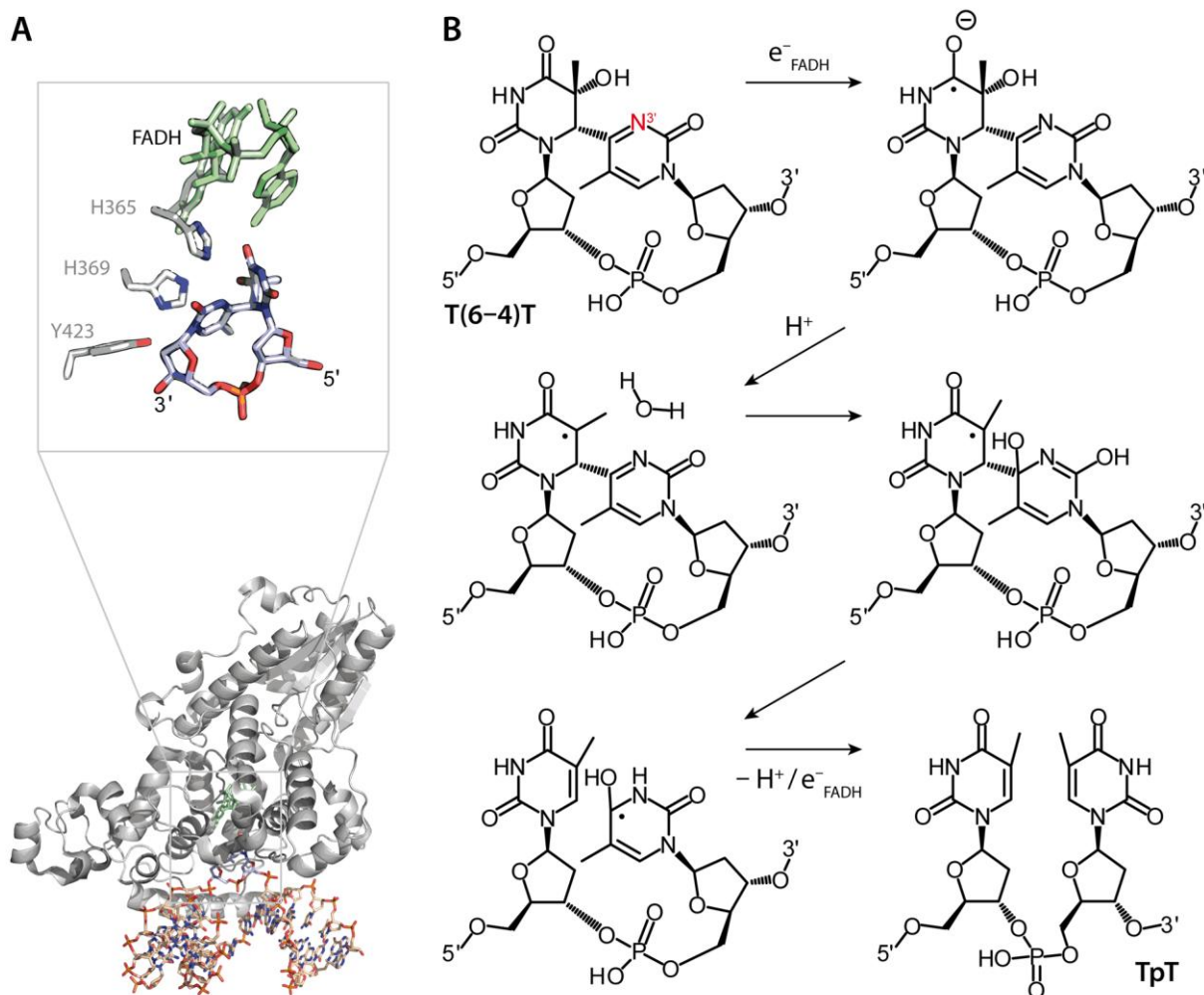
Detaillierte Einblicke in den folgenden Reparaturmechanismus<sup>[40]</sup> (*Abbildung 10B*) gewann man früh mittels biochemischer Studien<sup>[159,166]</sup> und Studien mit CPD- und Flavin-Modellverbindungen.<sup>[182,196-198]</sup> Damit das  $\text{FADH}^-$  ein Elektron in den CPD-Schaden injizieren kann, muss es erneut angeregt werden. MTHF und 8-HDF fördern die Anregung in großem Maß durch ihre Absorptionsmaxima bei 384 nm<sup>[199-200]</sup> beziehungsweise 438 nm.<sup>[159,201-202]</sup> Die absorbierte Energie wird über Dipol-Dipol-Wechselwirkungen an das  $\text{FADH}^-$  weitergeleitet.<sup>[165]</sup> Das angeregte  $^*\text{FADH}^-$  gibt nun ein Elektron an das  $\pi^*$ -Orbital der C4-Carbonylverbindung weiter. Das entstandene Radikal-Anion des CPDs unterzieht sich einer spontanen Cycloreversion. Alle beteiligten Radikal-Anion-Intermediate werden in der aktiven Tasche durch die strikte Solvatisierung stabilisiert.<sup>[178,189]</sup> Durch Wiederabgabe des überschüssigen Elektrons an das  $\text{FADH}^\bullet$  werden die beiden Thymidine und  $\text{FADH}^-$  vollständig regeneriert. Auf diese Weise wird von Photolyasen eine Reaktion katalysiert, die unter normalen Umständen durch die *Woodward-Hoffman*-Regeln verboten ist.<sup>[203]</sup> Allerdings existieren gewisse Störprozesse, wie der Rückelektronentransfer vom CPD-Radikal-Anion zum  $\text{FADH}^\bullet$  und die Elektronenumlagerung innerhalb des  $\text{FADH}^\bullet$ .<sup>[204]</sup> Im Hinblick auf die Reaktionsdynamik<sup>[205-206]</sup> ist die Stabilisierung der Radikal-Anion-Intermediate essentiell, um diese sekundären Transferprozesse einschränken zu können.<sup>[207]</sup> Dennoch haben die



Prozesse einen entscheidenden Einfluss auf die Quantenausbeute der Photolyase-Reaktion,<sup>[208-210]</sup> die mit 50% sehr gering ist.<sup>[208]</sup>

### (6–4)-Photolyasen

Im Vergleich zu der Reparatur der CPD-Photoprodukte ist die Reparatur der (6–4)- und Dewar-Schäden sehr anspruchsvoll, da nicht nur eine C-C-Einzelbindung gespalten, sondern auch ein Heteroatom-Transfer vermittelt werden muss. Die entsprechenden (6–4)-Photolyasen,<sup>[211-212]</sup> die dazu in der Lage sind, besitzen wie die CPD-Photolyasen einen FADH-Cofaktor<sup>[172]</sup> und manche einen zweiten Photoantennen-Cofaktor,<sup>[159]</sup> ähnlich zu 8-HDF. Auch die Bindung an die DNA erfolgt mit hoher Spezifität an der Schadensstelle,<sup>[175]</sup> um den (6–4)- oder Dewar-Schaden ins aktive Zentrum flippen zu können.<sup>[144,213]</sup>



**Abbildung 11:** Struktur und Mechanismus der (6–4)-Photolyase. **(A)** Kristallstruktur der (6–4)-Photolyase aus *D. melanogaster* und Zoom in das aktive Zentrum. Der (6–4)-Schaden ist in Hellblau dargestellt. PDB 3CVU **(B)** Potentieller Mechanismus der (6–4)-Reparatur in Photolyasen.



Der Reparaturmechanismus der (6–4)-Schäden ist weitestgehend aufgeklärt (*Abbildung 11B*), obwohl derzeit noch manche Alternativen im Detail diskutiert werden.<sup>[40]</sup> Man ist sich jedoch einig, dass die Reparatur nicht, wie zunächst angenommen,<sup>[169,214-216]</sup> über eine Rückkonversion mittels zweier konservierter Histidine<sup>[214,216-218]</sup> zum jeweiligen Oxetan- oder Azetidin-Intermediat erfolgt. Obwohl sich in Studien mit entsprechenden Modellverbindungen herausstellte,<sup>[214,219-220]</sup> dass Oxetane tatsächlich im Photolyase-System gespalten werden können, ist der Energieaufwand für die Bildung dieser Intermediate aus dem (6–4)-Schaden zu groß.<sup>[221]</sup> ENDOR-Studien widerlegten zudem, dass die konservierten Histidine eine, wie im Mechanismus vorgeschlagene, deprotonierende Rolle spielen, da sie in der Photolyase protoniert vorliegen.<sup>[222]</sup>

Mit Hilfe der Kristallstrukturen einer (6–4)-Photolyase vor und nach Reparatur eines T(6–4)T-Schadens konnte ein neuer Mechanismus vorgeschlagen werden,<sup>[144]</sup> der von Kurzzeit-spektroskopischen Studien größtenteils bestätigt werden konnte.<sup>[223]</sup> Die Strukturen<sup>[144]</sup> zeigten zunächst eine sehr ähnliche globale Struktur, wie man sie bereits in CPD-Photolyasen<sup>[189]</sup> gefunden hat (*Abbildung 11A*). Der FAD-Cofaktor ist wiederum in einer U-förmigen Konformation gebunden und liegt direkt über dem geflippten (6–4)-Schaden, welcher für die Reparatur durch *Watson-Crick*-artige Wasserstoffbrücken im aktiven Zentrum gehalten wird.<sup>[144]</sup> In der später publizierten Struktur mit T(6–4)C-Schaden, zeigten sich ähnliche Interaktionen zwischen Schaden und Protein.<sup>[213]</sup> Die offene Struktur der DNA wird ebenfalls von mehreren Interaktionen zwischen Aminosäure-Resten und Nukleotiden der DNA stabilisiert. In der aktiven Tasche fand man außerdem eine neuartige katalytische Triade aus einem Tyrosin und den beiden Histidinen, deren Rolle im Mechanismus bereits diskutiert wurde. Anhand dieser Entdeckung und der Lage des ersten Histidins zum Schaden, hat man folgende Hypothese für den Mechanismus entwickelt (*Abbildung 11B*):<sup>[144]</sup>

Das nach Elektronen-Injektion vom FAD-Cofaktor generierte C4-Radikal könnte die Qualität der benachbarten Hydroxylgruppe als Abgangsgruppe erhöhen. Protonierung durch His365 würde folglich zur Eliminierung als Wasser führen. Dieses könnte nun die Acylimin-Substruktur des (6–4)-Schadens angreifen, woraus ein Radikalintermediat entstehen würde, das fragmentieren und nach Elektronenabgabe an den FAD-Cofaktor das reparierte Pyrimidin-Dinukleotid frei geben könnte. Bei der Reparatur des T(6–4)C-Schadens würde entsprechend eine Aminogruppe übertragen werden.<sup>[213]</sup>

Als alternative Mechanismen wurden ein direkter Hydroxyltransfer<sup>[224]</sup> und eine initiale Protonierung des N3'-Atoms (*Abbildung 11B*), die mit der Übertragung von zwei Elektronen einhergeht,<sup>[225-226]</sup> vorgeschlagen.

Die Reparatur der Dewar-Valenz-Isomere wird ebenfalls von den (6–4)-Photolyasen vermittelt. Mittels einer Modellverbindung des T(Dew)C-Schadens konnte bewiesen werden, dass dieser von den Photolyasen vorerst in den entsprechenden T(6–4)C-Schaden umgewandelt wird, um dann mit dem oben dargestellten Mechanismus zur Dipyrimidin-Sequenz repariert zu werden.<sup>[143]</sup> Allerdings scheint nur T(Dew)C ein Substrat der Photolyase zu sein. T(Dew)T wird nicht auf diesem Weg repariert.<sup>[213,216]</sup> Da die (6–4)- und Dewar-Schäden vorwiegend an TC-Stellen generiert werden,<sup>[55]</sup> ist dies jedoch vertretbar. Der sehr geringe Anteil an TT-Schäden könnte schließlich mittels der Nukleotid-Exzisions-Reparatur entfernt werden. Zum Weiteren zeigt dies, dass die Energie- und Elektronen-Transferprozesse im Photolyase-System sehr eng gekoppelt sind. Kleine Änderungen im Redoxpotential scheinen die Fähigkeit zur Reparatur bereits dramatisch zu beeinträchtigen.<sup>[40]</sup>

### **Homologe der Photolyasen**

Bislang wurden keine Photolyasen im Menschen oder anderen Säugetieren identifiziert.<sup>[227-230]</sup> Allerdings konnten Homologe gefunden werden, die enorme Ähnlichkeiten aufweisen. Diese wurden in der Familie der Cryptochrome zusammen gefasst.<sup>[159,161,231-232]</sup> Die meisten Mitglieder dieser Familie haben allerdings während der Evolution die Fähigkeit zur DNA-Reparatur verloren. Stattdessen sind sie als Photorezeptoren beispielsweise für das Hypokotyl-Wachstum in Pflanzen,<sup>[233]</sup> für den zirkadianen Rhythmus in Säugetieren<sup>[234]</sup> und für die magnetische Wahrnehmung in Vögeln und Bakterien zuständig.<sup>[235-236]</sup> Eine Untergruppe, die sogenannten Cry-DASH-Enzyme haben allerdings nur die Fähigkeit zum Flippen verloren, denn sie können CPDs noch in einzelsträngiger DNA (ssDNA) reparieren.<sup>[237-238]</sup> In anderen Cryptochromen, wie Cry1, konnte durch Punktmutation einer konservierten Aminosäure die Reparatur-Aktivität wieder hergestellt werden.<sup>[239]</sup> Auch die wesentlichen Faltungsstrukturen<sup>[237,240-243]</sup> teilen die Cryptochrome mit den Photolyasen, was zugrunde legt, dass sie ähnliche Energie- und Elektronen-Übertragungsstrategien verwenden. Tatsächlich fand man Unterschiede im Redoxpotential des gemeinsamen FAD-Cofaktors. Anstatt eines FADH-Radikals und -Anions bevorzugen die Cryptochrome oxidiertes FAD und ein FADH-Radikal.<sup>[244-245]</sup> Desweiteren identifizierte man vor Kurzem Cryptochrome, welche einen FeS-Cluster binden.<sup>[246-247]</sup> Dieser scheint jedoch nur eine strukturelle oder prüfende Funktion im Protein zu besitzen.

## **1.5. Exkurs: Die Familie der Radikal-SAM-Enzyme**

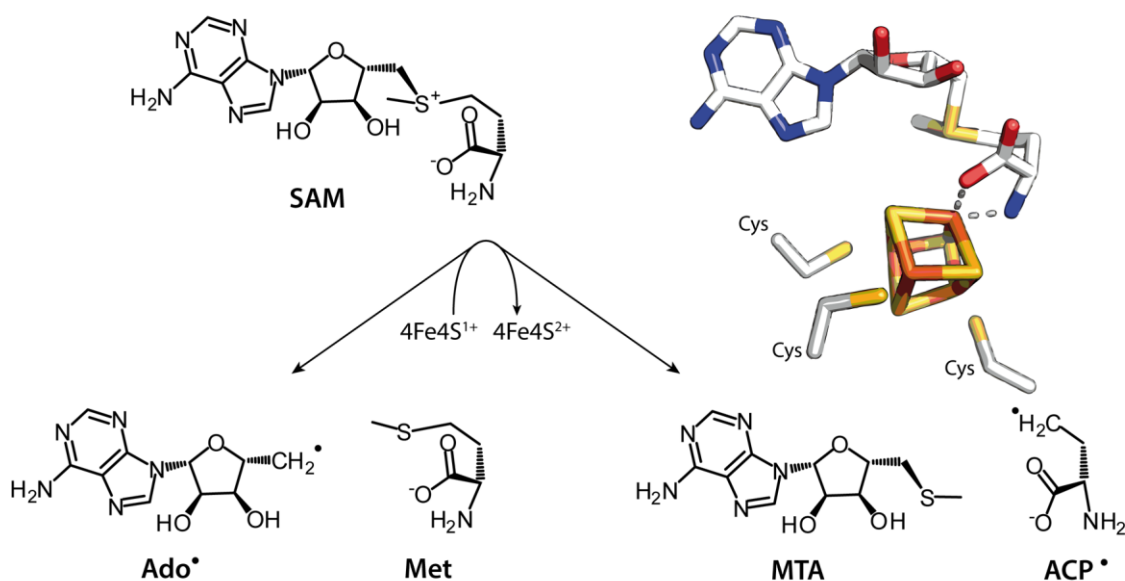
Der Cofaktor *S*-Adenosylmethionin (SAM) war für lange Zeit nur als Quelle einer Methylgruppe bei Methylierungen von beispielsweise DNA oder Neurotransmittern bekannt.<sup>[248]</sup> Dies hat sich

mit der Entdeckung der Radikal-SAM-Enzyme geändert.<sup>[7,249-265]</sup> Mit Anfangs nur einer Handvoll charakterisierter Enzyme und etwa 500 weiterer potentieller Mitglieder,<sup>[266]</sup> hat sich diese Familie mittlerweile zu einem Boom in der Enzymologie entwickelt. Der Grund dafür ist der SAM-Cofaktor, der hier nicht an einer simplen S<sub>N</sub>2-Reaktion beteiligt ist, sondern mit Hilfe eines 4Fe4S-Clusters eine Radikalreaktion an der unaktivierten C-H-Bindung eines Substrats initiiert.<sup>[256]</sup> Die Bandbreite der dabei katalysierten Reaktionen ist enorm und es werden immer weitere potentielle Mitglieder mit neuartigen Reaktionen gefunden.

Nur 20 Jahre nach dem ersten Beweis von Eisen-Schwefel-Verbindungen in Enzymen durch niemand geringeren als *Otto Warburg*<sup>[267]</sup> wurde das erste Radikal-SAM-Enzym, die Lysin-2,3-Aminomutase (LAM),<sup>[268]</sup> charakterisiert. Mit LAM machte sich *Perry Frey* als mitunter erster Entdecker der Radikal-SAM-Enzyme einen Namen.<sup>[249-250,252-253]</sup> Erst 2001 wurden die bis dahin gefundenen Beispiele zu der heute bekannten Enzym-Familie zusammengefasst.<sup>[266]</sup> Diese kann man in drei Subklassen unterteilen,<sup>[256-257,263]</sup> je nachdem auf welche Weise das SAM-Molekül verwendet wird. In der ersten Subklasse finden sich Enzyme, die SAM durch Rückführung des Elektrons vom Produkt-Radikal wieder regenerieren. SAM wird in dieser Gruppe als Cofaktor bezeichnet. Ein wichtiges Beispiel für diese erste Untergruppe ist LAM, welches Lysin in β-Lysin isomerisiert.<sup>[268-269]</sup> Die zweite Subklasse besteht aus Aktivierungs-Enzymen, welche ein Glycyl-Radikal im effektiven Enzym erzeugen. Im aktivierten Zustand können diese Glycyl-Radikal-Enzyme mehrere Zyklen katalysieren. Hier ist das PFL-AE, das Aktivierungs-Enzym (AE) der Pyruvat-Formyl-Lyase (PFL) zur Produktion von Acetyl-CoA aus Pyruvat, zu nennen.<sup>[270-271]</sup> Als letzte Option wird SAM als Cosubstrat verwendet, wie in BioB zur Biosynthese von Biotin.<sup>[272-273]</sup> SAM wird somit nicht wieder regeneriert und die SAM-Spaltung ist irreversibel.

Neben SAM trägt jedes Radikal-SAM-Enzym einen 4Fe4S-Cluster, der von drei Cysteinen an drei Eisenzentren koordiniert wird (*Abbildung 12*).<sup>[266]</sup> Das vierte Eisenatom bleibt unkoordiniert und bildet die Bindestelle des SAM-Moleküls. Ursprünglich fand man diese drei Cysteine in einem konservierten CxxxCxxC-Sequenzmotiv am N-Terminus der Proteine.<sup>[266,274]</sup> In den letzten Jahren wurden jedoch Mitglieder mit abweichenden Sequenzmotiven, teils am C-Terminus, identifiziert. Ein Beispiel ist ThiC aus der Thiamin-Biosynthese mit einem C-terminalen CxxCxxxxC-Motiv.<sup>[275-276]</sup> Auffällig sind auch Proteine, die sich neben diesem gemeinsamen 4Fe4S-Cluster einem weiteren FeS-Cluster bedienen. Meist dienen diese als Schwefel-Quelle für den Einbau in eine unaktivierte C-H-Bindung,<sup>[277-280]</sup> wie bei BioB,<sup>[272-273]</sup> oder als Elektronenakzeptoren während der Katalyse, wie bei AlbA.<sup>[281]</sup> SAM bindet jedoch nur an den Cystein koordinierten 4Fe4S-Cluster. Die Bindung erfolgt über die Carboxylat- und Aminogruppe des

Methionin-Restes in SAM (*Abbildung 12*) und wurde mittels biophysikalischer Methoden charakterisiert.<sup>[282-287]</sup>



**Abbildung 12:** Spaltung von SAM in reaktive Radikalspezies zur Initiation einer Radikalreaktion an unaktivierten C-H-Bindungen. SAM bindet über seine Carboxylat- und Aminogruppe an das freie Eisen des  $4\text{Fe}4\text{S}$ -Clusters, der von drei Cystein-Resten des Radikal-SAM-Enzyms koordiniert wird (rechts). Nach Elektronentransfer vom Cluster zum SAM erfolgt eine homolytische Spaltung zum 5'-Desoxyadenosyl-Radikal ( $\text{Ado}^\bullet$ ) und Methionin (Met) oder zum 3-Amino-3-carboxypropyl-Radikal ( $\text{ACP}^\bullet$ ) und 5'-Methylthioadenosin (MTA). PDB 2A5H

Für die Katalyse wird der  $4\text{Fe}4\text{S}^{2+}$ -Cluster zunächst reduziert mittels zellulärer Elektronentransferproteine, wie Flavodoxin oder Ferredoxin.<sup>[260,262]</sup> Durch die koordinative Bindung kann der reduzierte  $4\text{Fe}4\text{S}^{1+}$ -Cluster ein Elektron an das SAM weiterleiten und so die reduktive Spaltung des SAM-Moleküls vermitteln (*Abbildung 12*). In den meisten, bekannten Radikal-SAM-Enzymen erfolgt die Spaltung zu Methionin und einem reaktiven 5'-Desoxyadenosyl-Radikal ( $\text{Ado}^\bullet$ ), welches eine Analogie zwischen dieser Enzym-Familie und der Familie der Adenosyl-Cobalamin-Enzyme herstellt.<sup>[249-250,258,288]</sup> Wie beim Cluster-Motiv wurden allerdings auch hier Enzyme mit einem alternativen Spaltungs-Mechanismus entdeckt. Diese produzieren nach Reduktion 5'-Methylthioadenosin (MTA) und ein reaktives 3-Amino-3-carboxypropyl-Radikal ( $\text{ACP}^\bullet$ ). Das Aktivierungsenzym der Adenosyl-Cobalamin-unabhängigen Glycerin-Dehydratase ist solch ein Beispiel.<sup>[289-290]</sup> Bislang ist jedoch noch unklar, wie das aktive Zentrum die Orientierung des SAMs kontrolliert, um die richtige Bindung homolytisch zu spalten.

Wie der Cluster die Spaltung von SAM zu  $\text{Ado}^\bullet$  und Met kontrolliert ist dagegen schon weitgehend untersucht. Thermodynamisch betrachtet könnte der  $4\text{Fe}4\text{S}^{1+}$ -Cluster SAM nur mit enormem Energieaufwand reduzieren, da die S-Adenosyl-Bindung mit circa  $251 \text{ kJ mol}^{-1}$  zu stark ist<sup>[250]</sup> und die Redoxpotentiale von freiem SAM (circa  $-1.800 \text{ mV}$ )<sup>[291]</sup> und proteingebundenem

Cluster (circa  $-479\text{ mV}$ )<sup>[292]</sup> zu weit auseinander liegen. Bindet SAM jedoch an den Cluster, löst dies eine Änderung der Cluster-Geometrie aus und das Redoxpotential des Clusters erhöht sich auf  $-430\text{ mV}$ .<sup>[292]</sup> Gleichzeitig erhöht sich das Redoxpotential von SAM aufgrund der Nähe zum Cluster auf  $-990\text{ mV}$ .<sup>[292]</sup> Wird nun das Substrat gebunden, fällt das Redoxpotential des Clusters auf  $-600\text{ mV}$  und die Potentialdifferenz beträgt nur noch  $390\text{ mV}$ .<sup>[293]</sup> Dies entspricht einer Energiebarriere von  $37,7\text{ kJ mol}^{-1}$ .<sup>[293]</sup> Die Berechnung bezieht sich auf den Fall in LAM, in welcher die Schwefelgruppe des SAMs unweit von dem freien Eisen positioniert ist. Dadurch kann ein direkter Elektronentransfer vom freien Eisen zur Schwefelgruppe erfolgen.<sup>[282,287,293]</sup> Mittels zweier Kristallstrukturen von HydE – entweder mit SAM oder mit seinen Spaltprodukten AdoH und Methionin – und gekoppelten Simulationsmodellen konnte das Energieschema aus LAM bestätigt werden.<sup>[294-295]</sup> Die Aktivierungsbarriere im HydE-Enzymsystem beträgt  $54\text{ kJ mol}^{-1}$  und die Gesamtreaktion ist mit  $46\text{ kJ mol}^{-1}$  endergon. Da der Übergangszustand näher am Produkt als am Substrat liegt, ist die nun exergone Rückreaktion begünstigt und SAM kann nach Spaltung wieder regeneriert werden.<sup>[294-295]</sup> Auch wenn in diesem System kein Substrat gebunden ist, liefert dies einen interessanten Einblick in die Spaltungsreaktion. Unter dem Aspekt, dass LAM, und vermutlich auch HydE, SAM als katalytischen Cofaktor verwenden (Klasse I) würde es erklären wieso in BioB (Klasse III) die Spaltungsreaktion mit  $-71\text{ kJ mol}^{-1}$  exergon ist,<sup>[296]</sup> anstatt endergon wie in LAM; SAM wird in BioB nicht regeneriert, wodurch eine endergone Reaktion nicht notwendig erscheint. Da außerdem die Entfernung zwischen freiem Eisen und der Schwefelgruppe des SAMs zu groß für einen direkten Elektronentransfer ist, wird spekuliert, dass der Elektronentransfer in Klasse-II/III-Enzymen zwischen einem Schwefelatom des Clusters und dem SAM erfolgt.<sup>[285-286]</sup>

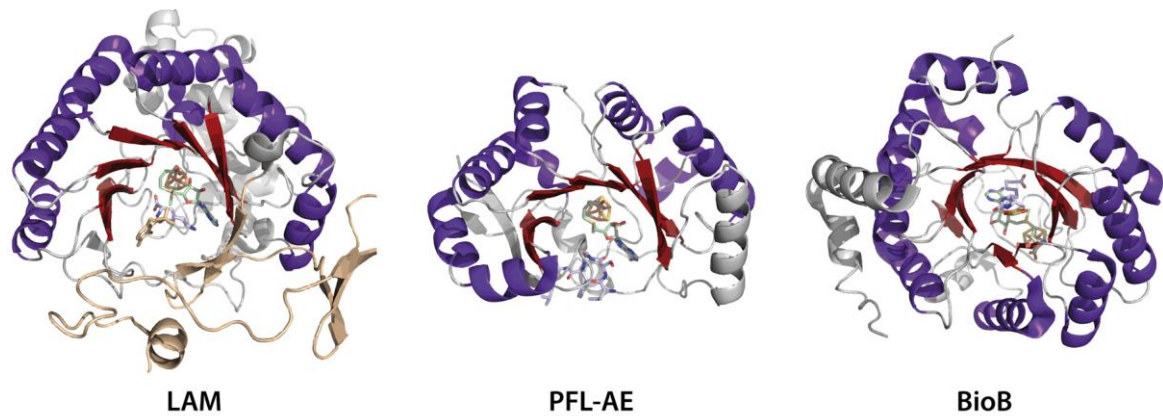
Betrachtet man die beiden Möglichkeiten der Cluster-SAM-Interaktion nach der SAM-Spaltung, so stellt sich heraus, dass Methionin im LAM-System tatsächlich mit seiner Schwefelgruppe zusätzlich an das freie Eisenatom koordiniert,<sup>[282]</sup> während im BioB-System solch eine verstärkte Bindung nicht stattfindet.<sup>[285-286,296-297]</sup> Da die SAM-Spaltung in Klasse-II/III-Enzymen irreversibel ist,<sup>[252]</sup> erscheint es plausibel, dass die Enzyme keinen Aufwand betreiben, um die Spaltprodukte länger als nötig im aktiven Zentrum zu halten. Bei Klasse-I-Enzymen ist dies dagegen essentiell, damit SAM effektiv regeneriert werden kann.

Aus thermodynamischer Sicht ist die feste Bindung der SAM-Spaltprodukte umso wichtiger, da das Ado<sup>•</sup> nur moderat stabil ist.<sup>[16,298]</sup> Substrat-Radikale sind meist wesentlich stabiler, wodurch die Regenerierung des Ado<sup>•</sup> nach erfolgter Reaktion äußerst endotherm wird.<sup>[16,298]</sup> Vermutlich wird die Regenerierung jedoch begünstigt durch die Energie, die im oben genannten Mechanis-

mus nach Rückreaktion zum SAM wieder frei wird, durch stabilisierende Interaktionen zu Proteinresten,<sup>[299-301]</sup> sowie durch Konformationsänderungen.<sup>[269]</sup>

Bei Enzymen aus Klasse III, welche SAM in stöchiometrischen Mengen spalten, ist die Gesamtreaktion stark exotherm.<sup>[16,298]</sup> Allerdings existiert hier das Problem der Produktinhibition.<sup>[263,302]</sup> Die Spaltprodukte von SAM, AdoH und Met, können die Aktivität der Enzyme extrem beeinträchtigen. *In vivo* kann dies mit MTAN (5'-Methylthioadenosin / S-Adenosylhomocystein-Nukleosidase), die unter anderem AdoH zu Adenin abbaut,<sup>[303]</sup> ausgeglichen werden.<sup>[302]</sup> Dadurch erreichen auch Klasse-III-Enzyme eine hohe physiologische Aktivität.<sup>[304]</sup> Zusammenfassend zeigen Klasse-I- und Klasse-II/III-Enzyme charakteristische Eigenschaften, die man sich zunutze machen kann, um die Rolle von SAM im Mechanismus eines neuen Mitglieds zuweisen zu können.

Wie im Mechanismus, teilen die Radikal-SAM-Enzyme auch in der Struktur wesentliche Merkmale. Der globale Aufbau dieser Enzyme besteht aus einem *TIM-Barrel*-Motiv mit zusätzlichen proteinspezifischen Ausläufern.<sup>[262,264-265,305]</sup> In einem *TIM-Barrel* bilden normalerweise acht  $\beta$ -Faltblätter eine Zylinderstruktur, die von weiteren acht  $\alpha$ -Helices umschlossen wird.<sup>[306]</sup> In Radikal-SAM-Enzymen hängt es von der Substratgröße ab, ob ein vollständiges  $(\alpha\beta)_8$ -*Barrel* vorliegt oder nur ein partielles  $(\alpha\beta)_6$ -*Barrel* (Abbildung 13). Bislang überwiegt die Anzahl der  $(\alpha\beta)_6$ -Enzyme,<sup>[307-309]</sup> mit LAM,<sup>[269]</sup> welche Komplexe mit bis zu sechs Untereinheiten bildet, und PFL-AE,<sup>[310]</sup> dessen Substrat das effektive Enzym ist. Nur wenige besitzen ein volles  $(\alpha\beta)_8$ -*Barrel*,<sup>[275,294]</sup> wie BioB,<sup>[273]</sup> die mit Dethiobiotin ein relativ kleines Substrat besitzt. Dieser Ausgleich ist wichtig, damit die Radikal-Intermediate nicht unnötig dem Lösungsmittel ausgesetzt werden, welches die Radikale abreagieren könnte. Zu diesem Zweck verschließen die Enzyme nach der Bindung des Substrats ihre aktiven Zentren entweder durch das sperrige Substrat selbst oder durch eine Konformationsänderung im Enzym.<sup>[265,311]</sup> So lange kein Substrat gebunden ist, ist in den meisten Strukturen das aktive Zentrum jedoch dem Lösungsmittel ausgesetzt.



**Abbildung 13:** Die Strukturen der Radikal-SAM-Enzyme Lysin-2,3-Aminomutase (LAM), Pyruvat-Format-Lyase-Aktivierungsenzym (PFL-AE) und Biotin Synthase (BioB). Die  $\beta$ -Faltblätter der *TIM-Barrel*-Motive sind in Rot und die  $\alpha$ -Helices in Dunkelviolett dargestellt. Der SAM-Cofaktor ist Grün, Pyridoxal-Phosphat Orange und Substrate Hellblau. Der Dimer-bildende Teil von LAM ist in Beige gezeigt. PDB 2A5H, 3CB8 und 1R30

Die Enzyme weisen desweiteren konservierte Sequenzmotive zur Bindung von SAM auf,<sup>[265,305]</sup> wie beispielsweise CxxxCx $\phi$ C. Diese Sequenz bindet nicht nur den 4Fe4S-Cluster, sondern beinhaltet eine aromatische Aminosäure  $\phi$ , die hydrophobe Interaktionen zum Adenin-Rest von SAM herstellt. Die Substratbindestellen sind zwar nicht konserviert, da sie selbstverständlich eine Substratspezifität vermitteln müssen, liegen aber in den meisten Strukturen am C-Terminus und positionieren das Substrat an der seitlichen Öffnung des *TIM-Barrels* (Abbildung 13).<sup>[262]</sup> Bemerkenswert ist auch die Ähnlichkeit der Abstände von C5' in SAM zur jeweiligen, zu aktivierenden C-H-Bindung, die zwischen 3,8 Å in LAM und 4,1 Å in PFL-AE liegen. Ein Vergleich mehrerer Radikal-SAM-Enzymstrukturen konnte außerdem eine potentielle Bindestelle für die Reduktionsfaktoren des Clusters identifizieren.<sup>[262,273,310,312]</sup> Diese befindet sich an der Rückseite des *TIM-Barrels*, dort wo der Abstand von der Oberfläche zum Cluster am geringsten (7–10 Å) ist. Meist wird diese Stelle von dem Cluster-Binde-Loop selbst gebildet.<sup>[262]</sup> Identifizieren lässt sich die Bindestelle durch die hohe Konservierung der Aminosäure-Reste in diesem Bereich innerhalb der Enzym-Gruppe.<sup>[262]</sup> Auffällig ist, dass für die LAM-Gruppe keine solche Bindestelle gefunden werden konnte. Es wird angenommen, dass LAM keine feste Bindestelle benötigt, da es seinen Cluster nach jeder Reaktion in den reduzierten Zustand regeneriert.<sup>[262]</sup> Dies könnte somit ein weiteres Merkmal zur Unterscheidung der drei Klassen sein.

## 1.6. SP-Lyase-vermittelte DNA-Reparatur in bakteriellen Sporen

Ähnlich wie in vegetativen Zellen gibt es in bakteriellen Sporen unterschiedliche Reparaturmechanismen für UV-induzierte DNA-Schäden. Allerdings scheinen sporenbildende Bakterien keine DNA-Photolyasen zu besitzen.<sup>[99]</sup> CPDs, (6–4)-Schäden und Dewar-Schäden können in diesen Bakterien jedoch über die Nukleotid-Exzisions-Reparatur (NER) entfernt werden.<sup>[112,313-314]</sup> Auch der SP-Schaden kann mit der NER repariert werden, doch existiert für diesen speziellen Schaden ein spezifisches Reparatur-Enzym, die Sporen-Photoprodukt-Lyase (SPL).<sup>[315-317]</sup> In den letzten Jahren wurde außerdem ein alternatives Exzisions-Reparatur-Enzym, die YwjD-Endonuklease, identifiziert.<sup>[318]</sup>

Die Wichtigkeit der SPL- und NER-Mechanismen wurde bereits früh in *in-vivo*-Studien erkannt.<sup>[6,316,319]</sup> Wird die Expression von einem der beiden Systeme geblockt, so hat dies nur minimalen Einfluss auf die Reparaturreffizienz. Werden jedoch beide Systeme in den Sporen unterdrückt, so reagieren die Zellen extrem sensitiv gegenüber Sonnenstrahlen, insbesondere UV-C-Strahlung.<sup>[117,320]</sup> Ein kleiner Prozentsatz der angehäuften SP-Schäden wird jedoch repariert, was auf einen dritten Reparaturmechanismus, möglicherweise das YwjD-Enzym, hinweist.<sup>[316,318]</sup> Genauere Untersuchungen ergaben, dass beide Systeme bereits in den Sporen eingelagert sind und während der Keimung in unterschiedlichen Phasen aktiv werden.<sup>[316,321]</sup> Die SP-Lyase beginnt ihre Reparatur sofort nach der Keimungsinitiierung und entfernt einen Großteil der SP-Schäden. Erst zu einem späteren Zeitpunkt, wenn die Zellen bereits in der Wachstumsphase sind, wird die NER aktiv und die Aktivität der SP-Lyase nimmt ab. Die NER ist zudem auf die Vorarbeit der SP-Lyase angewiesen.<sup>[314-315,319]</sup> Da das NER-System langsamer arbeitet,<sup>[115,316]</sup> kann es bei einer geblockten SP-Lyase und enormer SP-Konzentration zu Verzögerungen bis hin zu einem Ausfall der NER kommen.<sup>[316]</sup> Obwohl beide Systeme bereits in den Sporen vorliegen, können sie die Schäden nicht in diesem Stadium entfernen.<sup>[6,316]</sup> Stattdessen sind sie auf Nährstoffe aus der ersten Keimungsphase angewiesen, was darauf hindeutet, dass sie eine exogene Energiequelle benötigen, oder nur unter den Bedingungen eines bestimmten Zellstadiums operieren können.<sup>[6]</sup> Die SP-Lyase, im Gegensatz zur NER, wird nicht in der vegetativen Phase der Zellen exprimiert.<sup>[6,321]</sup> Ihre Aktivität korreliert folglich mit der Präsenz der SP-Schäden.

Obwohl die SP-Lyase, wie die Photolyasen, den SP-Schaden in einer direkten Reaktion zur Dithyminidin-Sequenz repariert<sup>[317,322]</sup> und eine gewisse Sequenzhomologie zu diesen im C-Terminus existiert,<sup>[315]</sup> gehört sie nicht zur Photolyase-Familie. Stattdessen wurde sie anhand des C91xxx C95xx C98-Motivs in *Bacillus subtilis*,<sup>[315,323]</sup> dem daran gebundenen 4Fe4S-Clus-



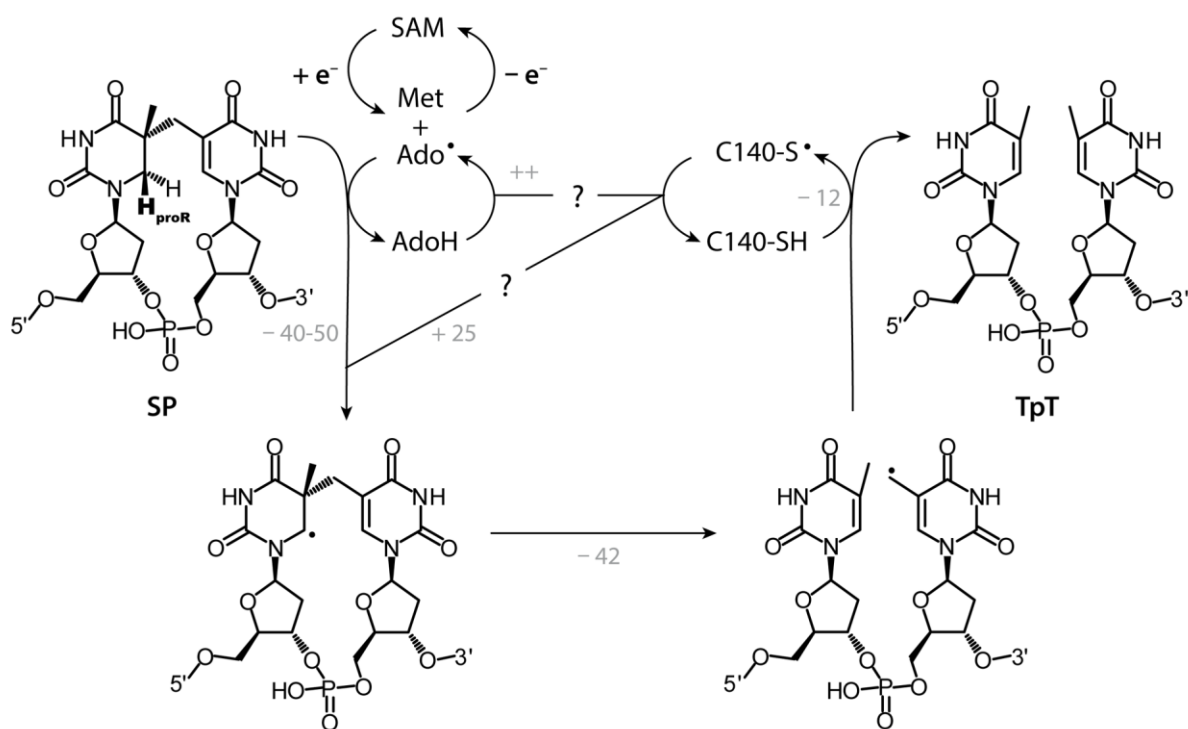
ter<sup>[323-324]</sup> und der Abhängigkeit von SAM, welches in ein 5'-Desoxyadenosyl-Radikal und Methionin gespalten wird,<sup>[9]</sup> als Radikal-SAM-Enzym identifiziert. Als solches ist die SP-Lyase lichtunabhängig<sup>[6,316]</sup> und setzt spezifisch das Sporen-Photoprodukt um. CPDs oder (6-4)-Schäden werden nicht repariert.<sup>[13]</sup> Nach dieser ersten Charakterisierung<sup>[324]</sup> wurde die SP-Lyase aus unterschiedlichen Organismen in *E. coli* überexprimiert. Die Aktivität der isolierten SPL-Varianten weist jedoch eine hohe Sauerstoffempfindlichkeit auf, da der 4Fe4S-Cluster unter O<sub>2</sub>-Atmosphäre in einen 3Fe4S- beziehungsweise einen 2Fe2S-Cluster zerfällt. Für mechanistische Studien wurde deshalb der Cluster durch Zugabe von Eisen(II) und Sulfid-Ionen rekonstituiert<sup>[12-13,325]</sup> oder das Protein unter strikt anaeroben Bedingungen isoliert.<sup>[11,139,326-328]</sup> UV-Vis-, EPR- und Mössbauer-Analysen werden bislang verwendet, um sicher zu stellen, dass der 4Fe4S-Anteil überwiegt.

Lysin-2,3-Aminomutase, das am besten studierte Radikal-SAM-Enzym, bildet in Lösung Dimere, Tetramere und wahrscheinlich Hexamere.<sup>[329]</sup> Bei der SP-Lyase wurde anfangs ebenfalls die Bildung von Dimeren vermutet.<sup>[330]</sup> Allerdings berichteten nur wenige Publikationen von der Isolierung der mutmaßlichen SPL-Dimere.<sup>[9,12]</sup> Andere befürworteten die Monomer-Form der SP-Lyase.<sup>[326]</sup> Diese Uneinigkeit wurde nie direkt geklärt, doch von Dimeren wird mittlerweile nicht mehr berichtet. Auffällig ist, dass die SPL-Dimere lediglich in Extrakten der SP-Lyase vorkamen, in denen auch am C-Terminus proteolytisch-verkürzte SPL-Varianten existierten.<sup>[9,12,149]</sup> Diese konnten tatsächlich als Untereinheit des Dimers identifiziert werden. Es könnte somit angenommen werden, dass die Dimer-Form der SP-Lyase lediglich ein Artefakt der Überexpression ist.

Zur definierten Untersuchung des Reparaturmechanismus der SPL wurden in den letzten Jahren verschiedenste Substrate verwendet, die entweder durch UV-Belichtung oder durch chemische Synthese gewonnen wurden. Die Bandbreite reicht von einfachen SP-Dinukleosiden ohne Phosphat<sup>[137-139]</sup> oder mit Formacetal-Linker,<sup>[141]</sup> über SP-Dinukleosid-Monophosphate (TpT),<sup>[11,13,135,327]</sup> bis hin zu kurzen Oligo-2'-Desoxynukleotiden<sup>[12,140,331]</sup> und Plasmid-DNA.<sup>[10,326]</sup> Die Substrate werden jedoch nicht mit der gleichen Effizienz von der SP-Lyase repariert. Besonders die Umsatzraten mit SP-Dinukleosid ohne Phosphat sind um mindestens eine Größenordnung langsamer als mit Phosphat (TpT). Dies deutet darauf hin, dass das Phosphat zwischen den beiden Nukleosiden wichtig für die Bindung oder die korrekte Ausrichtung des SPs im aktiven Zentrum sein könnte. Auch die DNA-Substrate werden vermutlich besser erkannt, da ihre Umsatzgeschwindigkeit um mindestens zwei Größenordnungen schneller ist als für Dinukleosid-Substrate. Bisher wurden aber noch keine Bindungsstudien veröffentlicht, die dies bestätigen könnten.

Mittels der erfolgreich isolierten SPL-Proteine und den unterschiedlichen SP-Substraten wurde ein potentieller, allerdings noch nicht vollständiger, Mechanismus der SP-Reparatur erarbeitet (Abbildung 14):

Die Katalyse startet wie bei allen Radikal-SAM-Enzymen mit der reduktiven Spaltung von SAM zu Methionin und  $\text{Ado}^\bullet$ .<sup>[9]</sup> Dieses reaktive Radikal abstrahiert im ersten Schritt spezifisch das  $\text{H}_{\text{proR}}$ -Atom an der C6-Position des 5,6-Dihydrothymin-Restes.<sup>[10-11,332]</sup> Isotopen-Markierungsversuchen zufolge ist dies der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Katalyse.<sup>[11]</sup> Dies stimmt mit theoretischen Rechnungen überein, die eine relativ hohe Energiebarriere dieser Reaktion von  $59 \text{ kJ mol}^{-1}$  angeben.<sup>[15]</sup> Die Reaktion *per se* ist jedoch mit  $-40,5$  bis  $-50 \text{ kJ mol}^{-1}$  exotherm.<sup>[15-16,298]</sup> Das entstandene SP-Intermediat-Radikal fragmentiert schließlich in einer erneut exothermen Reaktion (circa  $-42 \text{ kJ mol}^{-1}$ ),<sup>[15]</sup> so dass ein allylisches Produkt-Radikal entsteht.



**Abbildung 14:** Potentieller Reparaturmechanismus der SP-Lyase (Stand 2012). Reaktionsenthalpien<sup>[15-16,298]</sup> sind in  $\text{kJ mol}^{-1}$  in Grau dargestellt. Die mit einem Fragezeichen gekennzeichneten Schritte sind noch nicht geklärt. Theoretisch, jedoch, ist die Reaktion des  $\text{C140-S}^\bullet$  mit AdoH hoch ( $++$ ) und mit SP leicht endotherm ( $+25$ ).

In frühen Tritium-Markierungsversuchen wurde nun von einem erneuten  $^3\text{H}$ -Transfer von AdoH zum Allyl-Radikal berichtet.<sup>[10,326]</sup> Diese Reaktion wäre extrem endotherm ( $50$ – $53 \text{ kJ mol}^{-1}$ ) und mit einer enormen Energiebarriere von  $96 \text{ kJ mol}^{-1}$  langsamer als der erste Schritt,<sup>[15-16,298]</sup> der bereits als geschwindigkeitsbestimmend identifiziert wurde.<sup>[11]</sup> Zudem ist es schwierig zu visualisieren, wie der AdoH-Faktor orientiert sein muss, damit er an einem H-Transfer sowohl von der C6-Position des 5'-Thymin-Restes als auch zur Methylgruppe des 3'-Thymin-Restes beteiligt sein

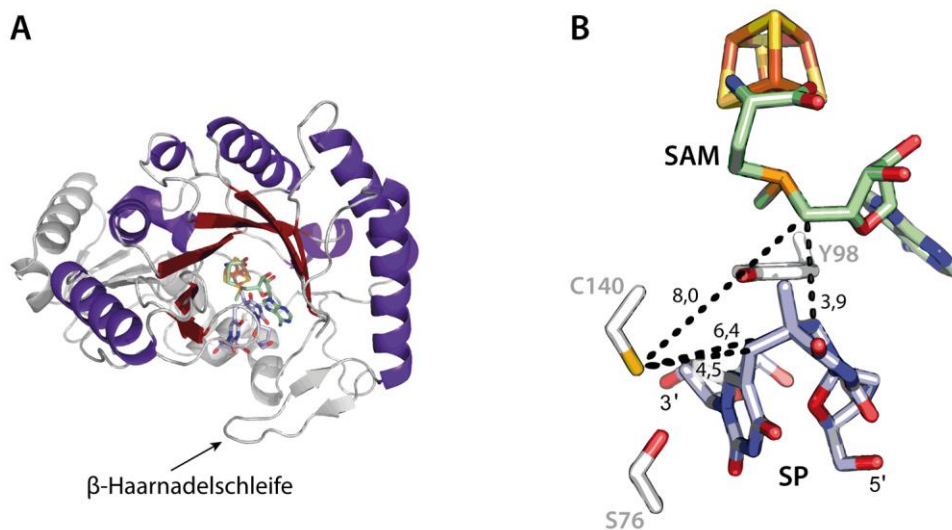
könnte.<sup>[15]</sup> Deuterium-Markierungsversuche widerlegten schließlich diese Theorie<sup>[11,325]</sup> und berichteten stattdessen von einem  $^2\text{H}$ -Einbau in Thymin, wenn die Reaktion in  $\text{D}_2\text{O}$  erfolgte.<sup>[11]</sup> Als mögliche Erklärung des widersprüchlichen Tritium-Experimentes schlug die Gruppe von Lei Li<sup>[11]</sup> vor, dass der erste Schritt der Katalyse reversibel sein könnte. Dies wurde bereits für andere Radikal-SAM-Enzyme berichtet.<sup>[333-334]</sup>

Das  $\text{D}_2\text{O}$ -Experiment spricht für einen Protonen-Austausch der unbekannten H-Quelle des Allyl-Radikals mit Wasser.<sup>[11]</sup> Proteinreste, wie Cystein oder Tyrosin, sind dazu imstande. Mutationsstudien des C141-Restes in *B. subtilis* –SPL (C140 in *Geobacillus*-SP-Lyasen) ließen bereits vorab eine mögliche Beteiligung im Mechanismus vermuten.<sup>[323,325]</sup> Genauere Analysen der Reparaturreaktion mit der C141A-Mutante zeigten, dass TpT-SO<sub>2</sub>-Addukte durch Reaktion des Allyl-Radikals mit dem Cluster-Reduktionsmittel Dithionit entstehen.<sup>[325,328]</sup> Folglich ist es C141, welches ein H-Atom an das Produkt-Radikal überträgt, wodurch ein proteingebundenes Cysteinylnyl-Radikal entstehen sollte. Die Reaktionsenthalpie dieses Prozesses ist mit  $-12 \text{ kJ mol}^{-1}$  erneut exotherm.<sup>[16]</sup> Die anschließenden Schritte sind allerdings noch unklar. Das potentielle Cysteinylnyl-Radikal könnte ein H-Atom von AdoH abstrahieren, um Ado $\cdot$  und letztendlich SAM zu regenerieren. Es ist jedoch zu erwarten, dass diese Reaktion stark endotherm ist, da das Cys $\cdot$  viel stabiler ist als das Ado $\cdot$ .<sup>[16]</sup> Konformationsänderungen oder nachfolgende stark exotherme Reaktionen, wie die Regenerierung von SAM, könnten die Endothermizität herabsetzen und die Reaktion damit begünstigen. Alternativ könnte das Cys $\cdot$  selbst die nächste Katalyse-Runde durch Abstraktion des C6-H einleiten. Diese Reaktion wäre theoretisch mit weniger Energieaufwand verbunden ( $+25 \text{ kJ mol}^{-1}$ ) als die Ado $\cdot$ -Regenerierung.<sup>[16]</sup> Es muss aber in Betracht gezogen werden, dass neben C141 ein weiterer Proteinrest an der Katalyse beteiligt ist.

Zusammenfassend wird SAM in beiden Fällen als vollständiger oder partieller Cofaktor verwendet, indem er den Umsatz mehrerer SP-Moleküle ermöglicht (Klasse-I-Radikal-SAM-Enzyme). Tatsächlich konnten biochemische Studien die Katalyse mehrerer Reparaturzyklen mit nur einem SAM-Molekül beweisen.<sup>[10-11]</sup> Dies schließt die Möglichkeit aus, dass das Radikal-Intermediat im Laufe der Katalyse abreagiert und SAM als Cosubstrat verwendet wird (Klasse III). In den Testansätzen wurde auch eine AdoH-Produktion nachgewiesen.<sup>[11-12,138,326-327]</sup> Dabei kann es sich um einen Hinweis handeln, dass ein Aminosäure-Radikal die Katalyse weiterführt. Es ist aber auch wahrscheinlich, dass es sich um ein Artefakt der *in-vitro*-Bedingungen handelt.

Die Aufklärung der SPL-Struktur mit gebundenem SP-Dinukleosid (*Abbildung 15*) ermöglichte es letztendlich, die Richtigkeit des vorgeschlagenen Mechanismus zu überprüfen.<sup>[8]</sup> Die globale Struktur des aus *Geobacillus thermodenitrificans* stammenden Enzyms besteht, wie für ein Radi-

kal-SAM-Enzym mit großem Substrat zu erwarten ist, aus einem partiellen  $(\alpha\beta)_6$ -TIM-Barrel (Abbildung 15A). Dazu kommen für die SP-Lyase spezifische Domänen am N- und C-Terminus.

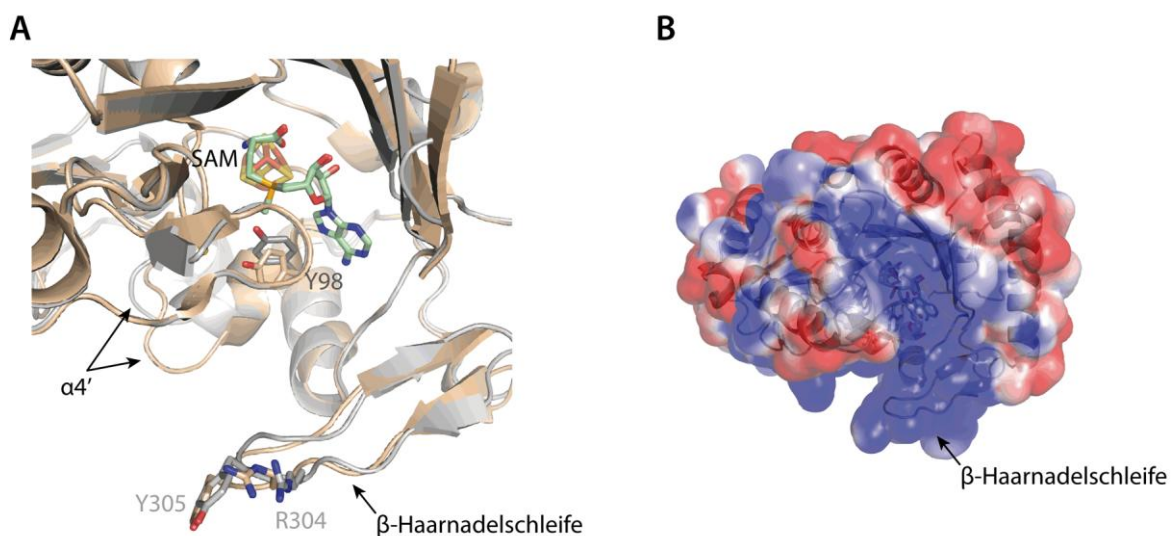


**Abbildung 15:** Globale Struktur (A) und Einblick ins aktive Zentrum (B) der SP-Lyase.  $\beta$ -Faltblätter und  $\alpha$ -Helices des TIM-Barrels sind jeweils in Rot oder Dunkelviolett dargestellt. Der SAM-Cofaktor ist in Grün, Proteinreste in Weiß und das SP in Hellblau gezeigt. Abstände sind in Ångström angegeben. PDB 4FHD

Im aktiven Zentrum bindet SAM, wie erwartet, über seine Carboxylat- und Amino-Gruppe an das freie Eisen des  $4\text{Fe}4\text{S}$ -Clusters und wird über Interaktionen zu benachbarten Aminosäure-Resten stabilisiert; darunter auch Y96, der konservierte aromatische Rest im CxxxCx $\phi$ C-Sequenzmotiv.<sup>[8]</sup> Das SP-Dinukleosid liegt sehr nahe am SAM-Cofaktor und wird dort von einigen Proteinresten gehalten. Der Abstand der C5'-Position in SAM zur C6-Position im 5,6-Dihydrothymine-Rest von SP beträgt, ähnlich wie bei anderen Radikal-SAM-Enzymen, 3,9 Å (Abbildung 15B).<sup>[8]</sup> Der Abstand der Methenyl-Gruppe zur C5'-Position in SAM beträgt 5,3 Å. Da man aber von einer Rotation des 3'-Thymine nach der Spaltung ausgehen muss, kann sich der Abstand so weit vergrößern, dass kein effizienter Elektronen- und H-Transfer mehr möglich ist. C140 (C141 in *B. subtilis*) dagegen liegt mit 4,5 Å tatsächlich in einer optimalen Ausgangsposition zum H-Transfer.<sup>[8]</sup> Die Entfernung zur C5'-Position in SAM ist vom mutmaßlichen C140' mit 8,0 Å jedoch noch größer. Auch der Abstand zur C6-Position des SP ist mit 6,4 Å zu weit und aus dieser Richtung kann C140 nur das falsche, proS H-Atom abstrahieren. Ein direkter H-Transfer zum C140' sollte daher nicht möglich sein. Allerdings befindet sich ein weiterer Aminosäure-Rest in der aktiven Tasche, welcher das Elektron weiterleiten kann: Y98.<sup>[8]</sup> Die Positionierung des Tyrosin-Restes spricht für eine Beteiligung am Katalyse-Mechanismus, doch musste diese erst durch biochemische Studien, wie im Folgenden dargelegt, bewiesen werden. In *Clostridien*-SPL liegt das vierte Cystein nicht an der Position 140, sondern an der Position 76. Tatsächlich befindet sich der Aminosäure-Rest S76 ebenfalls im aktiven Zentrum.<sup>[8]</sup> Man sollte daher mit einer leicht

variieren SPL-Struktur in *Clostridien* rechnen, damit das Cystein wieder optimal für den Katalyse-Mechanismus ausgerichtet ist.

Ein Vergleich der Strukturen vor und nach Bindung des SP-Dinukleosids zeigt Konformationsänderungen (*Abbildung 16A*), die vermutlich mit dem Flippen des SPs in die aktive Tasche einhergehen und letztendlich helfen könnten, die aktive Tasche vom Solvent zu verschließen.<sup>[8]</sup> Die charakteristische  $\beta$ -Haarnadelschleife am C-Terminus der SP-Lyase könnte beispielsweise an der Bindung der DNA beteiligt sein. Unterstützt wird dies von der positiven Ladung in diesem Bereich der Proteinoberfläche (*Abbildung 16B*). Das Protein könnte vor allem die beiden Reste an der Spitze der  $\beta$ -Haarnadelschleife, R304 und Y305, dazu nutzen, den DNA-Duplex zu öffnen.<sup>[8]</sup>



**Abbildung 16:** Faktoren, die bei der DNA-Bindung und dem Flippen des SP-Schadens eine Rolle spielen könnten. **(A)** Nach Bindung des SP-Dinukleosids (Grau) erfolgen Konformationsänderungen in der  $\beta$ -Haarnadelschleife, im  $\alpha 4'$ -Loop und am Y98-Rest. Die Struktur vor der Bindung ist in Beige dargestellt. Das SP-Dinukleosid wurde zur besseren Veranschaulichung weg gelassen. **(B)** Die Oberflächenladung der SP-Lyase. Positiv geladene Bereiche sind in Blau, negativ geladene Bereich in Rot dargestellt. PDB 4FHC und 4FHD

Weitere auffällige Konformationsänderungen finden am  $\alpha 4'$ -Loop und am Y98 statt. Es ist wahrscheinlich, dass sie ebenfalls eine Rolle im Flipp-Mechanismus spielen.<sup>[8]</sup> Genauere Aussagen lassen sich allerdings nur mit einer SPL-Struktur im Komplex mit DNA-Substraten und mit Hilfe von Mutationsstudien treffen. Um einen ersten Eindruck zu erhalten wie DNA gebunden sein könnte, wurde die DNA aus dem (6–4)-Photolyase-Komplex (*Abbildung 11A*) mit, an der SP-Lyase gebundenen, Sulfaten abgeglichen.<sup>[8]</sup> Die Positionen dieser Sulfate stimmen relativ gut mit den Positionen der Phosphate in der (6–4)-DNA überein. Damit kann man den Rückschluss ziehen, dass die SP-Lyasen neben den Photolyasen eine zweite Enzym-Familie darstellen, die ihr Substrat aktiv aus dem DNA-Duplex ins aktive Zentrum flippen.



## 2. Aufgabenstellung

Das erste Ziel dieser Arbeit war es, die Aufreinigungs-Bedingungen der SP-Lyase unter anaerober Atmosphäre, wegen der hohen Sauerstoff-Empfindlichkeit des Enzyms, zu optimieren und das Enzym in hoher Reinheit (> 90%) für Aktivitäts- und Kristallisationsstudien zu erhalten. Um zu analysieren, in wie weit zwischen den beiden verwendeten SPL-Varianten aus *Geobacillus stearothermophilus* und *Geobacillus thermodenitrificans* ein Unterschied besteht, sollten die beiden Enzyme in ihrer Beschaffenheit und Aktivität verglichen werden.

Bislang sind unterschiedliche Substrate für die SPL-Reaktion verwendet worden. Die Umsatzraten unterschieden sich jedoch im Bereich von vier bis fünf Größenordnungen.<sup>[10-13,138-139,141,326-327]</sup>

Die schlechteste Aktivität wurde mit SP-Dinukleosid-Substraten gemessen.<sup>[138]</sup> Kurze DNA-Stränge mit einem SP-Dinukleosid-Schaden wurden allerdings noch nicht näher als Substrat charakterisiert. Um zu bestimmen, in wie weit der Umsatz des SP-Dinukleosids verbessert werden kann, wenn es in kurze DNA-Stränge eingebaut ist, sollte die Charakterisierung der katalytischen Eigenschaften der SP-Lyase und SP-dsDNA-Substrat mit Hilfe von geeigneten Messmethoden erfolgen und mit bisherigen Umsatzraten verglichen werden. Darunter zählen die Bestimmung der  $K_m$ - und  $k_{cat}$ -Werte sowie der AdoH-Produktion.

Der Katalyse-Mechanismus der SP-Lyase war bislang noch nicht vollständig geklärt. Vor allem konnte eine mögliche Beteiligung des Y98-Restes im aktiven Zentrum noch nicht nachgewiesen werden. Deshalb sollten mechanistische Studien zur weiteren Aufklärung des Katalyse-Mechanismus durchgeführt werden. Dazu zählen Mutationsstudien mit C140 und Y98 sowie spektroskopische Studien mittels UV-Vis und EPR um die potentielle Beteiligung organischer Radikale an der Katalyse nachzuweisen. Anhand der Messergebnisse sollte der bisherige SPL-Mechanismus aktualisiert werden.

Letztendlich sollten Kristallisationsstudien mit der SP-Lyase und dsDNA zum besseren Verständnis des Schadens-Erkennungs-Mechanismus und des Flipp-Mechanismus des Sporen-Photoprodukts ins aktive Zentrum durchgeführt werden. Zusätzlich sollte versucht werden Informationen zu diesem Zweck auch durch eine andere Herangehensweise, wie zum Beispiel Bindungsstudien und weiteren Mutationsstudien, zu erreichen.





### 3. Ergebnisse und Diskussion

#### 3.1. Charakterisierung der SP-Lyase und ihrer Mutanten

Am Anfang dieser Arbeit wurde mit der Sporen-Photoprodukt-Lyase aus *Geobacillus stearothermophilus* (*B.st.* –SPL wegen der früheren Benennung als *Bacillus stearothermophilus*) gearbeitet, mit der das SPL-Projekt in der *Carell*-Gruppe von *Dr. J. Carsten Pieck* begonnen wurde.<sup>[149]</sup> Aufgrund der geringen Proteinausbeuten, die für bestimmte Enzym-Analysen nicht ausreichten, und zum besseren Vergleich zu der bereits publizierten SPL-Struktur<sup>[8]</sup> wurde zudem die SP-Lyase aus *Geobacillus thermodenitrificans* (*G.tn.* –SPL) exprimiert. Die Verwendung zweier Proteine aus ungleichen Organismen ist normalerweise problematisch, da sie unterschiedlich agieren könnten. Im Folgenden soll jedoch gezeigt werden, dass sie sich in ihrer Sequenz und Struktur nur minimal unterscheiden, was nur geringfügigen Einfluss auf ihre Aktivität hatte, wie im darauffolgenden Kapitel dargelegt wird.

##### **Sequenzvergleich und Vorkommen der SPL-Familie**

Bislang wurden SP-Lyasen nur aus den Bacilli-Gattungen *B. subtilis*,<sup>[315]</sup> *Geobacillus stearothermophilus* (*B.st.*)<sup>[12]</sup> und *Geobacillus thermodenitrificans* (*G.tn.*)<sup>[8]</sup> sowie aus *Clostridium acetobutylicum*<sup>[327]</sup> isoliert und analysiert. In einem BLAST-Vergleich der Aminosäure-Sequenzen, ausgehend von der *B.st.* –SPL-Sequenz über die Protein-Datenbank NCBI, konnten noch viele weitere Organismen gefunden werden, die eine potentielle SP-Lyase besitzen (*Tabelle 1*). Die meisten dieser Vertreter gehören zum Stamm der Firmicutes, zu dem vorwiegend Bacillus- und Clostridien-Arten zählen. Firmicutes sind Gram-positive Bakterien, von denen viele Endosporen bilden können.<sup>[335]</sup> Dies korreliert mit der überwiegenden Bildung des SP-Photoschadens in bakteriellen Sporen.<sup>[5]</sup> Allerdings konnten SP-Photoschäden auch in UV-bestrahlten *Mycobacterium parafortuitum* Zellen, die sich in der Luft bei einer relativen Feuchtigkeit von 20–40% befanden, gefunden werden.<sup>[125]</sup> Tatsächlich findet sich im Sequenzvergleich eine potentielle SP-Lyase für Mycobakterien – zwar noch nicht für *M. parafortuitum*, doch für einige andere Vertreter, wie *M. chubuense* (*Tabelle 1*). Diese gehören zum Stamm der ebenfalls Gram-positiven Actinobakterien und wurden lange Zeit als nicht-sporulierende Bakterien eingestuft.<sup>[335]</sup> Interessanterweise wurde vor Kurzem jedoch entdeckt, dass Mycobakterien, wie andere Mitglieder der Actinobakterien, zur Sporulation fähig sind.<sup>[336]</sup> Es gibt indes noch weitere Beispiele ungewöhnlicher, aber nicht-sporulierender Organismen, die eine potentielle SP-Lyase aufweisen. Unter den Actinobakterien findet sich beispielsweise auch *Kineococcus radiotolerans*, welches unter normalerweise tödlicher, radioaktiver Strahlung wächst.<sup>[337]</sup> Auch Vertreter der Cyanobakterien, wie die

Blaualge *Cyanothece sp.* besitzen ein Homolog zur SP-Lyase. Am faszinierendsten ist der Fund einer potentiellen SP-Lyase in Rickettsien. Diese gehören zum Stamm der Gram-negativen Proteobakterien und leben ausschließlich als intrazelluläre Parasiten in eukaryotischen Wirtszellen.<sup>[338]</sup> Die einzige Gemeinsamkeit der *Rickettsia*-Gattungen zu den definitiven Sporenbildnern ist ihre Aktivität als Krankheitserreger. *Rickettsia rickettsii* verursacht beispielsweise das Rocky-Mountain-Fleckfieber; Vertreter der Firmicutes verursachen Anthrax (*B. anthracis*), Botulismus (*C. botulinum*) und Tetanus (*C. tetani*).

**Tabelle 1:** Klassifikation der *Geobacillus*-Gattung mit Beispiel-Organismen zu den einzelnen Systematikstufen. Diese besitzen einem BLAST-Sequenz-Vergleich zufolge eine potentielle SP-Lyase. Die Organismen, deren SP-Lyase bereits isoliert und analysiert wurde, sind in fett hervorgehoben.

Systematik	Beispiele
<i>Geobacillus</i> -Gattung	<b><i>Geobacillus stearothermophilus</i> (B.st.),</b> <b><i>Geobacillus thermodenitrificans</i> (G.tn.)</b>
Bacillaceae-Familie	<i>Bacillus thuringiensis</i> , <i>Bacillus anthracis</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <b><i>Bacillus subtilis</i></b>
Bacillales-Ordnung	—
Bacilli-Klasse	—
Firmicutes-Stamm	<b><i>Clostridium acetobutylicum</i></b> , <i>Clostridium perfringens</i> , <i>Clostridium botulinum</i> , <i>Clostridium difficile</i> , <i>Clostridium tetani</i>
Bakterien-Reich	<i>Mycobacterium chubuense</i> , <i>Kineococcus radiotolerans</i> , <i>Cyanothece sp.</i> , <i>Rickettsia rickettsii</i>

SPL-Homologe in Eukaryoten oder Archaeen konnten in der Sequenz-Analyse nicht identifiziert werden. Dies legt nahe, dass die Wahrscheinlichkeit der SP-Produktion in diesen Organismen sehr gering ist, wodurch sie das *spl*-Gen verloren haben könnten. Nicht-sporulierende Bakterien können, wie gezeigt, Homologe der SP-Lyase besitzen. Diese Überbleibsel der Evolution könnten noch immer eine Funktion in den Bakterien inne haben. Ob diese jedoch eine DNA-Reparatur-Funktion ist, bleibt abzuwarten bis die ersten Exemplare isoliert und charakterisiert werden. In diesem Zusammenhang wäre es sicherlich interessant zu verfolgen, ob die DNA-Photoaktivierung zum SP-Schaden in solchen Organismen unter bestimmten Bedingungen, wie geringer Luftfeuchtigkeit,<sup>[125]</sup> möglich ist.

Hier soll allerdings nur ein direkter Sequenzvergleich einiger Exemplare betrachtet werden. Die Sequenzen der beiden *Geobacillus*-Gattungen, einiger *Bacillus*- und *Clostridium*-Gattungen sowie von *Rickettsia rickettsii* und *Cyanothece sp.* wurden in einem *Alignment* gegenübergestellt (Appendix 1). Daraus zeigt sich eine hohe Sequenz-Konservierung besonders im 4Fe4S-Cluster-

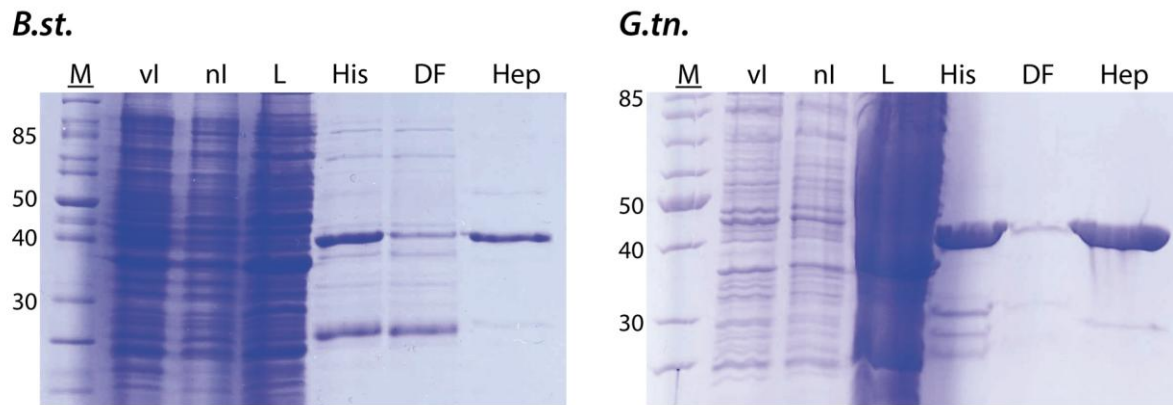
Motiv (C90xxxC94xxC97 in *Geobacillus*-SPL). Auch die beiden flankierenden Tyrosin-Reste (Y96 und Y98 in *Geobacillus*-SPL) sind in allen SPL-Varianten zu finden. Das am Mechanismus beteiligte Cystein (C140 in *Geobacillus*-SPL) ist konserviert, doch in *Clostridien*-SPL durch ein Alanin ersetzt. Wie zuvor in der Einleitung beschrieben, könnte in dieser Klasse der SPL-Familie das Cystein an Position 76 die Rolle als H-Donor übernehmen. Für die Funktion der spezifischen DNA-Reparatur ebenso wichtig ist die SP-Bindestelle, die aus der SPL-Struktur identifiziert werden konnte.<sup>[8]</sup> Die beteiligten Aminosäure-Reste sind ebenfalls hoch konserviert. Überraschenderweise sind diese mechanistischen Funktions-Motive auch in der SPL-Sequenz aus den nicht-sporulierenden Bakterien präsent. Eine mögliche SP-Reparatur-Aktivität sollte für diese ungewöhnlichen SPL-Familien-Mitglieder somit nicht ausgeschlossen werden.

Die Sequenzen der beiden *Geobacillus*-SPL-Varianten, die in dieser Arbeit exprimiert wurden, weisen eine sehr hohe Sequenzhomologie auf. Nur ein entscheidender Unterschied kann in einem der Oberflächen-Reste gefunden werden. In Position 325 liegt in der *B.st.* -SPL ein fünftes Cystein, welches in keiner der anderen SPL-Arten zu finden ist.

### **Expression und Proteinaufreinigung der SP-Lyase**

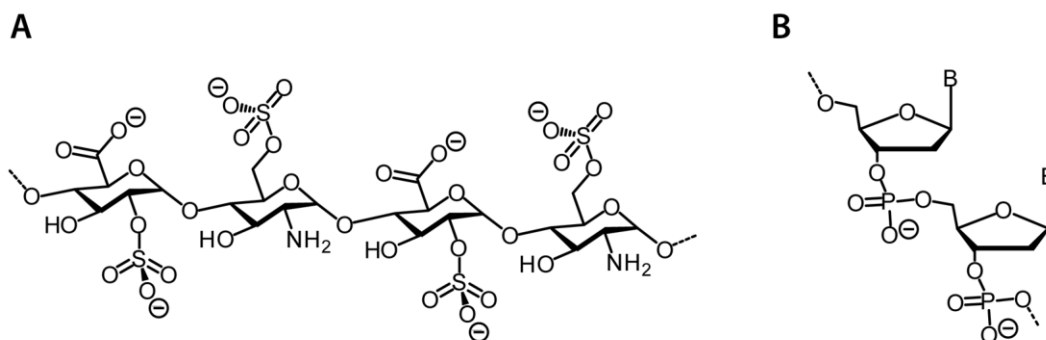
Die beiden *spl*-Gene aus *G. stearothermophilus* und *G. thermodenitrificans* wurden entweder in das pDEST17- (pDEST17\_*B.st.*\_SPL, S. 119) oder in das pET28a-Expressionsplasmid (pET28a\_*G.tn.*\_SPL, S. 121) kloniert. Die Expressionsbedingungen in *E. coli* wurden im Laufe der Doktorarbeit optimiert. Die optimierten Konditionen sind im Experimentaltail (*Kapitel 4.3*) beschrieben. Um die Proteine mit > 90% Reinheit für enzymatische Analysen zu erhalten, wurde eine gekoppelte Aufreinigungsstrategie aus einer His<sub>6</sub>-Affinitäts-Chromatographie (AC) zur Isolierung aus Zell-Lysaten und einer Heparin-Affinitäts-Chromatographie zur zusätzlichen Reinigung gewählt. Diese Kombination konnte die SP-Lyase erfolgreich von den meisten Verunreinigungen trennen, so dass sie mit einer Reinheit > 95% vorlag (*Abbildung 17*, „Hep“).

In der Charakterisierung der *B.st.* -SPL von Dr. J. Carsten Pieck<sup>[12,149]</sup> wurde von SPL-Dimeren und proteolytisch verkürzten Varianten berichtet. Die potentiellen SPL-Dimere waren dabei so stabil, dass kein Reduktionsmittel in den SDS-Gelen sie trennen konnte.<sup>[12,149]</sup> Auch in dieser Arbeit wurden für *B.st.* -SPL Proteinbanden < 30 kDa in dem His<sub>6</sub>-AC-Eluat im SDS-Gel gefunden (*B.st.*, „His“, *Abbildung 17*). Die entsprechenden Banden wurden aus dem Gel ausgeschnitten, tryptisch verdaut und mittels LC-MS/MS analysiert.<sup>[339]</sup> Damit konnte bestätigt werden, dass es sich um SPL-Peptide handelte, die am C-Terminus verkürzt waren.<sup>[339]</sup>



**Abbildung 17:** SDS-PAGE von Proben der verschiedenen Expressions- und Aufreinigungsschritte der SPL-Proteine aus *G. stearothermophilus* (*B.st.*) und *G. thermodenitrificans* (*G.tn.*). M: Protein-Standard, vl: vor Induktion der Proteinexpression, nl: nach Induktion der Proteinexpression mit IPTG, L: Lyse-Lösung, His: His<sub>6</sub>-AC-Eluat, DF: Durchfluss der Heparin-AC, Hep: Heparin-AC-Eluat.

Proteinfragmente > 50 kDa, die für ein potientes SPL-Dimer, wie bei *Dr. J. Carsten Pieck*,<sup>[12,149]</sup> sprechen könnten, tauchten nur als sehr schwache Banden in dem His<sub>6</sub>-AC-Eluat im SDS-Gel auf (*B.st.*, „His“, *Abbildung 17*). Es war nicht möglich, die Proteinsequenz dieser Banden mittels tryptischem Verdau zu identifizieren, da die Banden zu schwach waren und so eine zu geringe Proteinkonzentration für den Verdau vorlag. Sowohl die Banden der verkürzten SP-Lyase als auch die Banden > 50 kDa konnten durch die Heparin-AC von der monomeren SP-Lyase (~ 42 kDa) abgetrennt werden. Dies zeigte, dass der C-Terminus der SP-Lyase vermutlich essentiell für die Bindung von DNA sein könnte, da die Verkürzung nicht mehr an die DNA-ähnliche Struktur des Heparins (*Abbildung 18*) binden konnte.



**Abbildung 18:** Strukturen von Heparin (**A**) und einzelsträngiger DNA (**B**). B: beliebige Nukleobase.

Die Banden > 50 kDa könnten, wie zuvor berichtet,<sup>[9,12,149]</sup> Dimere aus den verkürzten SP-Lyasen sein, denen nun ebenfalls der C-terminale Proteinteil fehlen könnte und sie daher nicht mehr an Heparin binden könnten. Andererseits könnte es sich hier auch nur um, aus der Aufreinigung stammende, *E. coli*-Proteine handeln.

In den Proben der *G.tn.* –SPL zeigten sich nach den Aufreinigungsschritten keine Proteinfragmente > 50 kDa in den SDS-Gelen (*G.tn.*, „His“ und „Hep“, *Abbildung 17*). Proteinfragmente < 30 kDa konnten in dem His<sub>6</sub>-AC-Eluat beobachtet werden, wurden diesmal jedoch nicht mit tryptischem Verdau analysiert, da sie in der Heparin-AC erneut abgetrennt werden konnten.

In dieser Arbeit konnten somit keine SPL-Dimere, wie von *Dr. J. Carsten Pieck* berichtet,<sup>[12,149]</sup> identifiziert werden. Da die SP-Lyase in der Kristallstruktur kein Dimer bildete<sup>[8]</sup> und keine speziellen Domänen, wie in LAM (*Abbildung 13*), zur Dimerisierung vorliegen (*Abbildung 15*),<sup>[8]</sup> wurde im Weiteren angenommen, dass die Sporen-Photoprodukt-Lyase, genau wie die DNA-Photolyasen, ein monomeres Enzym sei.

Die Isolierung hoher Ausbeuten der *B.st.* –SPL war sehr schwierig, da die verkürzten SPL-Varianten zu gleichem und oft sogar zu einem größeren Anteil entstanden. Mit der Optimierung der Expressions-Bedingungen konnten viele Verbesserungen erzielt werden. Dennoch blieb die Ausbeute sehr unzuverlässig und sehr gering. Da vermutet wurde, dass dieser Effekt mit dem Oberflächen-Cystein der *B.st.* –SPL korrelieren könnte, wurde die Expression der *G.tn.* –SPL mit tatsächlich größerem Erfolg gestartet. Bereits nach der His<sub>6</sub>-AC lag das Protein zu ~ 90% rein vor (*Abbildung 17*). Auch die Ausbeuten verbesserten sich bei der *G.tn.* –SPL. Mit der optimierten Expressionsstrategie (*Kapitel 4.4*) wurden Ausbeuten von maximal 0,5 mg pro Liter Expressionsmedium für *B.st.* –SPL, für *G.tn.* –SPL jedoch bis zu 4 mg pro Liter Expressionsmedium erreicht. Bei einem Expressionsansatz von vier Litern, der für gewöhnlich aufgereinigt wurde, entsprach dies einer Vervielfachung der SPL-Menge um einen Faktor > 7. Aus diesem Grund wurde für Experimente mit hohem SPL-Konzentrationsbedarf (Kristallisation, EPR) die *G.tn.* –SPL gewählt.

Zusätzlich zu den Wildtyp-Varianten der SP-Lyase wurden auch Aktivitätsmutanten (Y98F, C140A, C140G) der *B.st.* –SPL sowie *G.tn.* –SPL (*Kapitel 3.3*) und Flipp-Mutanten (L103G, R273A, R280A, K301A, K309A, R304A, Y305F, Y339F) der *G.tn.* –SPL (*Kapitel 3.5*) exprimiert. Die Ausbeuten variierten sehr stark zwischen 50 µg und 2,4 mg pro Liter Expressionsmedium. Dies könnte mit der strukturellen Stabilität der einzelnen Mutanten zusammen hängen.

### **Charakterisierung des 4Fe4S-Clusters**

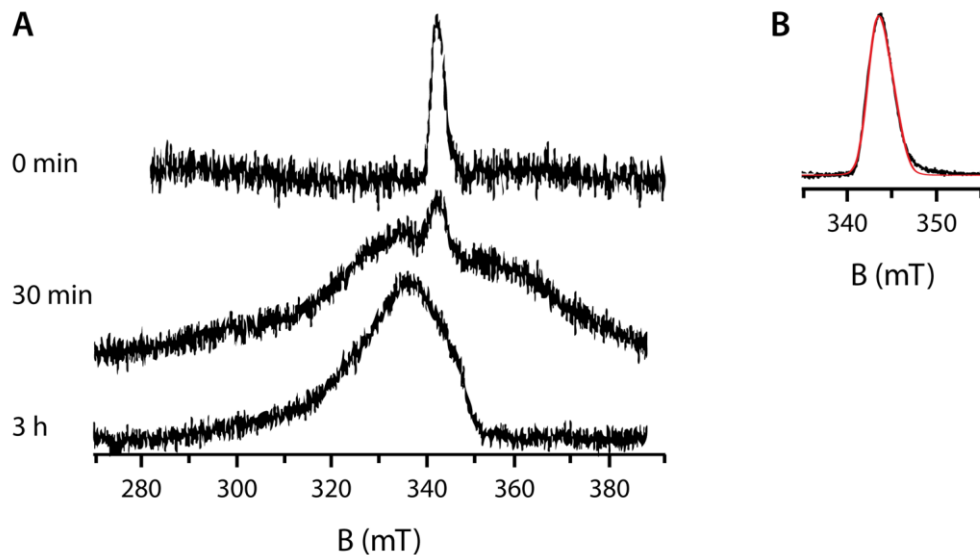
Die SP-Lyase aus *G. stearothermophilus* wurde in allen Analysen in seiner nativen Form, ohne Rekonstitution des 4Fe4S-Clusters nach der Isolierung, verwendet. Die *G.tn.* –SPL wurde für die Experimente mit hohem Konzentrationsbedarf (Kristallisation, EPR) jedoch mit vollständigem

4Fe4S-Cluster benötigt und deshalb zum Großteil rekonstituiert. Die native Form wurde nur verwendet, um sie mit der *B.st.* –SPL bezüglich Konformation und Aktivität zu vergleichen, da solche Vergleichsanalysen unter exakt gleichen Bedingungen durchgeführt werden sollten. Weiterführende Versuche mit der *G.tn.* –SPL fanden aus praktischen Gründen ebenfalls mit rekonstituiertem Cluster statt. Eine direkte Gegenüberstellung der nativen und rekonstituierten SPL-Varianten in Lösung ist in *Abbildung 19* dargestellt. Die braune Farbe der SPL-Lösung vertiefte sich nach Rekonstitution ins Schwarz-Braune (*Abbildung 19B*). Bestätigt werden konnte dies durch die Messung des Eisen- und Schwefel-Gehalts der SPL-Lösungen. Native *B.st.* –SPL wies mit  $1,7 \pm 0,4$  Fe und  $1,5 \pm 0,0$  S<sup>2-</sup> pro Monomer eine vermeintliche 4Fe4S-Cluster-Beladung von circa 37,5% auf. Auch die *G.tn.* –SPL war zu annähernd 37,5% mit Clustern beladen, doch überwiegte mit  $1,5 \pm 0,0$  Fe und  $2,2 \pm 0,1$  S<sup>2-</sup> womöglich der 3Fe4S-Anteil anstatt dem 4Fe4S-Anteil, der durch Oxidation des 4Fe4S-Clusters gebildet werden kann.<sup>[340]</sup>



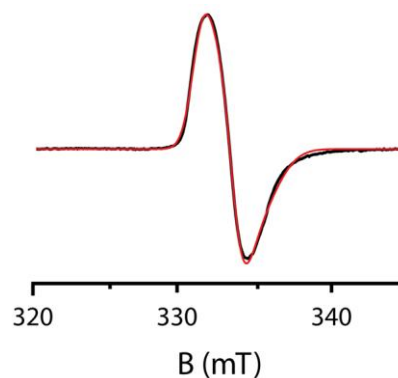
**Abbildung 19:** Vergleich von nativ isolierter (A) und rekonstituierter (B) SPL-Lösung.

Eine EPR-Messung und -Simulation (*Abbildung 20*) zeigte, dass auch in der nativen *B.st.* –SPL die Cluster zunächst in der 3Fe4S-Form vorlagen. Nach Reduktion mit Dithionit nahm das scharfe Signal ab und es erschien ein neues, breiteres Signal, welches dem 4Fe4S<sup>1+</sup>-Cluster entsprechen könnte. Vermutlich entstehen die 3Fe4S-Cluster durch milde Oxidation während der Expressions- oder Aufreinigungsprozedur, wodurch das vierte Eisen am Protein hängen bleiben könnte. Solch ein Effekt konnte bereits in dem PFL-Aktivierungsenzym beobachtet werden.<sup>[341]</sup> Der Anteil des freien, doch proteinkoordinierten Eisens schien in der *B.st.* –SPL damit höher zu sein als in der *G.tn.* –SPL. Nach Rekonstitution relativierte sich dieser Unterschied jedoch und die Cluster-Beladung in der *G.tn.* –SPL erreichte circa 99% mit  $3,9 \pm 0,6$  Fe. Die Methylenblausynthese-Reaktion zur spektroskopischen Bestimmung des Schwefel-Gehalts wurde nach Rekonstitution des Proteins allerdings gestört (SPL-Probe:  $2,4 \pm 0,3$  S<sup>2-</sup> und SPL & Sulfid-Kontrolle:  $0,9 \pm 0,1$  S<sup>2-</sup>, vergleiche S. 133) so dass kein zuverlässiger Wert des Schwefel-Gehalts angegeben werden konnte.



**Abbildung 20:** 2-Puls-Hahn-Echo EPR-Messungen der SP-Lyase bei 10 K **(A)** und entsprechende Simulation **(B)**. Die Messungen wurden von *Lorenz Heidinger* (Universität Freiburg) durchgeführt. In den Ansätzen wurden 140  $\mu\text{M}$  *B.st.* –SPL mit jeweils 5 mM Dithionit in 50 mM HEPES, 300 mM NaCl und 5% Glycerol (pH 7,5) für 30 min und 3 h bei 35 °C reduziert. In den 0-min-Ansatz wurde kein Dithionit hinzugefügt. Die Simulation erfolgte mit einer genaueren Messung des 0-min-Ansatzes. Der g-Tensor der Simulation passt mit [2,025; 2,025; 2,007] zu einem 3Fe4S-Cluster.<sup>[342]</sup> Die Simulation des 3-h-Ansatzes wurde noch nicht durchgeführt. Temperatur: 10 K; Mikrowellen-Frequenz:  $\sim 9,72$  GHz; Mikrowellen-Leistung: 0–3 dB. *B* = Magnetische Feldstärke in Milli-Tesla (mT)

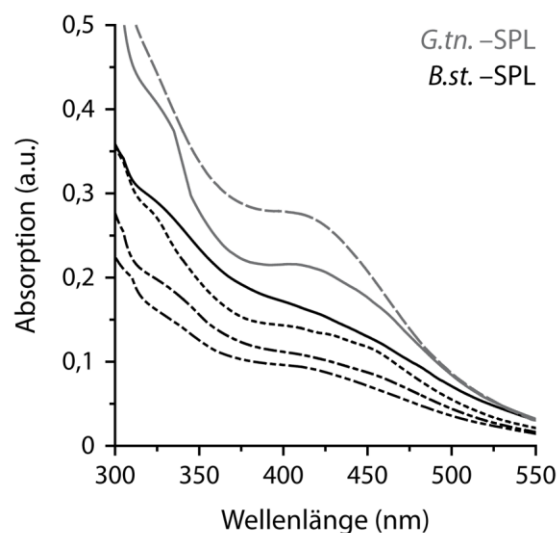
Ein *Continuous-Wave*-EPR-Spektrum mit Simulation konnte zeigen, dass die Cluster auch nach Rekonstitution in der SP-Lyase als 3Fe4S-Cluster vorlagen (*Abbildung 21*). Da das Protein zu 99% mit Fe beladen war, könnte das vierte Eisen des Clusters erneut proteinkoordiniert, doch nicht Cluster-gebunden sein. Ein EPR-Spektrum mit entsprechender Simulation nach Reduktion des rekonstituierten Proteins, ähnlich wie in *Abbildung 20*, wurde noch nicht gemessen.



**Abbildung 21:** *Continuous-Wave*-EPR-Messung der rekonstituierten *G.tn.* –SPL **(Schwarz)** und entsprechende Simulation **(Rot)**. Die Messung wurde von *Lorenz Heidinger* (Universität Freiburg) durchgeführt. 140  $\mu\text{M}$  *G.tn.* –SPL in 50 mM HEPES, 300 mM NaCl und 5% Glycerol (pH 7,5). Der g-Tensor der Simulation passt mit [2,027; 2,014; 2,003] zu einem 3Fe4S-Cluster. Temperatur: 15 K; Mikrowellen-Frequenz:  $\sim 9,40$  GHz; Mikrowellen-Leistung: 33 dB. *B* = Magnetische Feldstärke in Milli-Tesla (mT)

Eine weitere Methode zur Charakterisierung von FeS-Clustern ist die UV-Vis-Spektroskopie. Die Ergebnisse der Messungen mit nativer oder rekonstituierter Wildtyp-SPL sind in *Abbildung 22*

gezeigt. In den nativen Proteinen zeichneten sich ein charakteristischer Cluster-Peak bei 420 nm und ein zusätzlicher Peak bei 325 nm ab. Beide Signale könnten einem  $4\text{Fe}4\text{S}^{2+}$ -, allerdings auch einem  $3\text{Fe}4\text{S}$ -Cluster zugewiesen werden.<sup>[342]</sup> Das Cluster-Signal bei 420 nm war in der *B.st.* –SPL relativ klein, da keine vollständige Beladung, wie oben gezeigt wurde, vorlag. Zusätzlich wurden die Aktivitätsmutanten der *B.st.* –SPL untersucht. Diese wiesen nur geringe Unterschiede zum Wildtyp auf. Das Signal der nativen *G.tn.* –SPL war etwas besser ausgeprägt, da hier die Proteinkonzentration etwas höher war. Der Unterschied zum rekonstituierten Protein ist wiederum deutlich erkennbar. Der 420-nm-Peak war nach Rekonstitution signifikanter ausgeprägt, wodurch die Konzentration des Clusters etwas höher als im nativen Protein zu sein schien. Dies deutete, wie zuvor die Messung des Eisen-Gehalts, auf eine vollständigere Clusterbeladung hin. Das Signal bei 325 nm war allerdings nicht mehr so stark ausgeprägt. Dies könnte aus der Bindung eines vierten Eisens nach der Rekonstitution resultieren.



**Abbildung 22:** UV-Vis-Spektren von Wildtyp-SPL und SPL-Aktivitätsmutanten. Je  $2 \text{ g L}^{-1}$  *B.st.* –SPL (**Schwarz**) Wildtyp (—), C140A (---), Y98F (---) und C140G (---) sowie  $3 \text{ g L}^{-1}$  *G.tn.* –SPL Wildtyp (**Grau**) nativ (—) und nach Rekonstitution (---). Die Messung erfolgte in 50 mM HEPES, 300 mM NaCl und 5% Glycerol (pH 7,5)

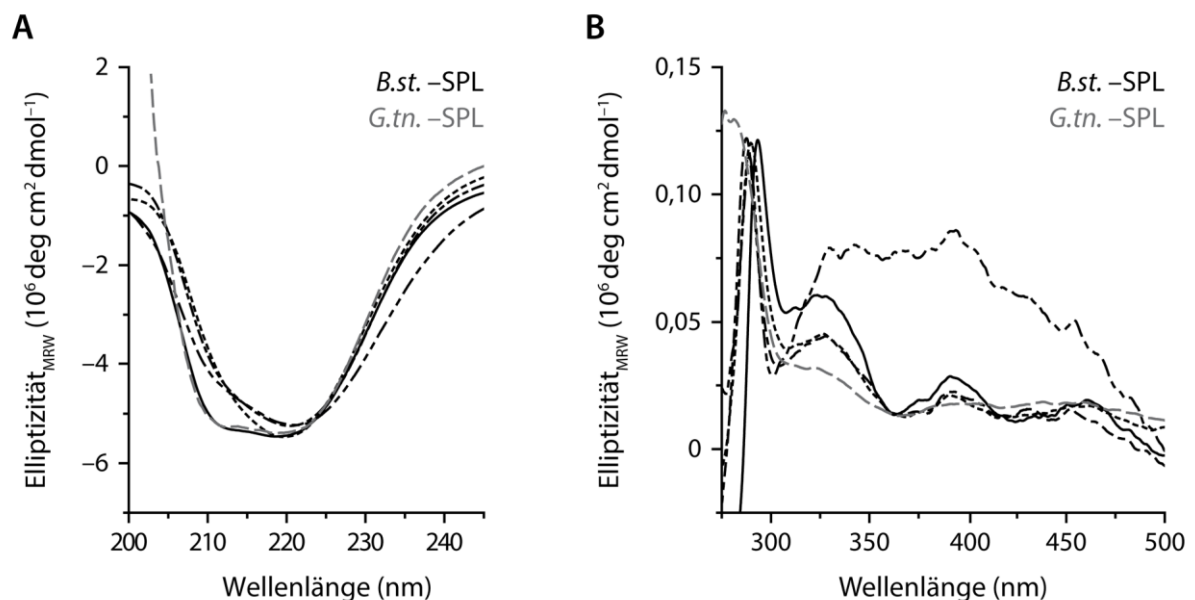
Nach Reduktion sollten beide Cluster-Typen in einen  $4\text{Fe}4\text{S}^{1+}$ -Cluster reduziert werden. Dieser verliert seine UV-Vis-spektroskopischen Eigenschaften, wodurch das Signal bei 420 nm abnehmen sollte.<sup>[342]</sup> Ein Beispiel dieses Effekts wird im Zusammenhang mit mechanistischen Studien zur SP-Lyase gezeigt (*Kapitel 3.3, Abbildung 32A*).

### **Vergleich der Sekundär- und Tertiärstruktur im Circular-Dichroismus**

Um festzustellen, ob signifikante Unterschiede in der strukturellen Konformation zwischen den beiden Wildtyp-Varianten und dem Wildtyp und den Aktivitätsmutanten vorliegen könnten, wur-



den Circular-Dichroismus-(CD)-Spektren aufgenommen (*Abbildung 23*). Die Aufnahmen im fernen UV (200–250 nm) geben Elemente der Sekundärstruktur wieder (*Abbildung 23A*).<sup>[343]</sup> Der Vergleich der Spektren zeigte keine merklichen Konformationsänderungen. Im Wildtyp (*B.st.* und *G.tn.*) waren zwei Peaks bei 210 nm und 220 nm zu erkennen, die auf eine große Anzahl an  $\alpha$ -Helices hinwiesen.<sup>[343]</sup> Die Form der Kurve war vergleichbar mit anderen *TIM-Barrel*-Proteinen<sup>[344]</sup> und dem Radikal-SAM-Enzym Viperin.<sup>[345]</sup> In den Mutanten, war das Signal bei 220 nm ausgeprägter als bei 210 nm. Eventuell könnte eines der Signale von den Wechselwirkungen von C140 und Y98 im *TIM-Barrel*, die in den Mutanten gestört werden könnte, beeinflusst werden. Die generelle Packung des *TIM-Barrels* schien aber, im Vergleich mit anderen *TIM-Barrel*-Proteinen,<sup>[344]</sup> nicht signifikant verändert worden zu sein.



**Abbildung 23:** CD-Spektren im fernen (**A**) und nahen (**B**) UV zum Vergleich der SPL-Sekundär- und Tertiärstruktur. *B.st.*-SPL (**Schwarz**) Wildtyp (—), C140A (---), Y98F (---) und C140G (---) sowie nativer *G.tn.*-SPL Wildtyp (**Grau**) (---). Bedingungen: (**A**) 0,3 g L<sup>-1</sup> SPL in 5 mM HEPES; 30 mM NaCl und 5% Glycerol (pH 7,5) in einer 0,1-cm-Küvette (HEPES- und NaCl-Konzentrationen wurden aufgrund der hohen Absorption der Stoffe bei niedrigen Wellenlängen gesenkt<sup>[343]</sup>) und (**B**) 2 g L<sup>-1</sup> SPL in 50 mM HEPES; 300 mM NaCl und 5% Glycerol (pH 7,5) in einer 1-cm-Küvette. Die SPL-Konzentration und die Schichtdicke der Küvetten wurden so gewählt, dass die GesamtabSORPTION der Probe  $\leq 1,0$  war.<sup>[343]</sup> Die Elliptizität wurde bezogen auf das mittlere Gewicht der Aminosäure-Reste (engl.: *mean residue weight*, MRW).

Im nahen UV der CD-Spektren (275–500 nm) können Tertiärstruktur-Elemente der SP-Lyasen verglichen werden (*Abbildung 23B*).<sup>[343]</sup> Die Intensitäten der Signale sind für gewöhnlich kleiner als die der Sekundärstruktur-Elemente im fernen UV.<sup>[343]</sup> Die beiden Wildtypen und die *B.st.*-Mutanten zeigten gleiche Strukturmerkmale. Ein deutlicher Peak im Bereich von 290 nm war zu erkennen, der spezifisch für aromatische Aminosäuren mit einem besonders hohen Anteil an Tyrosinen ist<sup>[343]</sup> (23 Tyr in *B.st.*-SPL und 24 Tyr in *G.tn.*-SPL). Drei weitere Peaks waren

bei 325 nm, 380 nm und 460 nm ausgeprägt. In diesem Wellenlängenbereich geben normalerweise nur Cofaktoren Signale wieder.<sup>[343]</sup> Demnach könnten diese Werte vom FeS-Cluster stammen. Die Abweichungen würden dann für Konzentrationsunterschiede der Cluster in der jeweiligen Proteinpräparation sprechen. Da sich in diesem Bereich sehr kleine Änderungen im CD-Signal, aufgrund der Einberechnung der Konzentration in die Elliptizität<sub>MRW</sub> (Formel S. 137),<sup>[343]</sup> bereits deutlich abzeichnen können, waren die Konzentrationsunterschiede vermutlich nicht besonders groß. Eine signifikante Änderung der Tertiärstruktur war jedoch bei der Mutante C140G zu erkennen. Der Tyrosinpeak war gut ausgeprägt, doch wich die Kurve im Bereich größerer Wellenlängen relativ stark ab. Da das UV-Vis-Spektrum der C140G-Mutante ein schwaches Signal eines 4Fe4S-Clusters zeigte (*Abbildung 22*), könnte beispielsweise ein anderes Signal die Peaks des Clusters im CD überlagern oder damit interferieren. Welcher Art diese Beeinträchtigung des CD-Signals sein könnte, wurde hier nicht weiter verfolgt, doch fielen weitere merkwürdige Eigenschaften der C140G-Mutante in Aktivitäts- und Bindungsstudien auf, die in einem späteren Kapitel diskutiert werden.

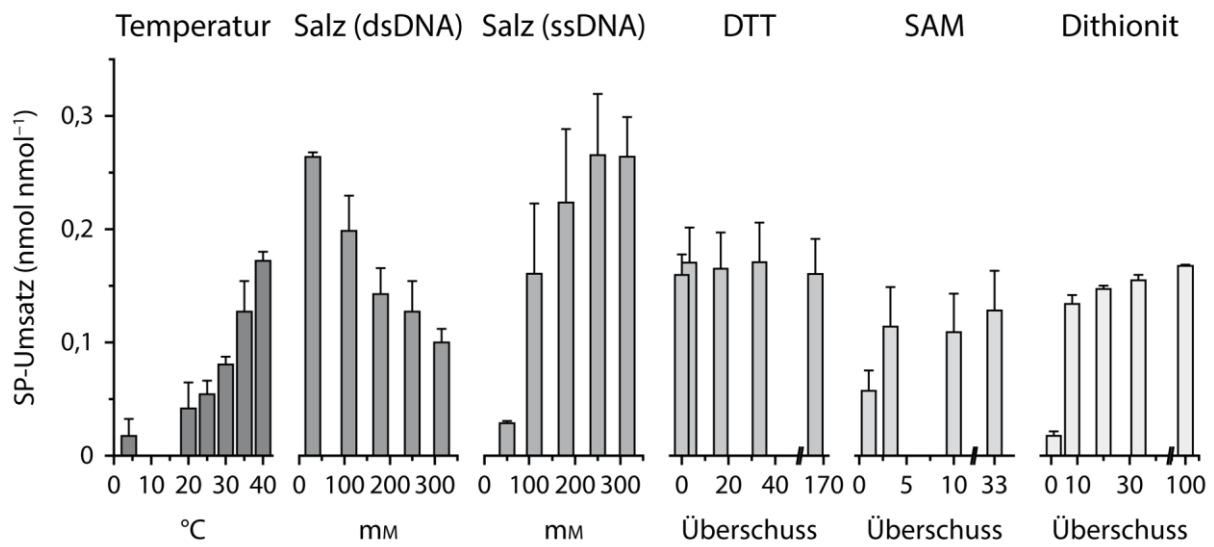
### ***Einflüsse auf Stabilität und Aktivität***

Die SP-Lyase ist in der Handhabung ein sehr anspruchsvolles und empfindliches Enzym. Da die beiden exprimierten SPL-Varianten aus thermophilen Organismen stammten, war es nicht verwunderlich, dass das Protein bei höheren Temperaturen stabiler war. Wurde die SP-Lyase über Nacht bei 4 °C im Kühlschrank aufbewahrt, so wurde die Proteinlösung trübe. Erstaunlicherweise löste sich das Protein wieder nach Erwärmung bei 35 °C. Um kein Risiko für die Aktivität einzugehen, wurde die SP-Lyase daher nach der Aufreinigung für die Lagerung bei -80 °C in flüssigem Stickstoff schockgefroren und für die jeweiligen Versuche an Raumtemperatur aufgetaut. Dies hatte nur geringen Einfluss auf die Aktivität, wie mit Test-Assays gemessen wurde. Wurde die SP-Lyase dagegen auf Eis aufgetaut, wurde die Lösung erneut trübe.

Desweiteren reagierte die SP-Lyase empfindlich auf langsame Änderungen der Salzkonzentration. Dies äußerte sich bei Dialyse und PD-10-Entsalzung, indem die SP-Lyase in der Dialysenkammer und auf der PD-10-Säule in schwarzen Klumpen ausfiel. Diese konnten nicht wieder durch Erwärmung gelöst werden. Solch eine Denaturierung trat ebenfalls bei zu hohen Proteinkonzentrationen ( $> 10 \text{ g L}^{-1}$ ), besonders in Kombination mit Salzkonzentrationen  $< 100 \text{ mM}$ , auf. Auch beim Einfrieren empfahl es sich die Proteinkonzentration kleiner als  $10 \text{ g L}^{-1}$  zu halten, da ansonsten beim Auftauen ein Proteinverlust durch oben beschriebene Klumpen eintrat.

Um den Einfluss bestimmter Faktoren auf die Aktivität der SP-Lyase zu erfassen, wurden vor der Charakterisierung der Enzym-Aktivität Test-Versuche in Abhängigkeit der Salz-, DTT-, SAM-

und Dithionit-Konzentration sowie der Temperatur durchgeführt (Abbildung 24). Unterschiedliche pH-Werte wurden nicht getestet. Durch Abgleich mit Publikationen zur SP-Lyase, in denen pH-Werte zwischen 7,0 und 8,0 verwendet wurden,<sup>[8,11-13,325-327]</sup> wurde ein pH-Wert von 7,5 gewählt, der mindestens eineinhalb pH-Einheiten unter dem theoretischen, isoelektrischen Punkt des Enzyms liegt (pH 9,0 für *B.st.* –SPL und pH 9,3 für *G.tn.* –SPL).<sup>[346]</sup> Dadurch sollte gewährleistet werden, dass die SP-Lyase eine positive Gesamtladung besitzt, mit der sie effizient an DNA binden kann.



**Abbildung 24:** Test-Reaktionen mit der SP-Lyase zur Optimierung der Reaktionsbedingungen. Es wurden jeweils verschiedene Faktoren variiert. Die variierten Konzentrationen von DTT, SAM und Dithionit sind als Überschuss zur SPL-Konzentration angegeben. Konstante Bedingungen waren: 30  $\mu$ M *B.st.* –SPL, 10  $\mu$ M SP-dsDNA (ODN1/2), 1 mM SAM, 5 mM DTT, 1-3 mM Dithionit in 50 mM HEPES, 300 mM NaCl, 5% Glycerol (pH 7,5) bei 35 °C und 5 h beziehungsweise 1 h für Salz (ssDNA) (ODN1) als Dreifachmessung. Das Protein-DNA-Konzentrationsverhältnis wurde für die Test-Versuche aus Heil *et al.*<sup>[140]</sup> gewählt.

Wie erwartet, war die SP-Lyase umso aktiver, je wärmer die Reaktion durchgeführt wurde (Abbildung 24). Da die Test-Versuche mit doppelsträngigen DNA-Substraten erfolgten, konnte die Temperatur jedoch nicht über 40 °C getestet werden; die Schmelztemperatur der kurzen DNA-Substrate lag bei < 44 °C (S. 118). Das Temperaturoptimum konnte nicht bestimmt werden. Für die Aktivitätsassays wurde eine Temperatur von 35 °C gewählt, die weit genug von der Schmelztemperatur lag, aber dennoch ausreichend hoch für eine effiziente Aktivität sein sollte.

Der Einfluss der Salz-Konzentration auf die SPL-Reaktion hing mehr von der Art der Substrate ab, als vom Protein (Abbildung 24). Das Salzoptimum für doppelsträngige DNA (dsDNA) lag bei kleineren Salzkonzentrationen (< 50 mM), während die Aktivität mit einzelsträngiger DNA (ssDNA) besser in höheren Salzkonzentrationen war (circa 300 mM). Dies könnte vermutlich durch die Stabilität und den Flipp-Prozess der DNA-Substrate erklärt werden. DNA ist prinzipiell

stabiler in höheren Salzkonzentrationen und die Konformation von ssDNA müsste zur Bindung im aktiven Zentrum nicht verändert werden. Der Duplex der dsDNA müsste allerdings erst aufgebrochen werden, damit das SP-Dinukleosid in das aktive Zentrum geflippt werden könnte. Dieser Prozess könnte in geringer Salzkonzentration erleichtert ablaufen.

Dithiothreitol (DTT) wurde oft in SPL-Reaktionen als Puffer-Zusatz zum Abfangen von überschüssigen Sauerstoffmolekülen eingesetzt.<sup>[11-13,326]</sup> Da die SP-Lyase in dieser Arbeit jedoch bereits unter anaeroben Bedingungen aufgereinigt wurde, wurde getestet, ob DTT einen weiteren Einfluss auf die SPL-Aktivität besitzen könnte. Tatsächlich konnte keinerlei Beeinträchtigung der Reaktion gefunden werden (*Abbildung 24*). Da desweiteren eine Publikation berichtete, dass ohne DTT eine verminderte, entkoppelte AdoH-Produktion während der SPL-Reaktion stattfand,<sup>[11]</sup> wurde im Folgenden kein DTT im Reaktionspuffer der SP-Lyase eingesetzt.

SAM ist als Cofaktor der SP-Lyase essentiell für die Reaktion.<sup>[324]</sup> Tatsächlich konnte durch Zugabe von SAM und auch SP-Substrat ein stabilisierender Effekt auf die Löslichkeit des Proteins beobachtet werden, wie zuvor schon für die SP-Lyase aus *B. subtilis* beschrieben wurde.<sup>[326]</sup> Damit die Reaktion aber mit höchster Aktivität des Proteins ablaufen konnte, musste der Cofaktor mindestens in einem zweifachen Überschuss zugegeben werden (*Abbildung 24*).

Ein Überschuss war auch bei der Zugabe von Dithionit als Reduktionsmittel des 4Fe4S-Clusters notwendig. Erst ab einer zehnfachen Konzentration über der SPL-Konzentration erreichte das Enzym eine optimale Aktivität (*Abbildung 24*) bei den gegebenen Messbedingungen. Es wurden auch andere Reduktionsmittel getestet (TCEP,  $\text{Fe}^{2+}$ , Flavinadenindinukleotid, Ascorbat und Thio-sulfat). Keines dieser Mittel konnte den Cluster merkenswert reduzieren; das Protein war mit diesen Reduktionsmitteln nicht aktiv. Eine aus der Literatur bekannte Alternative zur Reduktion und Aktivierung des Enzyms ist 5-Deazariboflavin,<sup>[327]</sup> welches jedoch nicht einfach zu erwerben oder zu synthetisieren ist.<sup>[347]</sup> In dieser Arbeit trat nur bei Spektroskopie-Versuchen ein Problem mit Dithionit als Reduktionsmittel auf, welches jedoch auf andere Weise umgangen werden konnte (*Kapitel 3.3*). 5-Deazariboflavin wurde daher nicht erworben.

## **Fazit**

Es konnte gezeigt werden, dass die Sporen-Photoprodukt-Lyasen aus *G. stearothermophilus* und *G. thermodenitrificans* sich in ihrer Sequenz, Sekundär- und Tertiärstruktur sowie der Clusterbelastung im nativen Zustand sehr ähnlich sind. Beide waren als native, nicht rekonstituierte Proteine mit circa 37,5% FeS-Clustern beladen. Der Großteil dieser Cluster waren 3Fe4S-Cluster, die nach Reduktion in einen 4Fe4S-Cluster umgewandelt werden können.<sup>[341]</sup> Cluster-

Rekonstitution der SP-Lyase erzielte die gewünschte, vollständige Beladung mit FeS-Clustern (circa 99%).

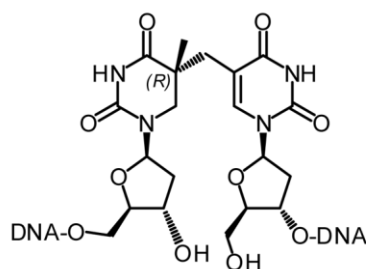
Die Expressions- und Aufreinigungsbedingungen lieferten maximale Ausbeuten von > 95% reinen 0,5 mg *B.st.* –SPL und 4 mg *G.tn.* –SPL pro Liter Expressionsmedium. Es konnten keine Dimere, wie sie *Dr. J. Carsten Pieck* in seiner Dissertation beschrieben hatte,<sup>[12,149]</sup> nachgewiesen werden. Beide SP-Lyasen reagierten gleich gegenüber externen Einflüssen: Sie waren stabiler bei höheren Temperaturen, reagierten jedoch empfindlich auf Änderungen der Salzkonzentration und fielen bei Proteinkonzentrationen > 10 g L<sup>-1</sup> aus. Außerdem wurden die unterschiedlichen Faktoren der SPL-Reaktion evaluiert, um die folgenden Aktivitäts-Analysen der SP-Lyase unter geeigneten Bedingungen durchführen zu können.

## 3.2. Enzym-Aktivität und Substrat-Analyse

### ***Vergleich der Reparatur-Effizienz der SP-Lyase mit unterschiedlichen SP-Substraten***

Für die SPL-Reaktion wurden bislang sehr unterschiedliche Substrate verwendet (*Tabelle 2*), die alle unterschiedlich effizient von der SP-Lyase repariert werden. Durch UV-Belichtung<sup>[117]</sup> oder Synthese<sup>[348]</sup> können SP-Dinukleosid-Monophosphate erhalten werden. Diese wurden am häufigsten für Analysen der SPL-Reaktion verwendet.<sup>[11,13,141,327]</sup> Weniger häufig wurden Plasmide,<sup>[10,326]</sup> die nach Belichtung mehr als ein SP-Molekül enthielten, und kurze SP-ssDNA-Stränge<sup>[12]</sup> genutzt.

In dieser Dissertation wurde mit SP-Dinukleosiden gearbeitet, die von *Dr. Korbinian Heil* und *Dr. Gengo Kashiwazaki* synthetisiert wurden.<sup>[140,349]</sup> Diese Substrate wurden hauptsächlich als Phosphoramidit-Bausteine über die DNA-Festphasen-Synthese in kurze Oligo-2'-Desoxynukleotide (ODN, S. 118) eingebaut (*Abbildung 25*). Das Sporen-Photoprodukt wurde als Dinukleosid ohne Phosphat hergestellt, da die Ausbeuten der bereits aufwendigen, 14-Schritt-Synthese<sup>[140]</sup> durch zusätzlichen Einbau des Phosphats zwischen den beiden Nukleosiden entscheidend verringert werden würde. Reparatur-Assays der SP-Lyase mit diesen Substraten wurden mittels Umkehrphasen-Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie (RP-HPLC) ausgewertet. Durch das fehlende Phosphat wurden die SP-DNA-Stränge in zwei DNA-Fragmente gespalten, die mit Hilfe des UV-Detektors der HPLC detektiert werden konnten (*Appendix 2B,C*).



**Abbildung 25:** SP-Dinukleosid, eingebaut in einen DNA-Strang. Dieses SP-DNA-Substrat und SP-Dinukleosid (H statt DNA) wurden in dieser Arbeit verwendet.

Erste Ergebnisse mit Dinukleosiden als SPL-Substrat wurden bereits in früheren Publikationen gezeigt (Tabelle 2).<sup>[138-139]</sup> Vergleicht man die Wechselzahl  $k_{\text{cat}}$  der Reaktionen mit Dinukleosid mit denen der Reaktionen mit Dinukleosid-Monophosphat-,<sup>[11,13,327]</sup> Plasmid-<sup>[10,326]</sup> sowie ssDNA-Substraten,<sup>[12]</sup> so ist diese um mehr als 1.000-fach langsamer (Tabelle 2). Das Phosphat spielt scheinbar eine große Rolle bei der Katalyse. Möglicherweise könnte das Phosphat wichtig für die korrekte Ausrichtung oder Stabilisierung des Sporen-Photoprodukts sein. Plasmid- und ssDNA-Substrate zeigten indes einen noch besseren Umsatz als Dinukleosid-Monophosphate; es ist denkbar, dass die DNA-Umgebung zur weiteren Stabilisierung des SP-Schadens im aktiven Zentrum beitragen könnte. Obwohl die Werte unter verschiedenen Reaktionsbedingungen und mit rekonstituierter oder nativer SP-Lyase aus unterschiedlichen Organismen bestimmt wurden, zeigen sich keine großen Abweichungen für gleiche SP-Substrate, wie beispielsweise Dinukleosid-Monophosphat (0,24–0,35)<sup>[11,13,327]</sup> (Tabelle 2).

**Tabelle 2:** Vergleich der SPL-Wechselzahl für verschiedene SP-Substrate aus unterschiedlichen Publikationen. Es sind diejenigen Autoren mit Nachnamen aufgelistet, die als Gruppenleiter tätig sind.

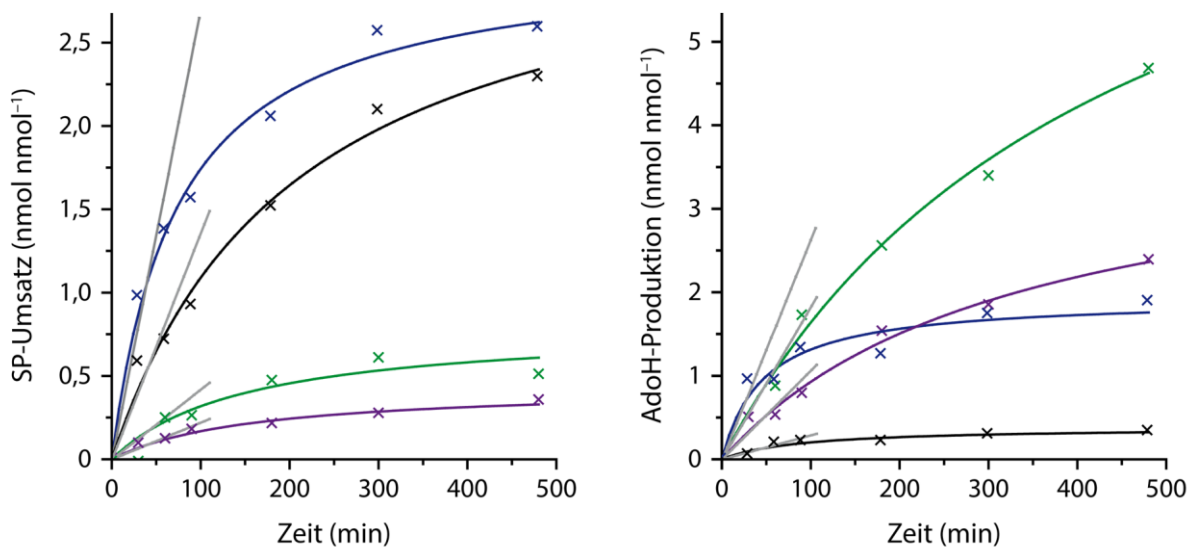
SP-Substrat	Wechselzahl $k_{\text{cat}}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	Organismus	Publikation
6mer-ssDNA mit vollständigem Phosphat-Rückgrat	113	<i>G. stearothermophilus</i>	Carell <sup>[12]</sup>
pUC18-Plasmid	12,6–13,2	<i>B. subtilis</i>	Broderick, <sup>[10]</sup> Broderick <sup>[326]</sup>
Dinukleosid-Monophosphat	0,24–0,35	<i>B. subtilis</i> <i>C. acetobutylicum</i>	Fontecave, <sup>[13]</sup> Broderick, <sup>[327]</sup> Li <sup>[11]</sup>
Dinukleosid mit Formacetal-Linker	0,17	<i>B. subtilis</i>	Li <sup>[141]</sup>
Dinukleosid	0,007–0,021	<i>B. subtilis</i> <i>C. acetobutylicum</i>	Carell, <sup>[138]</sup> Broderick <sup>[139]</sup>

Die Werte in Tabelle 2 werfen die Frage auf in wie weit die Wechselzahl verbessert werden könnte, wenn das SP-Dinukleosid in kurze DNA-Stränge eingebaut wird – insbesondere, ob das

fehlende Phosphat auch in der DNA-Umgebung die Reparatur-Effizienz beeinträchtigen würde. Da besonders ein 6mer-ssDNA einen  $k_{\text{cat}}$ -Wert von  $113 \text{ min}^{-1}$  aufweist,<sup>[12]</sup> wäre eine beträchtliche Steigerung zu erwarten. Es wurden daher zeitaufgelöste Aktivitäts-Messungen mit nativer *B.st.* –SPL mit 100-fachem Überschuss an SP-DNA-Substraten beziehungsweise SP-Dinukleosid zur Sättigung des Enzyms durchgeführt (Abbildung 24). Die Sättigung des Enzyms stellte sicher, dass dieses seine maximale Umsatzgeschwindigkeit  $V_{\text{max}}$  erreichte.<sup>[350]</sup> Der Zeitrahmen der linearen Anfangsgeschwindigkeiten passte mit bis zu 60 min gut zu den entsprechenden Werten aus den in Tabelle 2 genannten Publikationen (Abbildung 26) (15–60 min). Die Wechselzahlen wurden über das Verhältnis

$$k_{\text{cat}} = V_{\text{max}} / c(\text{SPL}) [\text{nmol nmol}^{-1} \text{ min}^{-1}]$$

aus den linearen Anfangsgeschwindigkeiten bestimmt.<sup>[350]</sup> Diese Werte sind in Tabelle 3 aufgelistet.



**Abbildung 26:** Zeitaufgelöste SPL-Reaktionen zur Berechnung der  $k_{\text{cat}}$ -Werte von unterschiedlichen SP-Substraten: (**Schwarz**) dsDNA (SP-13mer ODN1/2), (**Blau**) ssDNA (SP-13mer ODN1), (**Violett**) ssDNA (SP-6mer ODN3) und (**Grün**) SP-Dinukleosid. Die  $k_{\text{cat}}$ -Werte der SP-Umsätze wurden aus der linearen Anfangsgeschwindigkeit bestimmt und sind in Tabelle 3 angegeben. Die dazugehörigen Anfangsgeschwindigkeiten der AdoH-Produktion wurden bestimmt zu  $V = 0,0029 \pm 0,0001 \text{ nmol nmol}^{-1} \text{ min}^{-1}$  (13mer-dsDNA),  $V = 0,0264 \pm 0,0013 \text{ nmol nmol}^{-1} \text{ min}^{-1}$  (13mer-ssDNA),  $V = 0,0107 \pm 0,0001 \text{ nmol nmol}^{-1} \text{ min}^{-1}$  (6mer-ssDNA) und  $V = 0,0180 \pm 0,0002 \text{ nmol nmol}^{-1} \text{ min}^{-1}$ . Zur Veranschaulichung wurden die Datenpunkte mit der Hill-Funktion ( $n = 1$ ) gefittet, weil diese die Daten am besten anglich ( $R^2$ -Werte: 0,79–0,99). Die p-Werte der Fitgeraden (**Grau**) für den linearen Teil der Kurven lagen im Bereich  $< 0,0005$ . Reaktionsbedingungen:  $1 \mu\text{M}$  *B.st.* –SPL,  $100 \mu\text{M}$  SP-Substrat,  $10 \mu\text{M}$  SAM,  $1 \text{ mM}$  Dithionit in  $50 \text{ mM}$  HEPES,  $300 \text{ mM}$  NaCl und  $5\%$  Glycerol (pH 7,5) bei  $35^\circ\text{C}$ . Aliquots wurden nach 30 min; 1 h; 1,5 h; 3 h; 5 h und 8 h entnommen und mittels HPLC analysiert.

Die Ergebnisse lagen im unteren Bereich der in Tabelle 2 gezeigten Größenordnungen, das heißt die Reparatur war langsamer als mit Substraten, die ein Phosphat zwischen den Nukleosiden des Sporen-Photoprodukts aufweisen. Dies lässt darauf schließen, dass die Rolle des Phosphats wäh-

rend der Katalyse auch im DNA-Templat entscheidend sein könnte. Beispielsweise könnte das Phosphat tatsächlich wichtig für die Stabilisierung des geflippten Schadens in der aktiven Tasche sein. Die fehlende Stabilisierung könnte folglich die Geschwindigkeit der Katalyse verlangsamen.

**Tabelle 3:** Gemessene  $k_{\text{cat}}$ -Werte und SP/AdoH-Verhältnisse der *B.st.* –SPL für SP-Dinukleosid und unterschiedliche SP-DNA-Substrate. Die Messungen erfolgten mit 100-fachem Substrat-Überschuss zur Sättigung des Enzyms (vergleiche *Abbildung 26*). Die Geschwindigkeiten der AdoH-Produktion sind in *Abbildung 26* angegeben. Zum Vergleich sind die Umsatzgeschwindigkeit und das SP/AdoH-Verhältnis bei einem Substratüberschuss im Bereich des  $K_m$ -Wertes ( $V_{\text{max}}/2$ ) für ein 39mer-dsDNA-Substrat (*Abbildung 49*) gezeigt.

SP-Substrat	$k_{\text{cat}}$ ( $10^{-3} \text{ min}^{-1}$ )	$V_{\text{max}}/2$ ( $10^{-3} \text{ nmol nmol}^{-1} \text{ min}^{-1}$ )	SP/AdoH
13mer-dsDNA (ODN1/2)	$14 \pm 0$	–	4,8
13mer-ssDNA (ODN1)	$27 \pm 1$	–	1,0
6mer-ssDNA (ODN3)	$2 \pm 0$	–	0,2
Dinukleosid	$4 \pm 0$	–	0,2
39mer-dsDNA (ODN1/4/5)	–	$30 \pm 2$	0,3

Nichtsdestotrotz war eine wesentliche Verbesserung des SP-Umsatzes mit der Länge des Substrates zu beobachten. Am schnellsten wurde 13mer-ssDNA repariert, sogar schneller als das doppelsträngige Pendant. Die SP-Lyase erreichte mit beiden Substraten einen Umsatz am Reaktionsende von 2,0–2,5 reparierten SP-Molekülen pro Enzymmolekül (y-Achse in *Abbildung 26*). Die entsprechenden  $k_{\text{cat}}$ -Werte lagen bei  $27 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$  und  $14 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$  (*Tabelle 3*). Die schnellere Reparatur des Einzelstranges könnte wiederum mit Hilfe des Flipp-Mechanismus erklärt werden. Das Enzym könnte für das Flippen des Schadens im Doppelstrang zusätzliche Zeit benötigen, die bei der Reparatur des Einzelstranges wegfallen sollte. Dies könnte die Reaktion in so großem Maß beeinträchtigen, dass die Umsatzgeschwindigkeit verdoppelt werden könnte.

Zum 6mer-ssDNA vergrößert sich die Umsatzgeschwindigkeit mit 13mer-ssDNA um das 14-fache. Es ist erstaunlich, dass dieses kurze, einzelsträngige Substrat langsamer repariert wurde als das Dinukleosid, da die Wechselzahl für 6mer-ssDNA mit vollständigem Phosphat-Rückgrat um drei Größenordnungen schneller als für Dinukleosid-Monophosphate publiziert wurde.<sup>[12]</sup> Das hier gezeigte Ergebnis steht somit im Widerspruch zu diesem bislang schnellsten gemessenen Wechselzahl-Wert von  $113 \text{ min}^{-1}$ .<sup>[12]</sup>



Das beste Substrat, das in dieser Arbeit verfügbar war, war ein 39mer-dsDNA, welches in einem späteren Test zur Untersuchung des Substrat-Erkennungs-Prozesses evaluiert wurde (*Kapitel 3.5, Abbildung 49*). Die  $k_{\text{cat}}$ -Messung, mit hohem Bedarf an Sporen-Photoprodukt, wurde für dieses Substrat nicht wiederholt, da dieses Substrat für ebenfalls hochkonzentrierte EPR-Ansätze benötigt wurde (*Kapitel 58*). Zum Vergleich ist dafür die lineare Anfangsgeschwindigkeit bei einem Substratüberschuss im Bereich des  $K_m$ -Wertes gezeigt, die aus dem Ansatz einer EPR-Messung bestimmt wurde (*Abbildung 35*). Diese entspricht einer Geschwindigkeit von  $V_{\text{max}}/2$ . Der  $V_{\text{max}}/2$ -Wert für die 39mer-dsDNA ist mit  $30 \times 10^{-3} \text{ nmol nmol}^{-1} \text{ min}^{-1}$  bereits um das Doppelte größer als der  $k_{\text{cat}}$ -Wert für die 13mer-dsDNA (*Tabelle 3*). Für den  $k_{\text{cat}}$ -Wert der 39mer-dsDNA wäre ein noch größerer (circa  $2 \times V_{\text{max}}/2$ )<sup>[350]</sup> Wert zu erwarten. Dies legt nahe, dass die DNA-Länge, ähnlich wie das Phosphat zwischen den beiden Nukleosiden, entscheidend für die Effizienz der Katalyse der SP-Lyase sein könnte.

Der 39mer-dsDNA-Wert wurde mit *G.tn.* –SPL bestimmt. Dass der Wert in demselben Größenbereich lag wie die Werte mit *B.st.* –SPL, legt nahe, dass die beiden SPL-Varianten ein vergleichbares Reaktionsverhalten besitzen könnten.

Vergleicht man die  $k_{\text{cat}}$ -Werte – publizierte und gemessene – mit den  $k_{\text{cat}}$ -Werten von anderen Radikal-SAM-Enzymen, so liegen diese im Bereich der Enzyme, die SAM nicht katalytisch verwenden (Klasse II/III).<sup>[333,351-354]</sup> Die Wechselzahl der Lysin-2,3-Aminomutase, als Beispiel eines Klasse-I-Enzyms, beträgt  $1.980 \text{ min}^{-1}$ .<sup>[355]</sup> Selbst die Wechselzahl für SP-Plasmid-Substrate<sup>[10,326]</sup> liegt mit 12,6–13,2 weit unter diesem Wert. Es ist also fragwürdig, ob die Sporen-Photoprodukt-Lyase mit dieser niedrigen Umsatzgeschwindigkeit seinen SAM-Cofaktor tatsächlich regenerieren würde, um ihn für alle Katalyse-Zyklen wieder zu verwenden. Da bereits gezeigt wurde, dass ein SAM-Molekül mehrere Umsätze der Reparatur-Reaktion katalysieren kann,<sup>[10-11,326]</sup> bliebe die Alternative, dass SAM die Reaktion nur initiieren könnte und die SP-Lyase mit Hilfe von Aminosäure-Radikalen die Katalyse weiterer Zyklen ohne direkte Regenerierung des SAM-Cofaktors übernehmen könnte.

Die Effizienz der Reparatur von verschiedenen SP-Substraten könnte auch auf andere Weise verglichen werden. In allen bisherigen Publikationen wurde eine SAM-Spaltung detektiert, die entkoppelt zur SP-Reparatur stattfindet. Dies ist sehr üblich für *in-vitro*-Reaktionen von Radikal-SAM-Enzymen.<sup>[311]</sup> Auch in den hier präsentierten Aktivitäts-Messungen konnte eine solche Entkopplung beobachtet werden. Betrachtet man, wie viele SP-Moleküle pro gespaltenem SAM-Molekül repariert wurden (SP/AdoH), so erhält man einen neuen Vergleichs-Wert, der unabhängig von der Reparatur-Aktivität ist und dafür die katalytische Effizienz des SAM-Cofaktors

wiedergibt. Er wurde hier aus dem  $k_{\text{cat}}$ -Wert des SP-Umsatzes und der linearen Anfangsgeschwindigkeit der AdoH-Produktion bestimmt (*Abbildung 26*). Bislang wurde die katalytische Effizienz des SAM-Cofaktors nur durch Messungen bestimmt, in denen gleiche Konzentrationen an SAM und SP-Lyase verwendet wurden<sup>[326]</sup> oder in denen die SP-Lyase vorreduziert und überschüssiges Dithionit abgetrennt wurde.<sup>[11]</sup>

Die Ergebnisse in *Tabelle 3* zeigen, dass dsDNA mit einem SP/AdoH-Verhältnis von 4,8 das effektivste Substrat der SP-Lyase war. Obwohl das 13mer-ssDNA am schnellsten repariert wurde, benötigte es für jeden Reparatur-Zyklus ein neues SAM-Molekül (SP/AdoH = 1,0). Wurden Dinukleosid oder 6mer-ssDNA als Substrat eingesetzt, so wurden mehr SAM-Moleküle gespalten als für die Reparatur notwendig sind (SP/AdoH = 0,2). Der Wert für Dinukleosid-Monophosphat wurde erst kürzlich publiziert.<sup>[356]</sup> Mit einem SP/AdoH-Verhältnis von 1,5 zeigt sich, dass das einfache Dinukleosid-Monophosphat tatsächlich kein so effizientes Substrat ist wie die hier verwendete dsDNA mit SP-Dinukleosid.

Die SP/AdoH-Werte waren abhängig von der Sättigung des Enzyms mit Substrat. Lag die SP-Lyase nur halb gesättigt vor, wie im Beispiel für 39mer-dsDNA (*Tabelle 3*), dann war die SAM-Spaltung entkoppelt und es wurde mehr AdoH produziert als Sporen-Photoprodukt repariert wurde (SP/AdoH = 0,3). Daraus lässt sich schließen, dass die entkoppelte SAM-Spaltung abhängig davon sein könnte, wie oft die aktive Tasche während der Katalyse dem Lösungsmittel ausgesetzt wird. Die Exposition des aktiven Zentrums mit Lösungsmittel könnte zur Abreaktion intermediärer Radikale führen. dsDNA könnte das aktive Zentrum und ein potentiell Enzym- oder Cofaktor-gebundenes Radikal am effizientesten – auch zwischen mehreren Katalyse-Zyklen – vor dem Lösungsmittel schützen. Dies wäre, den hier gezeigten Ergebnissen zufolge, nur dann möglich, wenn das Enzym mit dsDNA gesättigt ist. Ist es nur mit ssDNA oder Dinukleosid-Monophosphat<sup>[356]</sup> gesättigt, so könnten diese Substrate das aktive Zentrum nur so lange schützen, bis die Katalyse des gebundenen Sporen-Photoprodukts beendet wäre. Danach würde ein potentiell organisches Radikal vermutlich vom Lösungsmittel abgefangen werden und ein neues SAM-Molekül müsste für den nächsten Katalyse-Zyklus gebunden werden. Kleinere ssDNA-Substrate oder SP-Dinukleosid wären aufgrund ihrer niedrigen SP/AdoH-Werte nicht in der Lage die aktive Tasche zu verschließen, so dass auch bei Substrat-Sättigung das Lösungsmittel diese penetrieren könnte.

Diese Hypothese geht von einem intermediären, womöglich zwischen gespeicherten, Radikal während dem Katalyse-Zyklus aus. Die Entkopplung der SAM-Spaltung kann jedoch nicht nur durch das Abfangen möglicher organischer Radikale erklärt werden. In manch anderen Radikal-

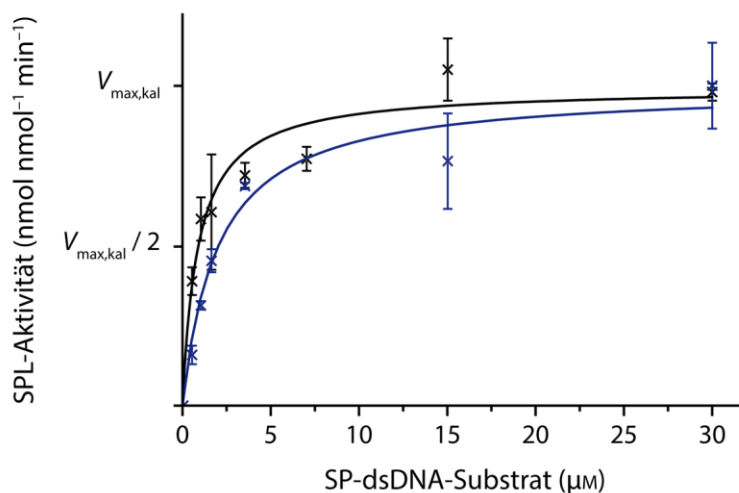
SAM-Enzymen wurde die Entkopplung reduziert indem physiologische Reduktionsfaktoren anstatt Dithionit verwendet wurden.<sup>[352,357-359]</sup> Dithionit könnte also ein sehr reaktives Reduktionsmittel sein, das den 4Fe4S-Cluster erneut reduzieren könnte, falls dieser nicht von Substrat geschützt wird. Eine weitere Erklärung könnte sein, dass die Bindung des SAM-Moleküls an die SP-Lyase durch die Bindung eines geeigneten Substrats verstärkt werden könnte, wie bereits für die Radikal-SAM-Enzyme PFL-AE<sup>[310]</sup> und BioB<sup>[360]</sup> gezeigt werden konnte. Durch die Verstärkung der SAM-Bindung könnte ebenfalls das SP/AdoH-Verhältnis verbessert werden.

### **Katalytische Effizienz $k_{cat}/K_m$ der *B.st.* –SPL und *G.tn.* –SPL**

Verbindet man die Wechselzahl eines Enzyms mit seiner Substrataffinität, die durch die *Michaelis-Menten*-Konstante  $K_m$  wiedergegeben wird, so erhält man die katalytische Effizienz  $k_{cat}/K_m$ . Diese wird üblicherweise zum Vergleich von verschiedenen Substraten oder Enzym-Varianten verwendet.<sup>[350]</sup>

Zur Bestimmung dieses Wertes, wurden zunächst  $K_m$ -Wert-Messungen durchgeführt. Der  $K_m$ -Wert entspricht der Substratkonzentration bei der das Enzym eine Geschwindigkeit von  $V_{max}/2$  erreicht und somit halb gesättigt vorliegt.<sup>[350]</sup> Die Geschwindigkeiten zum Erstellen einer  $K_m$ -Kurve in Abhängigkeit zur Substratkonzentration wird normalerweise aus dem linearen Anfangsbereich der Reaktionskurve bei steigender Substratkonzentration ermittelt.<sup>[350]</sup> Dies würde erfordern, dass zu jeder Substratkonzentration eine Zeitreaktion mit mindestens sechs Zeitpunkten durchgeführt wird, um daraus die entsprechenden Geschwindigkeiten zu berechnen. Die HPLC ist für derartige Messungen jedoch praktisch ungeeignet, da die Messung einer Probe bereits etwa eine Stunde dauert (siehe HPLC-Gradienten im Experimentaltail, *Kapitel 4.6*). Darum wurde für die Messung an der HPLC eine Endpunkt-Strategie gewählt bei der zunächst die Zeitperiode, in der die Anfangsgeschwindigkeit linear bleibt, bestimmt wurde. Dieser Zeitabschnitt wurde erfahrungsgemäß mit kleinerer Substratkonzentration kürzer, weswegen die Zeitreaktionen der beiden SPL-Enzyme mit 0,1  $\mu$ M dsDNA gemessen wurden. Die Zeitkurven zeigten eine lineare Anfangsgeschwindigkeit für die *B.st.* –SPL von bis zu 60 min und für die *G.tn.* –SPL von bis zu 50 min (*Appendix 3*). Da der Umsatz, wie aus dem vorangehenden Kapitel bekannt, sehr gering ist und dies an die Detektionsgrenze des HPLC-Systems stoßen würde, wurde eine Reaktionszeit am Ende dieses Zeitabschnitts gewählt. Die Reaktionsansätze wurden dann bei steigenden Substratkonzentrationen für 45 min (*B.st.* –SPL) beziehungsweise für 40 min (*G.tn.* –SPL) inkubiert.

Als dsDNA-SP-Substrat wurden in diesen Ansätzen fluoreszenzmarkierte Stränge verwendet, die mit größerer Sensitivität an der HPLC detektiert werden konnten (*Appendix 2A*). Dadurch wurde weniger aufwendig synthetisiertes SP-Substrat verbraucht. Die erhaltenen Reaktionsgeschwindigkeiten wurden schließlich gegen die verwendete Substratkonzentration aufgetragen und mit der *Michaelis-Menten*-Gleichung gefittet (*Abbildung 27*).



**Abbildung 27:** *Michaelis-Menten*-Diagramm der SPL-Reaktionsgeschwindigkeiten in Abhängigkeit von der Substratkonzentration. (**Schwarz**) *B.st.* –SPL und (**Blau**) *G.tn.* –SPL. Die Kurven wurden mittels der berechneten Maximalgeschwindigkeit  $V_{\max, \text{kal}}$  (kal für kalkuliert) normiert. Die  $R^2$ -Werte der Fitkurven (*Hill*-Funktion,  $n = 1$ , entspricht *Michaelis-Menten*-Gleichung) sind 0,89 (*B.st.* –SPL) und 0,95 (*G.tn.* –SPL). Reaktionsbedingungen: 1  $\mu\text{M}$  SPL, 1 mM SAM, 1 mM Dithionit in 50 mM HEPES, 50 mM NaCl und 5% Glycerol (pH 7,5) bei 35 °C. Es wurden Dreifachmessungen mit 0,5  $\mu\text{M}$ ; 1  $\mu\text{M}$ ; 1,6  $\mu\text{M}$ ; 3,5  $\mu\text{M}$ ; 7  $\mu\text{M}$ ; 15  $\mu\text{M}$  und 30  $\mu\text{M}$  dsDNA (SP-15mer-Fluo ODN8/9) für 45 min (*B.st.* –SPL) beziehungsweise 40 min (*G.tn.* –SPL) durchgeführt.

Die aus dem Fit berechneten  $K_m$ - und  $V_{\max, \text{kal}}$ -Werte (kal für kalkuliert zur Unterscheidung von  $V_{\max}$ -Werten, die mit einem sehr viel größeren Überschuss an Substrat gemessen wurden, wie in *Abbildung 26*) sind in *Tabelle 4* zusammengefasst. Die  $V_{\max, \text{kal}}$ -Werte wurden dazu verwendet die  $K_m$ -Kurven der beiden Enzyme in *Abbildung 27* zu normieren, um den Verlauf der *Michaelis-Menten*-Kurven beider Enzyme besser vergleichen zu können. Die gemessenen Datenpunkte deckten einen weiten Bereich der  $K_m$ -Kurven ab. Die Fehler der Messpunkte waren moderat; die gewählten Reaktionszeiten am Ende der linearen Anfangsgeschwindigkeiten könnten mitunter ein Grund dafür sein. Mit nur sieben Messpunkten war die Qualität der Fitkurven entsprechend mäßig, doch mit  $R^2$ -Werten von 0,89 und 0,95 lag diese noch im Bereich des Akzeptablen. Die Werte von  $K_m = 0,9 \mu\text{M}$  und  $K_m = 2,0 \mu\text{M}$  drückten eine sehr starke Substrataffinität der Enzyme aus, die im Vergleich zur eingesetzten SPL-Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  steht.<sup>[350]</sup> Sie zeigten außerdem, dass sich die *B.st.* –SPL und *G.tn.* –SPL in ihrem Reaktionsverhalten sehr ähnlich waren. Mit dem zuvor bestimmten  $k_{\text{cat}}$ -Wert konnte die katalytische Effizienz  $k_{\text{cat}}/K_m$  der *B.st.* –SPL für dsDNA zu  $259 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  berechnet werden (*Tabelle 4*).

**Tabelle 4:** Vergleich des  $K_m$ -Werts und der katalytischen Effizienz  $k_{cat}/K_m$  für verschiedene SP-Lyasen und SP-Substrate. Als dsDNA wurden ODN1/2 in der  $k_{cat}$ -Messung und ODN8/9 (mit 5'-Fluoreszenz-Markierung) in der  $K_m$ -Messung verwendet. *B.s.* steht für *Bacillus subtilis*.  $V_{max,kal}$  ist der aus der  $K_m$ -Kurve berechnete  $V_{max}$ -Wert (kal für kalkuliert).

SP-Lyase	SP-Substrat	$K_m$ ( $\mu M$ )	$V_{max,kal}$ ( $10^{-3} \text{ nmol nmol}^{-1} \text{ min}^{-1}$ )	$k_{cat}$ ( $10^{-3} \text{ min}^{-1}$ )	$k_{cat}/K_m$ ( $M^{-1} s^{-1}$ )
<i>B.st.</i> –SPL	dsDNA	$0,9 \pm 0,2$	$18 \pm 1$	$14 \pm 0$	259
<i>G.tn.</i> –SPL	dsDNA	$2,0 \pm 0,4$	$28 \pm 2$	–	–
<i>B.s.</i> –SPL <sup>[13]</sup>	Dinukleosid-Monophosphat	6	–	240	667

Dies ist der erste  $k_{cat}/K_m$ -Wert für die SP-Lyase mit dsDNA-Substrat. Nur in einer Publikation wurde bislang ein  $K_m$ -Wert für die SP-Lyase aus *Bacillus subtilis* (*B.s.*) bestimmt.<sup>[13]</sup> Dieser zeigt, dass SP-Dinukleosid-Monophosphate eine schlechtere Affinität zum Enzym aufweisen ( $K_m = 6 \mu M$ ) als die hier verwendete SP-dsDNA. Da allerdings die Wechselzahl  $k_{cat}$  für dieses Substrat um ein vielfaches größer ist, wird dieser Unterschied in der katalytischen Effizienz wieder ausgeglichen und  $k_{cat}/K_m$  ist besser als der hier berechnete Wert für SP-dsDNA (Tabelle 4). Diesen Unterschied kann man mit Hilfe folgender Formel in die Energiedifferenz der Übergangszustände ( $\neq$ ) beider Enzym-Substrat-(ES)-Komplexe umwandeln:<sup>[350]</sup>

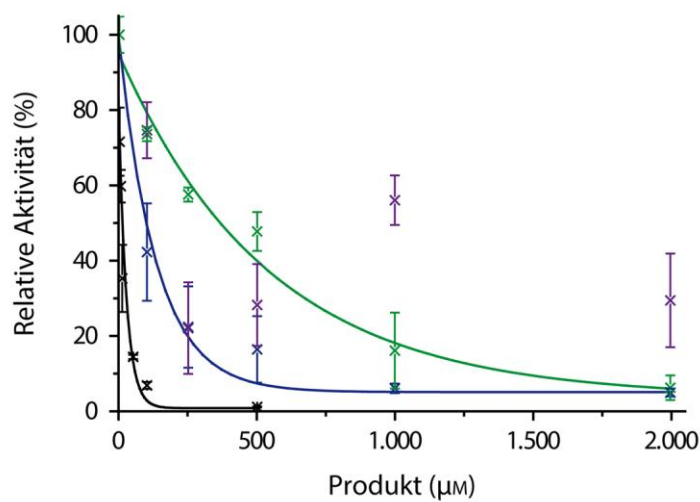
$$\Delta\Delta G_{ES^\ddagger} = -RT \ln[ (k_{cat1} / K_{m1}) / (k_{cat2} / K_{m2}) ]$$

mit  $R$  als allgemeine Gaskonstante ( $8,3145 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ ) und  $T$  als Reaktionstemperatur ( $35^\circ \text{C}$ ). Für dsDNA und Dinukleosid-Monophosphat<sup>[13]</sup> beträgt die Energiedifferenz nur  $2,5 \text{ kJ mol}^{-1}$ . Die Übergangszustände der ES-Komplexe beider Substrat-Varianten wären ungefähr gleich stabil. Der stabilisierende Effekt auf den Übergangszustand des im Dinukleosid-Substrat fehlenden Phosphats könnte somit weitestgehend durch die DNA-Umgebung ausgeglichen werden. Allerdings könnte sich, den hier gezeigten Messungen zufolge, die Stabilisierung durch die DNA-Umgebung mehr auf den  $K_m$ -Wert und weniger auf den  $k_{cat}$ -Wert auswirken.

### Produktinhibition

Für einige Radikal-SAM-Enzyme, die SAM als stöchiometrisches Cosubstrat verwenden (Klasse III), wurde ein Effekt der Produktinhibition durch die SAM-Spaltprodukte festgestellt.<sup>[302]</sup> Man nimmt an, dass dies ein regulatorischer Mechanismus *in vivo* ist, um die Aktivität der Enzyme einzuschränken.<sup>[263]</sup> Wird gleichzeitig das Enzym MTAN (5'-Methylthioadenosin / S-Adenosylhomocystein Nukleosidase) exprimiert, so kann diese die überschüssigen SAM-Spaltprodukte abbauen<sup>[303]</sup> und die vollständige katalytische Effizienz der Enzyme wiederherstellen.<sup>[304]</sup>

In diesem Zusammenhang wurde der Effekt der Produktinhibition an der SP-Lyase untersucht. Die Reaktionsansätze erfolgten mit AdoH, Methionin, beiden Spaltprodukten (AdoH und Methionin) und zur Kontrolle mit ungeschädigter dsDNA als Produkt der SP-Reparatur (*Abbildung 28*). Die  $IC_{50}$ -Werte, die der Produktkonzentration bei 50% relativer Aktivität entsprechen (*Abbildung 28*), liegen bei der DNA-Inhibition im Bereich von 10  $\mu M$  und bei der Inhibition mit den SAM-Spaltprodukten im Bereich von 100–400  $\mu M$ . Dieser Unterschied könnte dadurch erklärt werden, dass die SAM-Konzentration in den Ansätzen viel höher war als die DNA-Substrat-Konzentration.



**Abbildung 28:** Produktinhibition der SP-Lyase mit dsDNA und SAM-Spaltprodukten. (**Schwarz**) dsDNA (TT-15merODN11/9), (**Blau**) AdoH, (**Violett**) Methionin und (**Grün**) AdoH & Methionin. Reaktionsbedingungen: 1  $\mu M$  B.st. –SPL; 0,9  $\mu M = K_M$  dsDNA (SP-15mer-Fluo ODN8/9); 1 mM SAM; 1 mM Dithionit in 50 mM HEPES; 50 mM NaCl und 5% Glycerol (pH 7,5) bei 35 °C; 45 min. TT-dsDNA-Konzentrationen: 1  $\mu M$ ; 5  $\mu M$ ; 10  $\mu M$ ; 50  $\mu M$ ; 100  $\mu M$  und 500  $\mu M$ . AdoH/Methionin-Konzentrationen: 100  $\mu M$ ; 250  $\mu M$ ; 500  $\mu M$ ; 1 mM; 2 mM und 5 mM. Die Datenpunkte der Dreifachmessungen wurden zur Veranschaulichung mit der Boltzmann-Funktion gefittet, da diese die Daten am besten annäherte.

Vergleicht man die Inhibitions-Werte bei 500  $\mu M$  Produktkonzentration untereinander, so stellt man fest, dass AdoH als SAM-Spaltprodukt die größte Inhibitionswirkung zeigte (*Tabelle 5*). Dies ist erstaunlich, da man eigentlich erwartet, dass beide Produkte zusammen eine größere Inhibitionswirkung aufweisen, als nur eines der beiden Produkte. So wurde es in anderen Radikal-SAM-Enzymen, wie BioB und LipA, beobachtet.<sup>[302]</sup> Tatsächlich aber wiesen AdoH und Methionin zusammen die geringste Inhibitionswirkung auf.

Eine mögliche Erklärung für diesen inversen Effekt könnte sein, dass das SP mit gebundenem AdoH und Methionin noch geflippt werden könnte. Dies könnte wiederum bedeuten, dass die SP-Lyase mit AdoH und Methionin aktiv sein könnte. Im Hinblick auf den Inhibitions-Effekt könnte sich die Produkt-Inhibition vermutlich verstärken, wenn das Sporen-Photoprodukt nicht mehr geflippt würde, wenn nur AdoH oder nur Met gebunden wären.

**Tabelle 5:** Produktinhibitions-Werte der SPL bei einer Produktkonzentration von 500  $\mu\text{M}$  im Vergleich mit BioB und LipA. TT-dsDNA: ungeschädigte dsDNA.

Produkt (500 $\mu\text{M}$ )	Inhibition (%)		
	SPL	BioB <sup>[302]</sup>	LipA <sup>[302]</sup>
TT-dsDNA	100	–	–
AdoH	90	55	30
Methionin	70	65	70
AdoH & Methionin	60	95	65

Trotz dieser vagen Hypothese kann die Annahme getroffen werden, dass AdoH im aktiven Zentrum fest gebunden wird, da ansonsten die Inhibition mit AdoH nicht so stark sein könnte. Dies macht Sinn für die Hypothese der Regenerierung des SAM-Cofaktors; AdoH und Methionin müssten gebunden bleiben, um SAM regenerieren zu können. Allerdings ist es fraglich, ob die Spaltprodukte von SAM einen so starken Inhibitionswert aufweisen würden, wenn das Enzym SAM sofort nach der Reaktion regeneriert.

Zusammenfassend wurde gezeigt, dass sich die SP-Lyase, als potentiell Klasse-I-Enzym im Hinblick auf eine mögliche Produktinhibition anders verhält als Klasse-III-Radikal-SAM-Enzyme, die SAM nicht regenerieren.

## Fazit

Aus den Untersuchungen zur Enzym-Aktivität zeigte sich, dass das Phosphat zwischen den beiden Nukleotiden des Sporen-Photoprodukts eine kritische Rolle spielt. Das Phosphat könnte helfen den Schaden ins aktive Zentrum zu flippen und ihn dort über nicht-kovalente Wechselwirkungen zu Aminosäure-Resten zu stabilisieren. Fehlt das Phosphat, so hatte dies einen merklichen Einfluss auf den katalytischen Umsatz. Selbst die  $k_{\text{cat}}$ -Werte von SP-Dinukleosid-dsDNA-Substraten waren langsamer als von Dinukleosid-Monophosphat-Substraten. Die Werte nahmen jedoch mit steigender Länge des DNA-Substrats zu.

Obwohl SP-ssDNA schneller von der SP-Lyase repariert wurde, wurde SP-dsDNA effizienter umgesetzt. Dies wurde anhand von SP/AdoH-Verhältnissen gezeigt. Eine mögliche Interpretation ist, dass dsDNA das aktive Zentrum und damit mögliche transiente, organische Radikale am effektivsten vor dem Lösungsmittel schützen könnte. Dies macht Sinn, da dsDNA-Substrate schließlich dem natürlichen Substrat ähnlicher und zudem voluminöser sind als ssDNA oder SP-Dinukleosid. Mit der Berechnung der katalytischen Effizienz  $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$  konnte gezeigt werden,

dass die Stabilität des Enzym-Substrat-Komplexes mit Dinukleosid-dsDNA außerdem im selben Größenbereich liegt wie mit Dinukleosid-Monophosphat.<sup>[13]</sup>

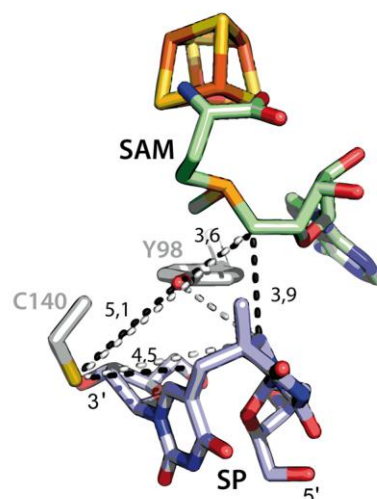
Die Bestimmung des  $K_m$ -Wertes zeigte, dass die SP-Lyase aus *G. stearothermophilus* und aus *G. thermodenitrificans* eine vergleichbare Affinität zu dsDNA-Substrat besitzen. Der Vergleich von  $k_{cat}$ - und  $V_{max}/2$ -Werten der beiden Enzyme legte zudem ein vergleichbares Reaktionsverhalten nahe.

Schließlich konnte mittels Produktinhibitionsstudien gezeigt werden, dass die Bindung von AdoH im aktiven Zentrum womöglich fest ist. Die relativ hohen Inhibitionswerte und die im Vergleich zur Lysin-2,3-Aminomutase<sup>[355]</sup> um mindestens zwei Größenordnungen kleineren  $k_{cat}$ -Werte<sup>[10,326]</sup> stellten zudem in Frage, ob SPL den SAM-Cofaktor tatsächlich zur Wiederverwendung in jedem Katalyse-Zyklus regenerieren könnte.

### 3.3. Mechanistische Studien

Wie in *Kapitel 1.6* bereits vorgestellt, ist der Mechanismus der SP-Reparatur nur bis zu einem bestimmten Punkt aufgeklärt. Nach der Spaltung des SAM-Cofaktors durch Aufnahme eines Elektrons aus dem 4Fe4S-Cluster kann das gebildete 5'-Desoxyadenosyl-Radikal (Ado<sup>•</sup>) das H<sub>proR</sub>-Atom von der C6-Position des Dihydrothymin-Restes im Sporen-Photoprodukt abstrahieren.<sup>[10-11,332]</sup> Das gebildete Substrat-Radikal fragmentiert, wodurch die Methylenbrücke gespalten wird und ein Methyl-Radikal am 3'-Thymin entsteht. Die strukturelle Nähe zu einem Cystein<sup>[8]</sup> im aktiven Zentrum (C140, *Abbildung 29*) wird genutzt, um von diesem ein H-Atom zu entfernen.<sup>[11,328]</sup> Die Abstände für diesen H-Atom-Transfer liegen im Bereich von 4 Å.<sup>[8]</sup> Die Distanz von C140<sup>•</sup> zum AdoH beträgt allerdings 8,0 Å<sup>[8]</sup> – sehr weit für einen H-Atom-Transfer, um das Ado<sup>•</sup> und möglicherweise SAM direkt zu regenerieren. In der Struktur konnte man jedoch ein Tyrosin (Y98, *Abbildung 29*) identifizieren, welches zwischen dem C140 und dem AdoH positioniert ist.<sup>[8]</sup> Die Abstände von circa 5 Å und 4 Å lassen vermuten, dass dieses Tyrosin als „Übermittler des Radikals“ fungieren könnte. Die Beteiligung des Y98 am Mechanismus wurde in diesem Kapitel untersucht. Anhand der Ergebnisse wird im darauffolgenden Kapitel diskutiert, ob der SAM-Cofaktor tatsächlich regeneriert werden könnte oder ob alternative Übertragungswege ebenfalls möglich wären, wie die Initiation der Radikalreaktion am Sporen-Photoprodukt durch das Y98<sup>•</sup> oder durch das C140<sup>•</sup>.





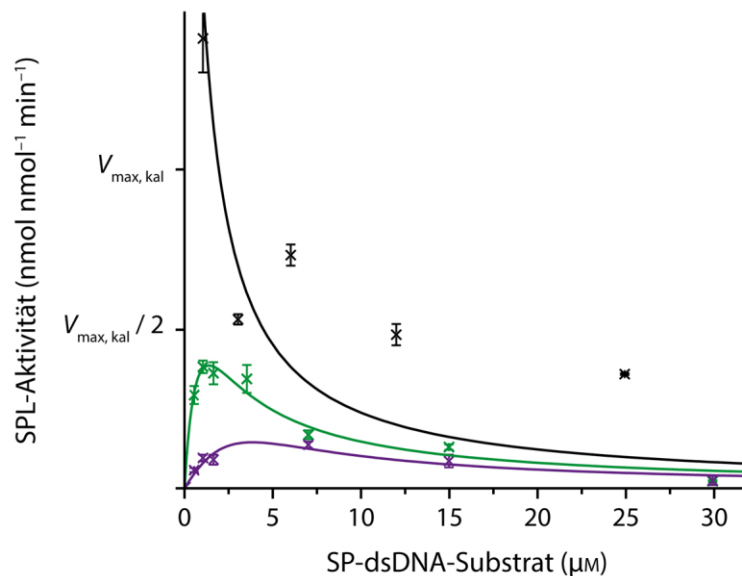
**Abbildung 29:** Einblick in das aktive Zentrum der SP-Lyase. Die Abstände zwischen den mechanistisch relevanten Positionen (schwarze Linien) sind in Ångström gegeben. Als mechanistisch relevante Positionen gelten das C5' des SAM-Cofaktors, das C6 des Dihydrothymin-Restes und die Methylengruppe des Sporen-Photoprodukts – nach Spaltung die Methylgruppe des Thymins. Außerdem C140, welches als H-Donor bereits bestätigt wurde<sup>[11,328]</sup> und Y98 als potentieller „Übermittler des Radikals“ von C140 zurück an das AdoH zur potentiellen Regenerierung des SAM-Cofaktors. Mögliche andere Übertragungswege sind in Weiß hervorgehoben; Abstände: C140 zu C5' von SAM 8,0 Å; Y98 zu C6 von Dihydrothymin des SP 3,8 Å; C140 zu C6 von Dihydrothymin des SP 6,4 Å. Der SAM-Cofaktor ist in Grün und das SP-Dinukleosid in Blau dargestellt. PDB 4FHD

### **Katalytische Effizienz der Aktivitätsmutanten C140A/G und Y98F**

Zur Untersuchung der potentiellen Rolle der Aminosäure-Reste C140 und Y98 wurden zunächst Mutanten kloniert, die bereits im *Kapitel 3.1* strukturell charakterisiert wurden. Nur drei Seitenketten-Radikale sind bislang bekannt, die sich direkt am Katalyse-Mechanismus ihres Enzyms beteiligen können: Glycyl-, Cysteinyl- und Tyrosyl-Radikale. Die Stabilität der drei Radikale ist dabei vergleichbar.<sup>[361]</sup> Tryptophan-Radikale kommen im CPD-Photolyase-System vor,<sup>[194]</sup> doch sind sie nicht direkt am Mechanismus beteiligt. C140A und Y98F werden hier deshalb als *Knock-Out*-Mutanten bezeichnet, da sie die Radikal-Funktion an der jeweiligen Position verloren haben sollten. Zum *Knock-Out* wurden Alanin und Phenylalanin gewählt, die strukturell ähnlich zu Cystein und Tyrosin sind. Die Mutation von Cystein zu Glycin (C140G) war ein Versuch, die Radikal-Funktion an dieser Position zu retten. Es wurde Glycin gewählt, da Tyrosin und Tryptophan eventuell zu sperrig sein könnten. Der Ersatz von Y98 war schwierig, da Tryptophan ebenfalls zu sperrig sein könnte, die Abstände mit Glycin zu groß werden könnten und Cystein mit dem benachbarten C140 eine Disulfidbrücke ausbilden könnte.

Die drei Aktivitätsmutanten C140A/G und Y98F wurden als Erstes auf ihre katalytische Effizienz untersucht. Als Vorbereitung zur  $K_m$ -Wert-Bestimmung wurden, wie zuvor beschrieben, zeit-aufgelöste Reaktionen durchgeführt, die zeigten, dass die lineare Anfangsgeschwindigkeit bis zu 60 min beziehungsweise 3 h aufrechterhalten wurde (*Appendix 3*). Sie zeigten allerdings auch,

dass der Umsatz der C140G-Mutante sehr gering war, wodurch der  $K_m$ -Wert nicht durch Endpunkt-Messungen bestimmt werden konnte, weil der Umsatz selbst nach 3 h zu klein war. Die Detektionsgrenze des HPLC-Systems würde sogar für die sensible Detektion der Fluoreszenz-dsDNA-Substrate unterschritten werden. Stattdessen wurden für die C140G-Mutante, die wie zuvor beschrieben, aufwendigeren Zeitreaktionen bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen durchgeführt und die linearen Anfangsgeschwindigkeiten (*Appendix 4*) daraus gegen die Substratkonzentrationen aufgetragen (*Abbildung 30*).



**Abbildung 30:** Michaelis-Menten-Diagramm der *B.st.* -SPL Aktivitätsmutanten. (**Grün**) C140A, (**Violett**) Y98F und (**Schwarz**) C140G. Reaktionsgeschwindigkeiten wurden in Abhängigkeit der Substratkonzentration aufgetragen und als Substratinhibition in Sigma-Plot (Enzyme Kinetics) 11.0 gefittet. Die Kurven wurden mittels der berechneten Maximalgeschwindigkeit  $V_{max,kal}$  (kal für kalkuliert) normiert, um die einzelnen  $K_m$ -Kurven direkt miteinander vergleichen zu können. Die  $R^2$ -Werte der Fitkurven sind 0,89 (C140A); 0,64 (Y98F) und 0,0 (C140G). Reaktionsbedingungen: 1  $\mu$ M SPL, 1 mM SAM, 1 mM Dithionit in 50 mM HEPES, 50 mM NaCl und 5% Glycerol (pH 7,5) bei 35 °C. Für C140A und Y98F wurden Dreifachmessungen mit 0,5  $\mu$ M; 1  $\mu$ M; 1,6  $\mu$ M; 3,5  $\mu$ M; 7  $\mu$ M; 15  $\mu$ M und 30  $\mu$ M dsDNA (SP-15mer-Fluo ODN8/9) für 45 min durchgeführt. Für C140G wurde pro Substratkonzentration (0,5  $\mu$ M; 1  $\mu$ M; 3  $\mu$ M; 6  $\mu$ M; 12  $\mu$ M; und 25  $\mu$ M) eine Zeitreaktion (30 min; 1 h; 1,5 h; 3 h; 4,5 h und 7 h) durchgeführt und die lineare Anfangsgeschwindigkeit daraus bestimmt (*Appendix 4*), welche hier aufgetragen wurde.

Überraschenderweise wiesen die  $K_m$ -Kurven keine übliche Form, die beispielsweise beim Wildtyp beobachtet wurde (*Abbildung 27*), auf (*Abbildung 30*). Anstatt bei hohen Substratkonzentrationen einen Sättigungswert zu erreichen,<sup>[350]</sup> sank die Aktivität der C140A- und Y98F-Mutante nach einem ersten, kurzen Anstieg. Dieser Effekt ist als Substratinhibition bekannt.<sup>[350]</sup> Mittels eines passenden Isotherms aus der Software Sigma-Plot (Enzyme Kinetics) 11.0 konnte aus diesen Kurven dennoch ein ungefähre  $K_m$ -Wert berechnet werden. Da nur sieben Datenpunkte gefittet wurden, sind die  $R^2$ -Werte mit 0,89 und 0,64 jedoch nicht optimal. Dies spiegelt sich im merklichen Fehler der berechneten Werte wieder (*Tabelle 6*). In der C140G-Mutante war der Substratinhibitions-Effekt noch weiter ausgeprägt, so dass nicht einmal ein kurzer Anstieg beo-

bachtet werden konnte (*Abbildung 30*). Die Aktivität fiel mit der Substratkonzentration. Mit dem Substratinhibitions-Isotherm konnte zwar ein Fit erstellt werden, doch ist er mit einem  $R^2$ -Wert von 0,0 nicht relevant. Der geschätzte  $K_m$ -Wert ist zur Verdeutlichung in *Tabelle 6* trotzdem gezeigt.

Der Effekt der Substratinhibition der *Knock-Out*-Mutanten könnte durch eine Blockade des Radikalzyklus im aktiven Zentrum erklärt werden. Das Radikal könnte nicht mehr zu der für die Initiierung des nächsten Zyklus optimalen Position „zurück geleitet“ werden. Dadurch müsste für jeden Reaktionszyklus ein neues SAM-Molekül gebunden und der Cluster erneut reduziert werden. Bei kleinen Substratkonzentrationen könnten die Mutanten mit dieser Situation noch ähnliche Umsatzgeschwindigkeiten wie das Wildtyp-Enzym erreichen; ab einer bestimmten DNA-Konzentration wäre dies nicht mehr möglich. Die aktive Tasche könnte mit steigender DNA-Konzentration zusehends abgesättigt werden, so dass beispielsweise der Austausch des, für den nächsten Katalyse-Zyklus notwendigen, SAMs beeinträchtigt wäre. Die Austauschrate des SAM-Cofaktors wäre gering und die Reaktionsgeschwindigkeit würde sinken anstatt wie im Wildtyp-Enzym zu steigen. Zusammengefasst könnte sowohl C140 als auch Y98 an der „Weiterleitung“ des Radikals im aktiven Zentrum beteiligt sein. Dies wurde als erster Hinweis auf eine mögliche Beteiligung des Tyrosin-Restes am Katalyse-Mechanismus gewertet.

Die SP/AdoH-Verhältnisse nach der Reaktion (*Tabelle 6*) bekräftigten, dass SAM in diesen Mutanten für jeden Katalyse-Zyklus neu gebunden werden muss, da mehr SAM gespalten als Sporen-Photoprodukt repariert wurde (Werte  $< 1$ ). Wildtyp-SPL konnte im Vergleich zwei SP-Moleküle pro SAM-Molekül umsetzen. Da die SPL-Enzyme in diesen Reaktionen nicht vollständig mit Substrat gesättigt waren, wurden die Verhältnisse, nicht wie in *Abbildung 26* aus der linearen Anfangsgeschwindigkeit, sondern aus einer über-Nacht-Messung bestimmt. Dadurch wurde der Endpunkt der Reaktion erfasst und es war möglich multiple Umsätze pro gebildetem AdoH-Molekül nachweisen zu können. Kürzlich wurden SP/AdoH-Verhältnisse für die beiden *Knock-Out*-Mutanten auch für Dinukleosid-Monophosphat-Substrate bestimmt.<sup>[356]</sup> Die Werte sind vergleichbar mit den hier gezeigten Ergebnissen.

**Tabelle 6:** Vergleich der  $K_m$ -,  $k_{cat,app}$ - und SP/AdoH-Werte der *B.st.* –SPL Aktivitätsmutanten.  $k_{cat,app}$  (zur Unterscheidung von  $k_{cat}$  bei 100-fachem Substrat-Überschuss) entspricht der apparenten Wechselzahl bei einer Substratsättigung von  $10 \times wtK_m$ . Die Bestimmung dieser Werte ist in *Appendix 5* gezeigt. SP/AdoH-Verhältnisse stammen aus der über-Nacht-Reaktion desselben Ansatzes.

SP-Lyase	$K_m$ ( $\mu M$ )	$k_{cat,app}$ ( $10^{-3} \text{ min}^{-1}$ )	$k_{cat,app}/K_m$ ( $M^{-1} s^{-1}$ )	SP/AdoH
<i>B.st.</i> –Wildtyp	$0,9 \pm 0,2$	$12,5 \pm 0,5$	232	2,0
<i>B.st.</i> –C140A	$1,1 \pm 0,8$	$4,1 \pm 0,2$	62	0,8
<i>B.st.</i> –Y98F	$11,3 \pm 32,8$	$2,3 \pm 0,4$	3	0,3
<i>B.st.</i> –C140G	$10^{-8} \pm 0,5$	$3,5 \pm 0,0$	–	> 2,0

Erstaunlicherweise konnte ein SP/AdoH-Verhältnis von > 2,0 für die C140G-Mutante detektiert werden. Scheinbar ist diese Mutante noch in der Lage den Katalysezyklus vollständig zu durchlaufen. Zusätzlich zu diesem Ergebnis vielen weitere, ungewöhnliche Effekte der C140G-Mutante in Aktivitäts- und Bindungsstudien auf. Diese werden im nächsten Abschnitt kurz näher beschrieben, weshalb hier nicht weiter darauf eingegangen wird.

Die aus den Substratinhibitions-Kurven bestimmten  $K_m$ -Werte der *Knock-Out*-Mutanten sind ebenfalls in *Tabelle 6* gegeben. C140A wies eine ähnliche Substrataffinität auf, wie der Wildtyp. In Y98F dagegen, erhöhte sich der  $K_m$ -Wert. Die Mutation zu Phenylalanin könnte die Bindung oder Ausrichtung des Sporen-Photoprodukts im aktiven Zentrum beeinträchtigen. Es ist möglich, dass die Konformationsänderung nach Bindung des Sporen-Photoprodukts im aktiven Zentrum (*Abbildung 16A*) nicht mehr vollzogen werden kann.

Aufgrund des Substratinhibitions-Effekts wurden die  $k_{cat}$ -Werte, für die ein sehr großer Substratüberschuss vorliegen sollte, aus Reaktionen mit einer Substratkonzentration von nur  $10 \times wtK_m$  durchgeführt. Diese Werte werden, zur Unterscheidung zum  $k_{cat}$ -Wert bei 100-fachem Substratüberschuss (*Tabelle 3*), als apparente Wechselzahl  $k_{cat,app}$  bezeichnet (*Tabelle 6*). Wie erwartet lagen die Werte der Aktivitätsmutanten unter denen des Wildtyps. Für die C140G-Mutante ist der Wert allerdings größer als aus den  $K_m$ -Messungen mit einem  $V_{max,kal}$ -Wert von etwa  $2 \times 10^{-5} \text{ nmol nmol}^{-1} \text{ min}^{-1}$  vermutet wurde.

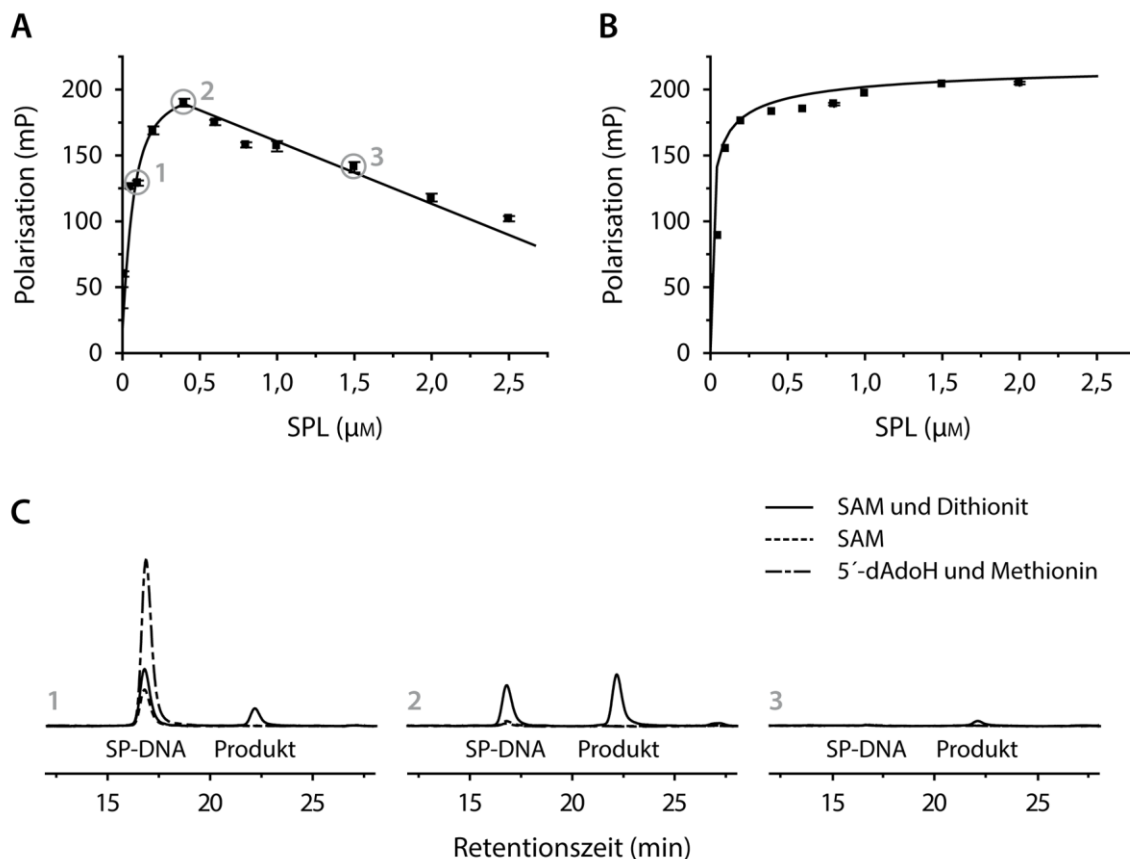
Da der  $k_{cat,app}$ -Wert des Wildtyps mit  $12,5 \text{ min}^{-1}$  sehr nah am  $k_{cat}$ -Wert aus *Tabelle 3* ( $14 \text{ min}^{-1}$ ) lag, wurde davon ausgegangen, dass die Enzyme mit einer Substratkonzentration von  $10 \times wtK_m$  weitestgehend gesättigt sind. Es wurden folglich die  $k_{cat,app}/K_m$ -Werte bestimmt, die die katalytische Effizienz in etwa wiedergeben. Aus diesen wurden, wie zuvor, die Unterschiede in der Energie des Übergangszustandes berechnet. C140A wäre mit einem  $\Delta\Delta G_{ES}^\ddagger$  von  $3,4 \text{ kJ mol}^{-1}$  nur gering weniger stabil als der Wildtyp. Der Energieunterschied der Y98F-Mutante würde dagegen

11,1 kJ mol<sup>-1</sup> betragen. Dies lässt erneut vermuten, dass neben dem offensichtlichen Radikalblock auch die Stabilität der Sporen-Photoprodukt-Ausrichtung im aktiven Zentrum gestört sein könnte. Dies könnte, wie bereits angesprochen, mit der Konformationsänderung nach Substrat-Bindung in Zusammenhang stehen.

### **Die Mutante C140G**

In den vorangehenden Kapiteln wurde beschrieben, dass die C140G-Mutante ein ungewöhnliches CD-Spektrum im nahen UV und ein merkwürdiges, teils widersprüchliches katalytisches Verhalten aufwies. Auch bei der Messung der Dissoziationskonstante  $K_d$  mittels Fluoreszenz-Polarisation traf dies zu. In diesen Messungen wurde die dsDNA-Konzentration konstant gehalten, während die Proteinkonzentration zunahm. Ähnlich wie bei der Bestimmung des  $K_m$ -Wertes sollte sich die Kurve an einen Maximal-Wert annähern.<sup>[350]</sup> Dies konnte mit ungeschädigter dsDNA verfolgt werden (*Abbildung 31B*), doch nicht mit SP-dsDNA (*Abbildung 31*).

Mit SP-dsDNA sanken die Polarisationswerte ab einer bestimmten Proteinkonzentration wieder (*Abbildung 31A*). Da in diesen Messungen kein Dithionit zugegeben wurde, kann dieser Effekt nicht durch die Reparatur des Sporen-Photoprodukts erklärt werden. Aus diesem Grund wurden drei Konzentrationsverhältnisse (DNA:SPL 1:2 (1), 1:8 (2) und 1:30 (3) in *Abbildung 31A*) ausgewählt, die nach 44-minütiger Inkubation mit SAM, AdoH und Methionin oder mit SAM und Dithionit mit Hilfe der HPLC analysiert wurden (*Abbildung 31C*). Die Ergebnisse zeigten, dass das Enzym die DNA offensichtlich abbaut oder zumindest die fluoreszierenden Eigenschaften des Farbstoffs, mit dem die DNA markiert war, beeinträchtigt. Dies könnte das merkwürdige Verhalten in den Reaktionen zur Messung der katalytischen Effizienz erklären. Die Schädigung des DNA-Substrats findet jedoch scheinbar nur statt, wenn der SP-Schaden eingebaut ist; vermutlich weil dieser in das aktive Zentrum geflippt wird. Dies würde bestätigen, dass eine TT-Sequenz nicht in das aktive Zentrum geflippt würde und das Flippen des Sporen-Photoprodukts auch stattfinden könnte, wenn AdoH und Methionin anstatt des kompletten SAM-Cofaktors gebunden sind. Durch was dieser Effekt hervorgerufen wird, konnte nicht geklärt werden. Auffällig war jedoch, dass er nur in der *B.st.* –SPL C140G-Mutante vorkam und nicht in der *G.tn.* –SPL C140G-Mutante. Die Ursache könnte mit dem 4Fe4S-Cluster oder einer neuen CD-aktiven Spezies zusammen hängen, da das CD-Spektrum im nahen UV im Bereich, der dem Cluster zugewiesen wurde, von den anderen SPL-Varianten abweicht (*Abbildung 23B*). Dem wurde allerdings nicht weiter nachgegangen.



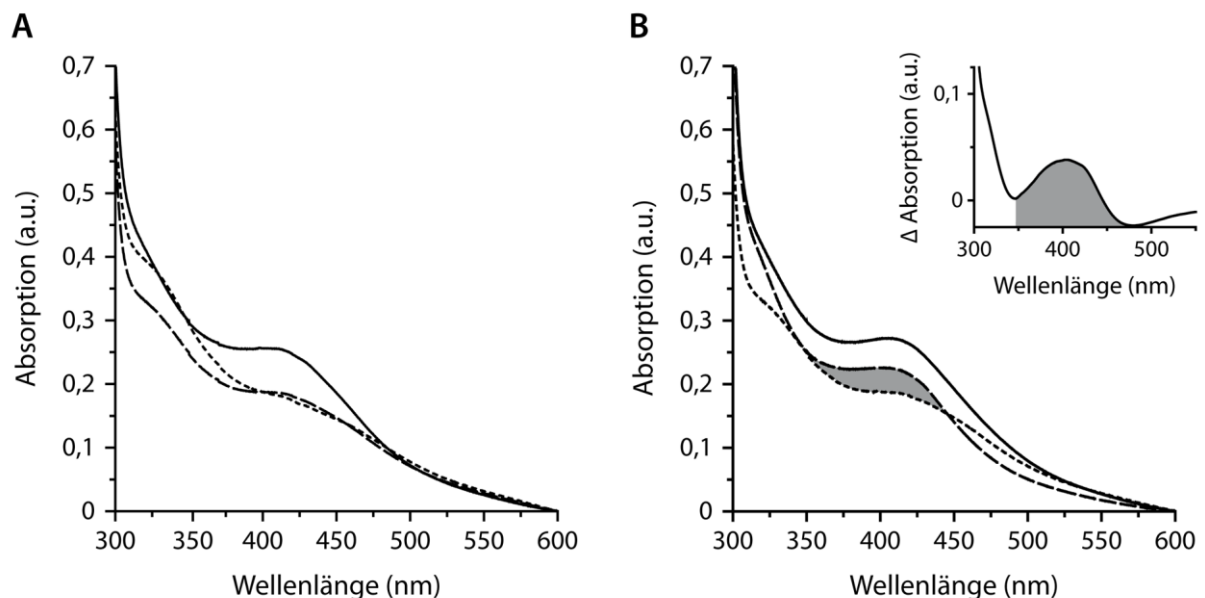
**Abbildung 31:** Analyse der *B.st.*-SPL C140G-Mutante. Fluoreszenz-Polarisations-(FP)-Messungen in Abhängigkeit steigender SPL-Konzentrationen mit SP-dsDNA (13mer ODN1/12) **(A)** und ungeschädigter dsDNA (TT-13mer ODN13/12) **(B)** Reaktionsbedingungen sind in Kapitel 4.6 (S. 142) gegeben. **(C)** HPLC-Analyse von Reaktionsansätzen mit oder ohne Dithionit und mit SAM oder AdoH und Methionin (Met) bei DNA:SPL-Verhältnissen von 1:2 **(1)**, 1:8 **(2)** und 1:30 **(3)** aus der FP-Messung. Reaktionsbedingungen: 1/4/15  $\mu\text{M}$  SPL; 0,5  $\mu\text{M}$  dsDNA (SP-15mer-Fluo ODN8/9), 1 mM SAM/AdoH/Methionin und 1 mM Dithionit in 50 mM HEPES, 30 mM NaCl, 5% Glycerol (pH 7,5) bei 35 °C für 45 min.

### UV-Vis-spektroskopischer Ansatz zum Nachweis von Aminosäure-Radikalen

Tyrosyl-Radikale sind trotz ihres hohen Oxidationspotentials als sehr stabile Radikal-Spezies aus der Ribonukleotid-Reduktase und dem Photosystem II bekannt.<sup>[362-363]</sup> Dadurch konnten sie bereits mittels UV-Vis-Spektroskopie mit einem charakteristischen Absorptionsmaximum bei 410 nm nachgewiesen werden.<sup>[364-366]</sup> Auch Cysteiny-Radikale absorbieren bei einer Wellenlänge von 330 nm und können dadurch im UV-Vis-Spektrum detektiert werden.<sup>[367]</sup> Da basierend auf den katalytischen Untersuchungen der Aktivitätsmutanten Hinweise erhalten wurden, dass C140 und Y98 als „Radikal-Überträger“ fungieren könnten, sollte versucht werden diese Radikale in der SP-Lyase im UV-Vis zu detektieren. Besonders plausibel wäre der Nachweis eines Radikal-Signals im UV-Vis, wenn Y98 den nächsten Zyklus initiieren würde, da das Radikal dann am Tyrosin oder Cystein bis zum nächsten Katalyzyklus zwischengespeichert werden müsste.

Deshalb wurden UV-Vis-Spektren mit der *B.st.* –SPL unter Reaktions-Assay-Bedingungen bei einer Substrat-Konzentration im Bereich des  $K_m$ -Wertes aufgenommen (*Abbildung 32B*). Die  $K_m$ -Wert-Konzentration wurde ausgewählt, da sie ein guter Startpunkt für die Substrat-Konzentration in neuen Experimenten ist.<sup>[350]</sup> Die Spektren stiegen zu Werten von 300 nm hin an, aufgrund der hohen Absorption des Proteins bei 280 nm. Zur Kontrolle wurden die Spektren der Reaktionsansätze mit denen der Reduktion des  $4\text{Fe}4\text{S}^{2+}$ -Clusters mit Dithionit (*Abbildung 32A*) verglichen;  $4\text{Fe}4\text{S}$ -Cluster verlieren ihre Absorptions-Eigenschaften im (1+)-Oxidations-zustand.<sup>[342]</sup>

Die Evaluierung war jedoch schwierig. Die Detektion eines Cysteinyl-Radikals wurde erschwert, da Dithionit, welches zur Reduktion des Clusters und somit zur Initiierung der Reaktion zugegeben wurde, eine starke Absorption in diesem Bereich aufweist.<sup>[368]</sup> Allerdings war Dithionit nach der 3-stündigen Inkubation weitestgehend abgebaut (*Abbildung 32A*, Schulter bei 325 nm), so dass sich ein  $\text{Cys}^{\bullet}$ -Signal in der UV-Vis-Messung der Wildtyp-Reparatur-Reaktion (*Abbildung 32B*) hätte nachweisen lassen sollen. Dies war jedoch nicht der Fall; es war kein definierter Peak sondern nur eine kleine Schulter bei 325 nm zu erkennen, die auch durch ein Dithionit- oder ein zusätzliches  $\text{FeS}$ -Cluster-Signal, wie in *Kapitel 3.1* (*Abbildung 22*), hervorgerufen worden sein könnte.



**Abbildung 32:** UV-Vis-Spektren von *B.st.* –SPL unter reduzierenden Bedingungen (**A**) und Reaktions-Assay-Bedingungen (**B**). (**A**) 3 g L<sup>-1</sup> SPL in der Apo-Form vor Reduktion (—) und nach Reduktion von Wildtyp (---) und Y98F (- -) mit 3 mM Dithionit für 3 h bei 35 °C. (**B**) 3 g L<sup>-1</sup> SPL mit 150 µM SAM und 462 µM SP-Dinukleosid (entspricht  $K_m$  von Dinukleotid)<sup>[13]</sup> (—) und nach Initiierung der Reaktion von Wildtyp (---) und Y98F (- -) mit 3 mM Dithionit für 3 h bei 35 °C. Die Messungen erfolgten in 50 mM HEPES, 210 mM NaCl und 5% Glycerol (pH 7,5). Die erhaltenen Assay-Spektren von Wildtyp und Y98F wurden voneinander abgezogen und als Differenzspektrum oben rechts dargestellt. Der Peak bei 410 nm könnte einem Tyrosyl-Radikal zugewiesen werden.<sup>[364-366]</sup>

Das 410-nm-Signal des Tyrosyl-Radikals könnte von dem des 4Fe4S-Clusters bei 420 nm überlagert werden. Zur negativen Kontrolle wurden deshalb auch Spektren der Y98F-Mutante aufgenommen. In der Reduktions-Kontrolle (*Abbildung 32A*) ist eine deutliche Abnahme des 4Fe4S<sup>2+</sup>-Clustersignals bei 420 nm zu erkennen, was auf eine effiziente Reduktion des Clusters in beiden SPL-Varianten hindeuten könnte. Unter der Voraussetzung, dass sich der Cluster unter reduktiven Bedingungen in beiden SPL-Varianten gleich verhält, könnte ein Unterschied in den Spektren der Reaktionsansätze auf ein etwaiges Tyrosyl-Radikal zurückführbar sein. Tatsächlich konnte ein Unterschied detektiert werden. Um den Signalunterschied zu verdeutlichen, wurde ein Differenzspektrum des Wildtyps und der Y98F-Mutante erstellt (*Abbildung 32B*, grau markiert). Dieses zeigte ein klares Absorptionsmaximum im Bereich von 410 nm. Diese Wellenlänge ist charakteristisch für ein Tyrosyl-Radikal.<sup>[364-366]</sup> Die Signalintensität war nur sehr klein, doch könnte dies zu dem geringen Umsatz von 5,5% SP-Dinukleosid (0,05 nmol nmol<sup>-1</sup>) passen. Die Mutante wies eine etwa gleiche Umsatz-Rate von 3,6% (0,04 nmol nmol<sup>-1</sup>) auf.

Diese Signal-Interpretation war jedoch nicht eindeutig, da der Peak nicht so scharf beziehungsweise schmal war wie für Tyrosyl-Radikale zu erwarten wäre.<sup>[364-366]</sup> Bevor das Signal jedoch anderweitig gedeutet wurde, wurden die Bedingungen verwendet, um eine Suche nach organischen Radikalen mit der EPR-Spektroskopie zu starten.

### ***Suche nach organischen Radikalen mit der EPR-Spektroskopie***

Mit dem scheinbar erfolgreichen UV-Vis-Ergebnis wurde eine Kooperation mit der Arbeitsgruppe von *Prof. Dr. Stefan Weber* (Universität Freiburg) begonnen, um das Tyrosyl-Radikal mit Hilfe der sensitiveren EPR-Spektroskopie (engl.: *electron paramagnetic resonance*) zu detektieren. Die Messungen wurden von *Lorenz Heidinger* durchgeführt und zusammen mit *Dr. Erik Schleicher* evaluiert.

In der EPR-Spektroskopie wird die Absorption einer Substanz von elektromagnetischer Strahlung im Bereich von 3–400 GHz (Mikrowellen-Strahlung) in einem äußeren magnetischen Feld gemessen (= magnetische Resonanz).<sup>[342,369]</sup> Die gemessenen Substanzen müssen dafür ungepaarte Elektronenspins besitzen. Je schneller die Teilchen nach Anregung mit der Mikrowellen-Strahlung wieder relaxieren, umso niedriger sollte die Temperatur der Messung sein (circa < 20 K), damit ein Signal detektiert werden kann. Anorganische Substanzen, wie auch ein 4Fe4S-Cluster, sind Beispiele für derartige Systeme. Organische Radikale dagegen geben üblicherweise bereits bei höheren Temperaturen (circa 80–100 K) ein messbares Signal. Ein signifikanter Parameter in der EPR-Spektroskopie ist der g-Faktor,<sup>[369]</sup> welcher der globalen, elektronischen Struktur des paramagnetischen Moleküls entspricht und häufig zu dessen



Identifikation eingesetzt wird. Dieser ist spezifisch für Elektronen in einer definierten Umgebung und liegt für organische Radikale bei  $g \sim 2$ . Er wird aus der Mikrowellen-Frequenz  $\nu$  und der magnetischen Feldstärke  $B$  nach folgender Formel bestimmt:<sup>[369]</sup>

$$g = h\nu / \mu_B B$$

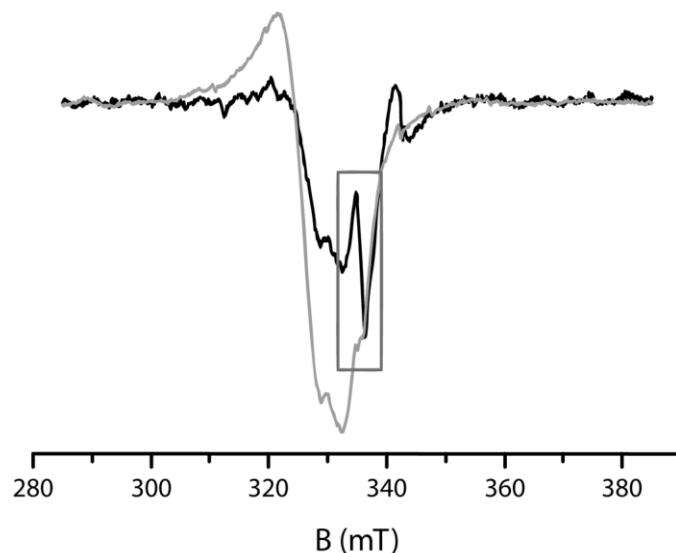
mit  $h$  als Planck-Konstante ( $6,6261 \times 10^{-34} \text{ J s}$ ) und  $\mu_B$  als Bohr'sches Magneton ( $9,274 \times 10^{-24} \text{ J T}^{-1}$ ).  $g$ -Werte können auch dazu verwendet werden genauere Informationen über die Radikale und ihre lokale Struktur zu erhalten,<sup>[370]</sup> wie beispielsweise ob Wasserstoffbrücken-Bindungen ausgebildet werden.<sup>[371-372]</sup> So weit konnten die gemessenen Signale bis jetzt nicht ausgewertet werden. In dieser Arbeit wurde sich darauf konzentriert, die Reaktionsbedingungen zur Messung von organischen Radikal-Intermediaten zu optimieren.

Die ersten EPR-Messungen wurden mit *B.st.* –SPL Wildtyp und Y98F als Negativ-Kontrolle für ein mögliches Tyrosyl-Radikal durchgeführt. Die Reaktionsbedingungen entsprachen denen des UV-Vis-Versuches (*Abbildung 32*) mit verdoppelten Protein- und Substrat-Konzentrationen. Es wurden Aufnahmen nach 30-minütiger und 3-stündiger Reaktion bei 35 °C gemessen. Es konnte jedoch nur die Reduktion des FeS-Clusters und die begleitende Umwandlung vom 3Fe4S-Cluster zum 4Fe4S-Cluster bei 10 K verfolgt werden. Die Spektren wurden in *Kapitel 3.1* (*Abbildung 20*) gezeigt. Bei 80 K wurde kein Signal detektiert. Die Messungen ließen jedoch vermuten, dass Dithionit als radikalisches Reduktionsmittel der Reaktion ein Störsignal senden könnte.

Es wurden zunächst einige Testversuche durchgeführt, um die Reaktionsbedingungen für die EPR-Spektroskopie zu optimieren. Um die Konzentration eines möglichen organischen Radikals in der Reaktionslösung zu erhöhen, ist es sinnvoll, die Enzymkonzentration zu maximieren. Darum wurde für die nachfolgenden Messungen die SP-Lyase aus *G. thermodenitrificans* verwendet, deren Expressionsausbeuten wesentlich höher waren als für *B.st.* –SPL. Dadurch konnten höhere Proteinkonzentrationen eingesetzt werden. *G.tn.* –SPL wurde zudem rekonstituiert, um die vollständige Cluster-Beladung des Enzyms mit FeS-Clustern sicher zu stellen. Wie aus Vorversuchen (*Kapitel 3.1*) bekannt, reicht eine geringe Dithionit-Konzentration (zum Beispiel 2-facher Überschuss) nicht für die effektive Reduktion des Clusters aus. Ein mindestens 10–20-facher Überschuss wird benötigt. Um jedoch ein mögliches störendes Signal des überschüssigen Dithionits, welches nach erfolgter Reduktion nicht mehr benötigt wird, zu minimieren, wurde oxidiertes Glutathion zur Abreaktion gewählt. Unter anaeroben Bedingungen reduziert Dithionit die Disulfid-Brücke im oxidierten Glutathion und wird dabei selbst abgebaut.<sup>[373]</sup> Im UV-Vis wurde die Reaktion zwischen oxidiertem Glutathion und Dithionit getestet und eine erfolgreiche Abreaktion nach nur wenigen Minuten beobachtet. Oxidiertes Glutathion konnte nun

in die Reaktionslösung gegeben werden, um Dithionit abzufangen. Allerdings stellte sich zunächst die Frage, ob es die Reparaturreaktion der SP-Lyase negativ beeinflusst. Eine Testreaktion mit der SP-Lyase zeigte jedoch, dass Glutathion keinen Einfluss auf die SPL-Aktivität hatte.

Mit diesen Optimierungsschritten wurde eine neue Reaktionsreihe gestartet (*Abbildung 33*). Die Reaktionen wurden für 3 h inkubiert, da die Kinetik, wie aus den letzten Kapiteln bekannt, nur sehr langsam war. Zur weiteren Optimierung wurde zudem dsDNA als Substrat verwendet – ebenfalls mit einer Konzentration, die dem  $K_m$ -Wert entspricht. Neben dem bislang verwendeten SP-13mer-Substrat wurde auch eine Reaktion mit SP-39mer-dsDNA angesetzt, die in einem später beschriebenen Assay als effektiveres Substrat entdeckt wurde (*Kapitel 3.5, Abbildung 49*). Als negative Kontrolle wurde ein Reaktionsansatz mit ungeschädigter 13mer-dsDNA verwendet. Die Proben wurden nach der Reaktion in der Glove-Box in EPR-Röhrchen abgefüllt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und auf Trockeneis zur Universität Freiburg geschickt.

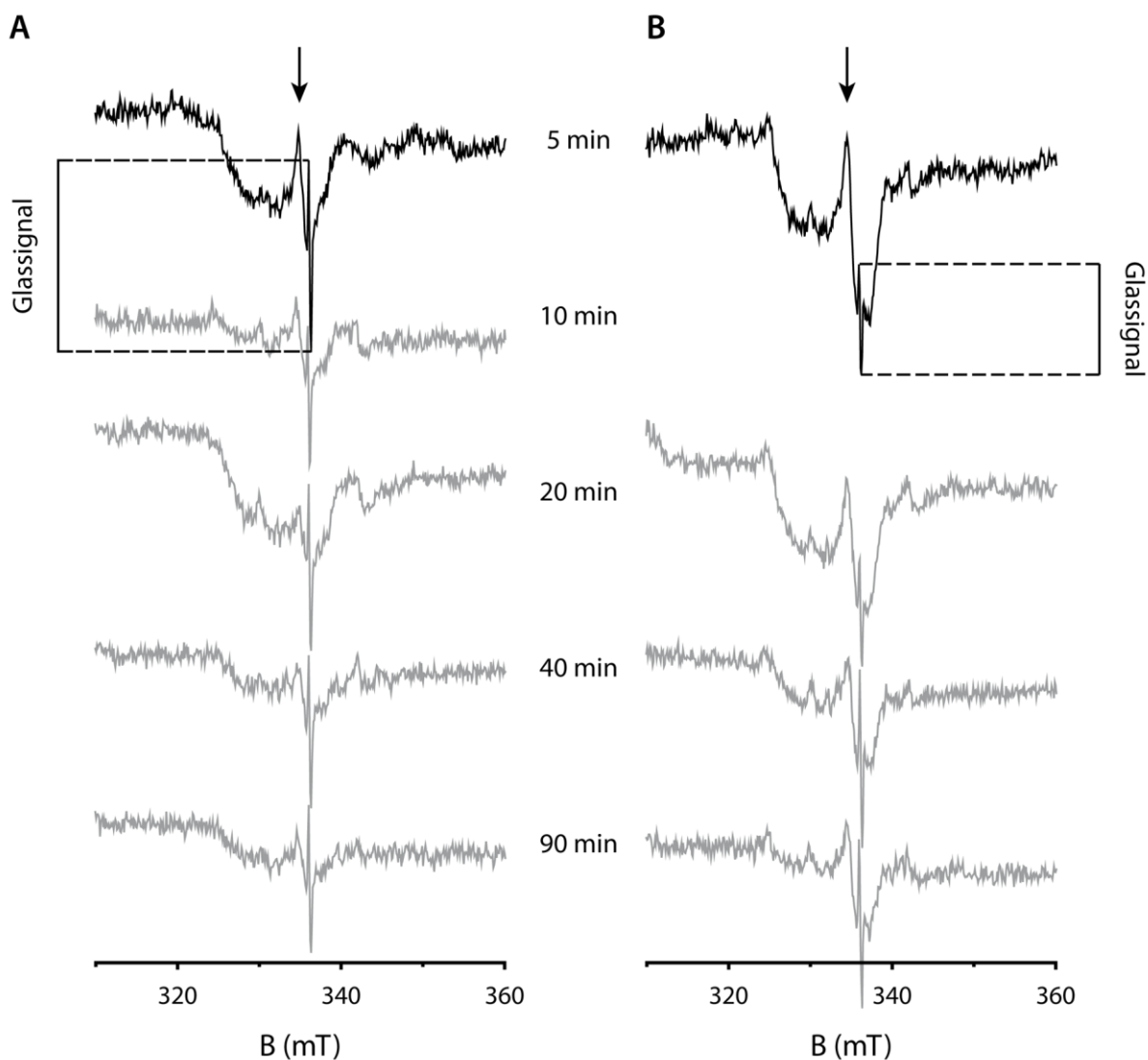


**Abbildung 33:** *Continuous-Wave-EPR*-Messung einer 3-h-*G.tn.*-SPL-Reaktion mit dsDNA. Reaktion mit SP-dsDNA (39mer ODN1/4/5) (**Schwarz**) und mit TT-dsDNA (13mer ODN13/2) (**Grau**). Ein potentiell Signal eines organischen Radikals ( $g \sim 2$ ) ist hervorgehoben. Reaktionsbedingungen: 140  $\mu\text{M}$  rekonstituierte SPL, 280  $\mu\text{M}$  dsDNA (entspricht  $K_m$ -Wert), 1 mM SAM, 3 mM Dithionit in 50 mM HEPES, 200 mM NaCl und 5% Glycerol (pH 7,5) bei 35 °C für 3 h. Nach 40 min wurden je 3 mM oxidiertes Glutathion zugegeben, um Dithionit abzufangen. Die Proben wurden in der Glove-Box in EPR-Röhrchen gefüllt, schockgefroren und auf Trockeneis zur Universität Freiburg geschickt. EPR-Messungen: Temperatur 13 K; Mikrowellen-Frequenz: 9,401 GHz (SP-dsDNA) und 9,395 GHz (TT-dsDNA); Mikrowellen-Leistung: 40 dB. Die Spektren sind basislinienkorrigiert.  $B$  = Magnetische Feldstärke in Milli-Tesla (mT)

In einer *Continuous-Wave-EPR*-Messung (cwEPR), die empfindlicher ist als die zuvor verwendete 2-Puls-Hahn-Echo-Methode, konnte mit diesen Reaktionsbedingungen tatsächlich bei 13 K ein schwaches Signal detektiert werden (*Abbildung 33*). Da der  $g$ -Faktor ungefähr bei zwei lag, könnte es sich um ein organisches Radikal handeln. Leider war das Signal aber so schwach, dass es

sich kaum vom Hintergrund abhob. Zudem wurde es nur für das 39mer-dsDNA-Substrat beobachtet; mit beiden 13mer-dsDNA-Substraten, mit oder ohne das Sporen-Photoprodukt, wurden keine Signale gemessen. Ebenfalls konnte kein Signal bei 80 K detektiert werden. Dies ist nicht notwendigerweise ein Ausschlussgrund für ein organisches Radikal. Schnellere Relaxationszeiten wurden bereits für das Tyrosyl-Radikal in der Ribonukleotid-Reduktase berichtet.<sup>[366]</sup> Diese können aufgrund der Nähe zum Eisen-Zentrum resultieren. Ein potentielles Tyrosyl-Radikal in der SP-Lyase könnte daher aufgrund der Nähe zum 4Fe4S-Cluster ebenfalls schnellere Relaxationszeiten aufweisen und damit nur bei niedrigen Temperaturen detektierbar sein.

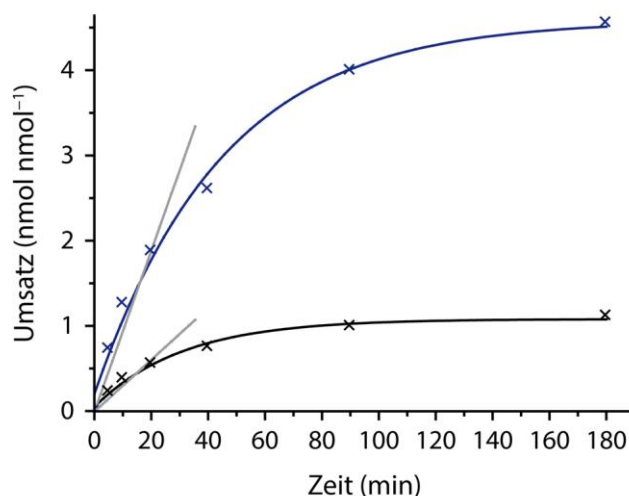
Um die Radikalkonzentration noch weiter zu erhöhen und damit die Signalstärke zu optimieren, wurde als nächstes eine Reaktionsreihe bei unterschiedlichen Zeitpunkten vorbereitet (*Abbildung 34*). Damit sollte der Zeitpunkt mit höchster Radikalkonzentration bestimmt werden. Um die Reaktionsansätze unter gleichen Reduktionsbedingungen der SP-Lyase zu starten, wurde das Protein mit Dithionit 40 min vor der Reaktion reduziert. Diese wurde dann durch Zugabe des dsDNA-Substrats, des SAM-Cofaktors und des Glutathions zur Abreaktion des Dithionits initiiert. Als Substrat wurde diesmal nur das SP-39mer gewählt und als Negativ-Kontrolle ungeschädigte 13mer-dsDNA. Es wurden jeweils Proben nach 5 min, 10 min, 20 min, 40 min und 90 min abgenommen, im EPR-Röhrchen schockgefroren und in flüssigem Stickstoff persönlich zur Universität Freiburg gefahren. Auf diese Weise sollte sichergestellt werden, dass die möglichen Enzym-Radikale nicht durch den Temperatur-Wechsel von flüssigem Stickstoff auf Trockeneis Schaden nehmen könnten.



**Abbildung 34:** Continuous-Wave-EPR-Messungen von *G.tn.* –SPL-Zeitreaktionen mit dsDNA. **(A)** Messungen mit SP-dsDNA (39mer ODN1/4/5), **(B)** Messungen mit TT-dsDNA (13mer ODN13/2). Potentielle organische Radikal-Signale sind mit einem Pfeil hervorgehoben (circa 335 mT,  $g \sim 2$ ). Die Signalstärke liegt im Größenbereich des Glassignals bei 337 mT. Reaktionsbedingungen: 140  $\mu$ M rekonstituierte SPL wurden mit 5 mM Dithionit bei 35 °C für 40 min reduziert. Die Reaktion wurde gestartet durch Zugabe von 280  $\mu$ M dsDNA (entspricht  $K_m$ -Wert), 1 mM SAM und 5 mM Glutathion in 50 mM HEPES, 200 mM NaCl und 5% Glycerol (pH 7,5). 85  $\mu$ L Aliquots wurden bei 5 min, 10 min, 20 min, 40 min und 90 min entnommen, in der Glove-Box in EPR-Röhrchen abgefüllt, schockgefroren und in einem Transport-Dewar, gefüllt mit flüssigem Stickstoff, zur Universität Freiburg gefahren. 4  $\mu$ L Aliquots des SP-Ansatzes wurden auf der HPLC analysiert. EPR-Messungen: Temperatur 80 K; Mikrowellen-Frequenz:  $\sim 9,39$ – $9,40$  GHz; Mikrowellen-Leistung: 35 dB.  $B$  = Magnetische Feldstärke in Milli-Tesla (mT)

Die cwEPR-Spektren der Zeitreaktionen zeigten dieses Mal Signale bei  $g \sim 2$  (Pfeile in *Abbildung 34*) bereits bei 80 K. Diese Signale nahmen mit zunehmender Zeit ab, was für ein organisches Radikal, welches am Mechanismus beteiligt sein könnte, zu erwarten wäre. Die Abnahme der Signalintensität korrelierte sehr gut mit der Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit des SP-Umsatzes (*Abbildung 35*). Allerdings war die Signalstärke nur sehr klein und lag im Bereich des Glassignals. Dieses ist in EPR-Spektren normaler Signalintensität üblicherweise nur

schwach sichtbar. In den hier gezeigten cwEPR-Spektren kann man es jedoch gut als scharfe Linie erkennen.



**Abbildung 35:** HPLC-Auswertung der SPL-Zeitreaktion für EPR-Aktivitäts-Messungen mit SP-39mer-dsDNA. Der SP-Umsatz (**Schwarz**) und die Produktion von AdoH (**Blau**) während der Reaktion mit SP-dsDNA wurden gemessen. Für den SP-Umsatz wurde eine Anfangsgeschwindigkeit  $V$  von  $0,0304 \pm 0,0015 \text{ nmol nmol}^{-1} \text{ min}^{-1}$  ( $p < 0,0002$ ) und für die AdoH-Produktion von  $0,095 \pm 0,004 \text{ nmol nmol}^{-1} \text{ min}^{-1}$  ( $p < 0,0002$ ) bestimmt (graue Fitgeraden). Reaktionsbedingungen siehe *Abbildung 34*.

Überraschenderweise konnten die Signale nicht nur in den Proben mit SP-39mer-dsDNA detektiert werden, sondern auch in der eigentlichen Negativ-Kontrolle mit ungeschädigter 13mer-dsDNA (*Abbildung 34B*). Nimmt man an, dass das Glassignal in allen Proben gleiche Intensität hat, dann wären die Signale mit ungeschädigter DNA sogar größer als mit SP-DNA. Das potentielle organische Radikal würde in ungeschädigter DNA vermutlich langsamer abgebaut werden. Dieses Ergebnis warf nun die Frage nach der Art des Radikals auf. Ein Tyrosyl-Radikal wäre zwar nicht ausgeschlossen, aber aus den bislang publizierten, mechanistischen und theoretischen Studien war nicht zu erwarten, dass das Ado<sup>•</sup> ein Tyrosyl-Radikal generiert. Da das Cystein nur über das Tyrosin oder ein gebundenes Sporen-Photoprodukt erreicht werden könnte, wäre die Wahrscheinlichkeit für ein C140<sup>•</sup> gering. Es bliebe noch die Möglichkeit eines Ado<sup>•</sup>, welches mit gebundener, ungeschädigter dsDNA durch die entkoppelte SAM-Spaltung gebildet werden könnte. Dies wäre sehr erstaunlich, da dieses Radikal sehr reaktiv ist<sup>[16,298]</sup> und aufgrund seiner Instabilität in keinem Radikal-SAM-Enzym-System detektiert werden konnte. Bislang konnte nur ein stabileres Ado<sup>•</sup>-Analogon bei niedrigen EPR-Temperaturen in der Lysin-2,3-Aminomutase gemessen werden.<sup>[374]</sup>

Die Messungen könnten nochmals bei niedrigeren Temperaturen vermessen werden, um dadurch das Signal eventuell zu verstärken. Vorerst wurde jedoch eine neue Reaktionsreihe angesetzt, in der die Proteinkonzentration nochmals erhöht wurde. Mit einer SPL-Konzentration von etwa

$8 \text{ g L}^{-1}$  und einer DNA-Konzentration von fast  $400 \text{ }\mu\text{M}$  wurde damit aber die Grenze der am höchsten einsetzbaren Konzentrationen erreicht, da die SP-Lyase in der Stock-Lösung bei Konzentrationen  $> 10 \text{ g L}^{-1}$  ausfiel. Außerdem wurde versucht die Radikalkonzentration durch eine Reaktionszeit von 2,5 min zu erhöhen. Der manuell pipettierte Reaktionsstart und –stopp wurde unter diesen 2,5 min sehr ungenau, vor allem da das Abfüllen in die EPR-Röhrchen eine gewisse Zeit in Anspruch nahm. Die wichtigste Optimierung in dieser Reaktionsreihe war jedoch der Einsatz von besseren Kontrollen. Es wurden nicht nur Wildtyp-Reaktionen mit SP-39mer-dsDNA und mit ungeschädigter 13mer-dsDNA angesetzt, sondern auch Negativ-Kontrollen ohne DNA, mit SAM und ohne DNA, ohne SAM. Letztere entsprach reduzierter Apo-SPL. Alle Proben wurden gleichlange mit Dithionit reduziert und mit Glutathion zum Reaktionsstart 2,5 min inkubiert. Auf diese Weise sollte ein Glutathion-Radikal ausgeschlossen werden können. Zusätzlich wurden dsDNA-Ansätze mit den Aktivitätsmutanten Y98F und C140A vorbereitet.

Wiederum zeigten die cwEPR-Spektren potentielle organische Radikale bei  $g \sim 2$  (Pfeile in *Abbildung 36*). Die Signalintensität im Wildtyp war erneut stärker mit ungeschädigter dsDNA (TT-Assay) als mit SP-dsDNA (SP-Assay) mit dem scharfen Glassignal ( $337 \text{ mT}$ ) als Vergleichsgröße. Ein potentielles Signal konnte jedoch auch in Wildtyp-SPL mit SAM detektiert werden. Die Signalstärke war in etwa gleich zu der mit SP-dsDNA. Im Spektrum der Apo-SPL konnte dagegen kein eindeutiges Signal identifiziert werden. Vermutlich handelte es sich hier nur um Hintergrund-Rauschen. Ein Glutathion-Radikal als Signal-Ursache wäre damit ausgeschlossen. Auch in der Y98F-Probe mit SP-dsDNA konnte nur Rauschen detektiert werden. In den Spektren mit ungeschädigter DNA (TT) konnte sich ein sehr kleines Signal leicht vom Hintergrund abheben. Dieses könnte dasselbe Signal wie bei Wildtyp, nur um ein Vielfaches kleiner, sein. Falls dem so ist, müsste ein Tyrosyl-Radikal ausgeschlossen werden. Bei einer solch geringen Signalstärke sollte jedoch berücksichtigt werden, dass es sich auch um eine andere Radikal-Spezies oder einfach um ein Artefakt handeln könnte. Beispielsweise würde bei der Y98F-Mutante erwartet werden, dass sich C140-Radikale ansammeln, da direkt nach dem Cystein die Blockade im Radikalzyklus erfolgen würde. Da jedoch kein eindeutiges Signal in Y98F mit SP-dsDNA nachgewiesen wurde, könnte das C140 $\cdot$  nicht stabil genug sein oder es könnte vom Lösungsmittel relativ schnell abgefangen worden sein.

## Wildtyp

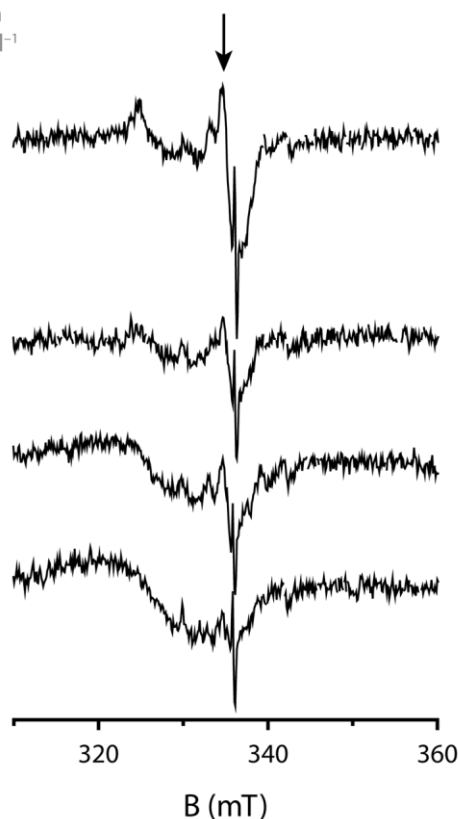
Aktivität in  
nmol nmol<sup>-1</sup>

TT-Assay  
0,32 AdoH

SP-Assay  
0,85 AdoH  
0,24 SP

SAM  
0,35 AdoH

Apo

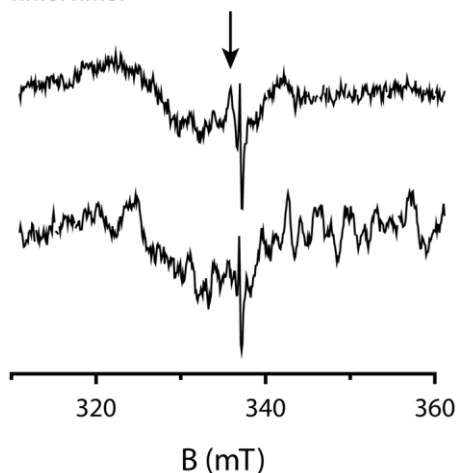


## Y98F

Aktivität in  
nmol nmol<sup>-1</sup>

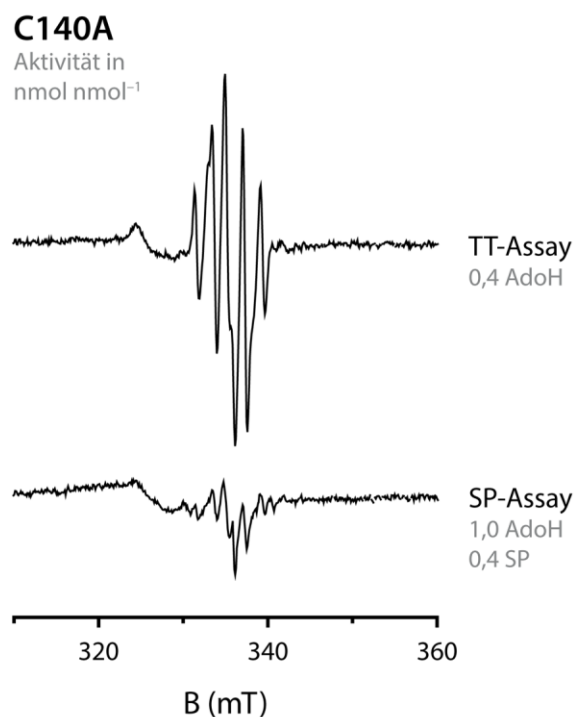
TT-Assay  
0,07 AdoH

SP-Assay  
0,13 AdoH  
0,01 SP



**Abbildung 36:** *Continuous-Wave*-EPR-Messungen einer 2,5-min-*G.tn.*-SPL-Reaktion von Wildtyp und der Y98F-Mutante mit Kontrollen. Potentielle organische Radikal-Signale sind mit einem Pfeil hervorgehoben (circa 335 mT,  $g \sim 2$ ). Die Signalstärke liegt im Größenbereich des Glassignals bei 337 mT. Reaktionsansätze: 188  $\mu$ M rekonstituierte SPL wurde mit 6,6 mM Dithionit bei 35 °C für 40 min reduziert. Die Reaktionen wurden initiiert durch Zugabe von 376  $\mu$ M dsDNA (SP-39mer ODN1/4/5 oder TT-13mer ODN13/2); 1,3 mM SAM und 6,6 mM Glutathion in 50 mM HEPES; 280 mM NaCl und 5% Glycerol (pH 7,5). Für die Kontrollen wurden entweder nur Glutathion (**Apo**) oder zusätzlich SAM (**SAM**) zugegeben. Nach 2,5 min wurden die Proben in der Glove-Box in EPR-Röhrchen umgefüllt, schockgefroren und in einem Transport-Dewar, gefüllt mit flüssigem Stickstoff, zur Universität Freiburg gefahren. 2  $\mu$ L Aliquots wurden auf der HPLC analysiert. Die Werte in nmol nmol<sup>-1</sup> des SP-Umsatzes (**SP**) und der AdoH-Produktion (**AdoH**) stehen in Grau unter den jeweiligen Proben. EPR-Messungen: Temperatur 66 K; Mikrowellen-Frequenz:  $\sim 9,40$  GHz; Mikrowellen-Leistung: 35 dB. Die Spektren wurden basislinienkorrigiert.  $B$  = Magnetische Feldstärke in Milli-Tesla (mT)

Die große Überraschung lieferte die C140A-Mutante (*Abbildung 37*). Diese wies ein klares Signal bei  $g \sim 2$  auf, dessen Signalintensität um mehrere Größenordnungen stärker war als beim Wildtyp. Das zuvor deutlich sichtbare Glassignal war nun im Radikal-Signal verborgen; es war nur noch ein leichter Knick bei 337 mT zu erkennen. Dafür zeigte sich eine deutliche Feinstruktur, welche die Identifizierung des Signals in geplanten, intensiveren Messungen ermöglichen könnte.



**Abbildung 37:** Continuous-Wave-EPR-Messung einer 2,5-min-G.tn. –SPL-Reaktion der C140A-Mutante. Ein starkes Signal eines vermutlich organischen Radikals ( $g \sim 2$ ) war zu beobachten. Die y-Skala ist um das 3-fache größer als in *Abbildung 36*. Die Reaktions- und Messbedingungen entsprechen denen in *Abbildung 36*. Die Werte in nmol nmol<sup>-1</sup> des SP-Umsatzes (**SP**) und der AdoH-Produktion (**AdoH**) stehen in Grau unter den jeweiligen Proben.  $B$  = Magnetische Feldstärke in Milli-Tesla (mT)

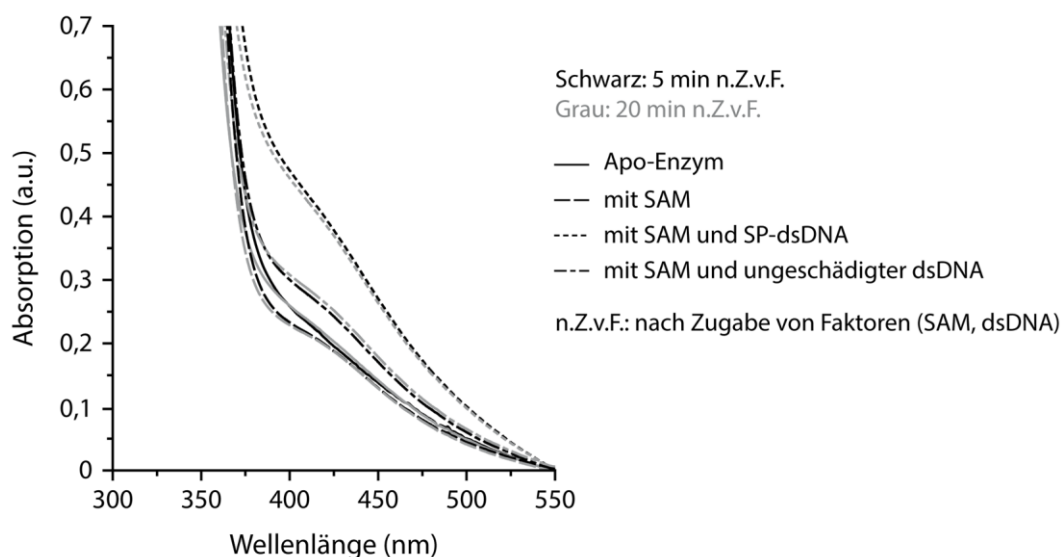
Das Signal war erneut deutlich stärker mit ungeschädigter dsDNA (TT). Die Feinstruktur war jedoch auch mit SP-dsDNA zu erkennen. Da die AdoH-Produktion vergleichbar war mit der im Wildtyp (0,4 nmol nmol<sup>-1</sup>) schien die Radikalkonzentration nicht mit der SAM-Spaltung *per se* zu korrelieren. Stattdessen könnte das gebildete Radikal in der Mutante stärker stabilisiert werden als im Wildtyp und in der Y98F-Mutante. Doch welches organische Radikal könnte durch den *Knock-Out* des Cysteins in der SP-Lyase stabilisiert werden? Zu diesem Zeitpunkt können nur Spekulationen angestellt werden, die im nächsten Kapitel im Hinblick auf die unterschiedlichen Reaktionswege eingehender diskutiert werden. Weitere Messungen mit der C140A-Probe sollten aber die Identität der Radikal-Spezies eindeutig klären. Um die Radikalbildung letztendlich noch besser zu untersuchen, könnten außerdem *Rapid-Freeze-Quench*-Reaktionsansätze durchgeführt und durch EPR-Spektroskopie vermessen werden. Mittels dieser Methode könnten Reaktionen bis in den oberen Nanosekunden-Bereich abgestoppt und direkt in EPR-Röhrchen abgefüllt werden. Außerdem könnte versucht werden, die Radikalkonzentration im Wildtyp durch Bindung von ungeschädigter 39mer-dsDNA in einer höheren Konzentration, und dadurch einer zusätzlichen Stabilisierung des Radikals im aktiven Zentrum, zu erhöhen. Letzten Endes bleibt hervorzuheben, dass dies die ersten Signale eines organischen Radikals in der SP-Lyase sind. Die



Gruppen von *Joan Broderick*<sup>[10]</sup> und *Lei Li*<sup>[356]</sup> konnten keine Signale, spezifisch für organische Radikal-Intermediate, detektieren.

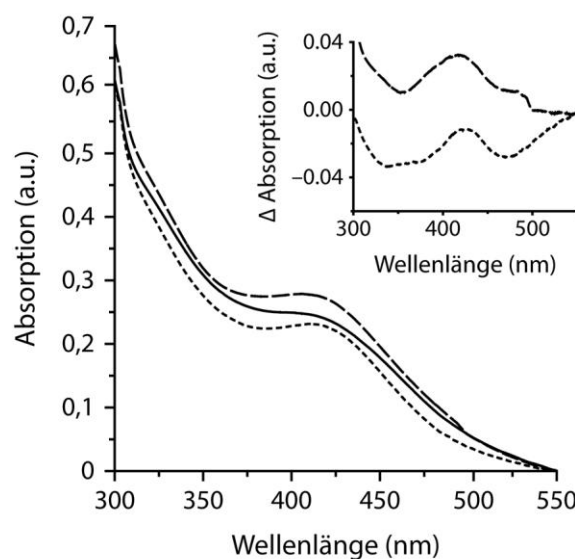
### Korrektur zur UV-Vis-Spektroskopie

Unter denselben Bedingungen, in denen zuvor ein potentiell Tyrosyl-Radikal im UV-Vis entdeckt wurde, war in der EPR-Spektroskopie kein Signal sichtbar. Die EPR-Spektroskopie ist aber sensitiver als die UV-Vis-Spektroskopie im Hinblick auf Radikal-Signale. Um zu überprüfen, ob das detektierte Signal in *Abbildung 32* definitiv keinem Tyrosyl-Radikal zugewiesen werden könnte, wurde erneut ein UV-Vis-Reaktionsansatz mit den Bedingungen der Zeitreaktion im EPR (*Abbildung 34*) durchgeführt. Zu diesem Zeitpunkt waren dies die erfolgreichsten Bedingungen. Dabei wurden vier Ansätze bei 5 min und 20 min nach Reaktionsstart verglichen: Apo-SPL, SP-Lyase mit SAM, mit SAM und SP-39mer-dsDNA, mit SAM und ungeschädigter 13mer-dsDNA. Bei 5 min war aus dem EPR-Spektrum (*Abbildung 34*) ein stärkeres Signal als bei 20 min zu erwarten. Ebenso sollte ein stärkeres Signal mit ungeschädigter dsDNA, aber ein ähnlich starkes Signal in den Proben mit SAM und mit zusätzlicher SP-dsDNA entstehen. Das Protein wurde wie für die EPR-Spektroskopie mit Dithionit vor Reaktionsstart reduziert, um Reduktionsunterschiede des Clusters auszuschließen.



**Abbildung 38:** UV-Vis-Spektren von *G.tn.* -SPL Wildtyp unter Reaktions-Bedingungen, die im EPR ein potentielles Signal zeigten. (—) Apo-SPL, (- -) nach Zugabe von SAM, (- .) Assay mit ungeschädigter dsDNA (TT-13mer ODN13/2), (- -) Assay mit SP-dsDNA (39mer ODN1/4/5). Es wurden Spektren jeweils 5 min (**Schwarz**) und 20 min (**Grau**) nach Zugabe aufgenommen. Reaktionsbedingungen: 3 g L<sup>-1</sup> rekonstituierte SPL wurden mit 3 mM Dithionit bei 35 °C für 1 h reduziert. Die Reaktionen wurden initiiert durch Zugabe von 140 µM dsDNA (entspricht K<sub>m</sub>-Wert), 500 µM SAM, 3 mM Glutathion in 50 mM HEPES, 300 mM NaCl und 5% Glycerol (pH 7,5). Für die Kontrollen wurden entweder nur Glutathion (Apo-SPL) oder zusätzlich SAM zugegeben.

Abbildung 38 zeigt die Ergebnisse dieses Versuchs. Es waren zwar Unterschiede zwischen den Spektren erkennbar, doch kein scharfer, schmaler Peak, der charakteristisch für ein Tyrosyl-Radikal wäre,<sup>[364-366]</sup> hob sich vom Hintergrund ab. Außerdem zeigten sich keine Unterschiede zwischen dem 5 min und dem 20 min Ansatz. Die Spektren der Apo-SPL, der SPL mit SAM und mit ungeschädigter DNA waren sich sehr ähnlich. Das Spektrum der SPL mit SP-dsDNA dagegen zeigte eine breite Schulter von 400–450 nm. Die Unterschiede könnten erklärt werden durch einen Einfluss der gebundenen Cofaktoren auf das Cluster-Signal. Dies wurde bereits für die Biotin Synthase berichtet.<sup>[360]</sup> Da der größte Unterschied mit SP-dsDNA zu beobachten war, könnte durchaus auch das geflippte Sporen-Photoprodukt selbst einen Einfluss auf das Cluster-Signal haben und zur Signal-Verbreiterung führen.



**Abbildung 39:** UV-Vis-Spektren zur Messung des Cofaktoreinflusses auf das 4Fe4S-Cluster-Signal von *G.tn.* -SPL. (—) Apo-SPL, (---) mit SAM, (- - -) mit AdoH und Methionin. Differenzspektren von den Signalen mit Cofaktor und der Apo-SPL sind oben rechts gezeigt. Bedingungen: 3 g L<sup>-1</sup> rekonstituierte SPL mit 500 μM SAM beziehungsweise AdoH und Methionin in 50 mM HEPES, 300 mM NaCl und 5% Glycerol (pH 7,5). Protein und Cofaktoren wurden vor der Messung mindestens 30 min bei 35 °C inkubiert, um die Einstellung des Bindungsgleichgewichts zu gewährleisten. Die Messungen erfolgten ebenfalls bei 35 °C.

Dieser Versuch legte somit dar, dass das zuvor beobachtete UV-Vis-Signal keinem Tyrosyl-Radikal entsprechen könnte. Um das Differenz-Signal aus den Spektren von *B.st.* -SPL Wildtyp und Y98F erklären zu können, wurde der Cofaktoreinfluss auf den 4Fe4S-Cluster im UV-Vis gemessen (Abbildung 39). Die Messung zeigte, dass sich nach Bindung von SAM tatsächlich das Cluster-Signal in Stärke und Form intensivierte. Nach Bindung von AdoH und Methionin intensivierte sich nur die Peakform des 4Fe4S-Cluster-Signals indem die Absorption bei circa 375 nm nachlässt und die Signalstärke bei 420 nm in etwa gleichbleibt. Im Differenz-Spektrum wurden die Unterschiede nach Cofaktor-Bindung verdeutlicht. Ein Maximum bei 420 nm war deutlich zu

erkennen. Obwohl das Maximum im ersten UV-Vis-Ansatz zur Detektion des Tyrosyl-Radikals bei 410 nm und nicht bei 420 nm lag, ähneln sich die Differenz-Spektren in Form und Intensität der Signale. Es wurde somit angenommen, dass das Signal im Differenz-Spektrum von Wildtyp und Y98F vom Einfluss der Cofaktor-Bindung stammen könnte. Dies würde allerdings zugrunde legen, dass Y98F die Cofaktoren nicht so stark binden könnte wie der Wildtyp. Da Y98 offensichtlich, wie der Struktur zu entnehmen ist,<sup>[8]</sup> an der Bindung des SAM-Cofaktors beteiligt ist, wäre diese Erklärung plausibel.

## **Fazit**

Die Ergebnisse dieses Kapitels zeigten, dass C140 und Y98 am Radikal-Zyklus während der Katalyse-Reaktion der SP-Lyase beteiligt sein könnten. Der *Knock-Out* ihrer Radikal-Funktion in den Mutanten C140A und Y98F führte zu einer Blockade im Katalyse-Mechanismus, die sich als Substratinhibitions-Effekt in der Bestimmung der *Michaelis-Menten*-Konstante äußerte. Auch die katalytische Effizienz war stark beeinträchtigt, da die Messungen zeigten, dass mindestens ein neues SAM für einen neuen Katalyse-Zyklus gebunden werden musste. Bei Y98F war eine stärkere Abnahme der katalytischen Effizienz zu beobachten, die durch eine Abnahme der Stabilität der SP-Ausrichtung im aktiven Zentrum erklärt werden könnte. Vermutlich könnte die Konformationsänderung von Y98 nach SP-Bindung in der Mutante beeinträchtigt werden. Dies sind die ersten Hinweise auf eine mögliche Beteiligung von Y98 am Radikal-Zyklus.

Mittels der UV-Vis-Spektroskopie wurde versucht potentielle Aminosäure-Radikale während der SPL-Reaktion zu detektieren. Tatsächlich konnte ein Signal bei 410 nm, charakteristisch für ein Tyrosyl-Radikal,<sup>[364-366]</sup> in einem Differenz-Spektrum von Wildtyp und Y98F gesehen werden. Wie sich später herausstellte, könnte dieses Signal jedoch wahrscheinlicher von einer Beeinträchtigung des 4Fe4S-Cluster-Signals durch die Bindung von Cofaktoren und eventuell dem geflippten Sporen-Photoprodukt stammen.

Die Detektion von organischen Radikalen im SPL-System konnte allerdings mit der EPR-Spektroskopie erfolgreich optimiert werden. Während nur minimale Signale im Wildtyp auftraten, konnte in der C140A-Mutante ein starkes Signal detektiert werden. Erstaunlicherweise waren die Signale stärker mit ungeschädigter dsDNA als mit spezifischem SP-dsDNA-Substrat. Ein Cysteinyln-Radikal wurde aufgrund des starken Signals in der C140A-Mutante ausgeschlossen. Auf den ersten Blick vermutete man ein Ado-Radikal, da dieses auch mit ungeschädigter dsDNA gebildet werden könnte. Allerdings ist dieses sehr instabil,<sup>[16,298]</sup> weswegen eine Weiterleitung des Radikals an den Tyrosin-Rest vor Bindung des Sporen-Photoprodukts nicht ausgeschlossen

werden könnte. Die letztere Möglichkeit wurde jedoch in bisherigen Publikationen nicht in Betracht gezogen. Weitere Messungen mit der C140A-Mutante sollten die Identifizierung des organischen Radikals ermöglichen.

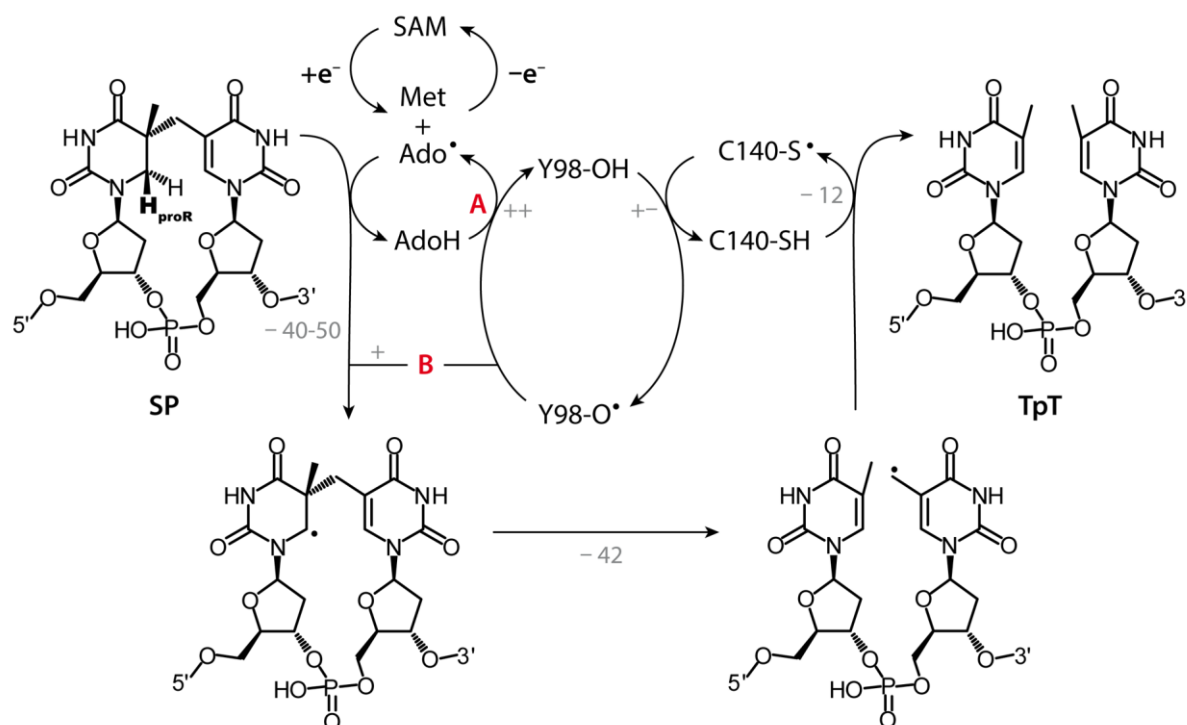
### 3.4. Wird SAM im Mechanismus der SP-Lyase regeneriert?

Biochemische Analysen, Markierungsversuche, die Untersuchung von Mutanten sowie theoretische Studien trugen in den letzten Jahren zu dem potentiellen Mechanismus bei, der in *Kapitel 1.6* vorgestellt wurde. Mit den hier präsentierten Ergebnissen, konnte der Mechanismus um einen Faktor erweitert werden. Neben dem C140-Rest der SP-Lyase könnte auch Y98 am Katalyse-Zyklus beteiligt sein.

Die Reparatur des Sporen-Photoprodukts startet mit der reduktiven Spaltung des SAM-Cofaktors in Methionin und ein 5'-Desoxyadenosylradikal ( $\text{Ado}^\bullet$ )<sup>[9]</sup> (*Abbildung 40*). Dieses abstrahiert in einer exothermen Reaktion<sup>[15-16,298]</sup> das  $\text{H}_{\text{proR}}$ -Atom von der C6-Position des 5'-Dihydrothymine-Restes im Sporen-Photoprodukt.<sup>[10-11,332]</sup> Das generierte Substrat-Radikal fragmentiert in einer erneut exothermen Reaktion zu einem 3'-Thymin und einem 5'-Thyminyld-Radikal.<sup>[15]</sup> Anstatt das fehlende H-Atom erneut vom  $\text{AdoH}$  zu beziehen, fungiert C140 als H-Atom-Donor und wird selbst zum proteingebundenen Cysteinyl-Radikal.<sup>[11,325,328]</sup> Da das Cysteinyl-Radikal mit 8,0 Å sehr weit vom  $\text{AdoH}$  und mit 6,4 Å ebenfalls weit von der C6-Position eines neuen Sporen-Photoprodukts entfernt ist, wäre es unwahrscheinlich, dass  $\text{Ado}^\bullet$  durch  $\text{Cys}^\bullet$  regeneriert werden könnte oder dass ein neuer Zyklus durch  $\text{Cys}^\bullet$  initiiert würde.<sup>[8]</sup> Y98 sitzt in der Struktur jedoch zwischen dem Cystein und dem SAM-Cofaktor<sup>[8]</sup> (*Abbildung 42*), so dass es das Radikal vom Cystein „aufnehmen“ könnte. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten mittels Mutationsstudien, dass Y98 tatsächlich an dem Radikal-Zyklus beteiligt sein und als H-Atom-Donor für das  $\text{Cys}^\bullet$  fungieren könnte. Ausgehend vom Tyrosyl-Radikal gibt es jedoch zwei Möglichkeiten, wie der Mechanismus fortschreiten könnte:

Der erste Weg (*Abbildung 40A*) beschreibt die mögliche Regenerierung des SAM-Cofaktors, indem das  $\text{Y98}^\bullet$  ein H-Atom von  $\text{AdoH}$  abstrahieren könnte, und sich das  $\text{Ado}^\bullet$  mit Methionin durch Abgabe eines Elektrons an den 4Fe4S-Cluster in SAM zurück bilden könnte. Der „Transfer“ des Radikals von Y98 zum  $\text{AdoH}$  wäre vermutlich aber stark endotherm. Die Reaktion könnte durch Konformationsänderungen im aktiven Zentrum vom  $\text{AdoH}$ -gebundenen in den SAM-gebundenen Zustand und durch Energie, die potentiell durch die Rückbildung des SAMs frei werden könnte, begünstigt werden. Das  $\text{Ado}^\bullet$  könnte zudem von einem weiteren Tyrosin-Rest (Y96) stabilisiert werden (*Abbildung 42*).<sup>[356]</sup> Es wird außerdem argumentiert, dass die Reaktion

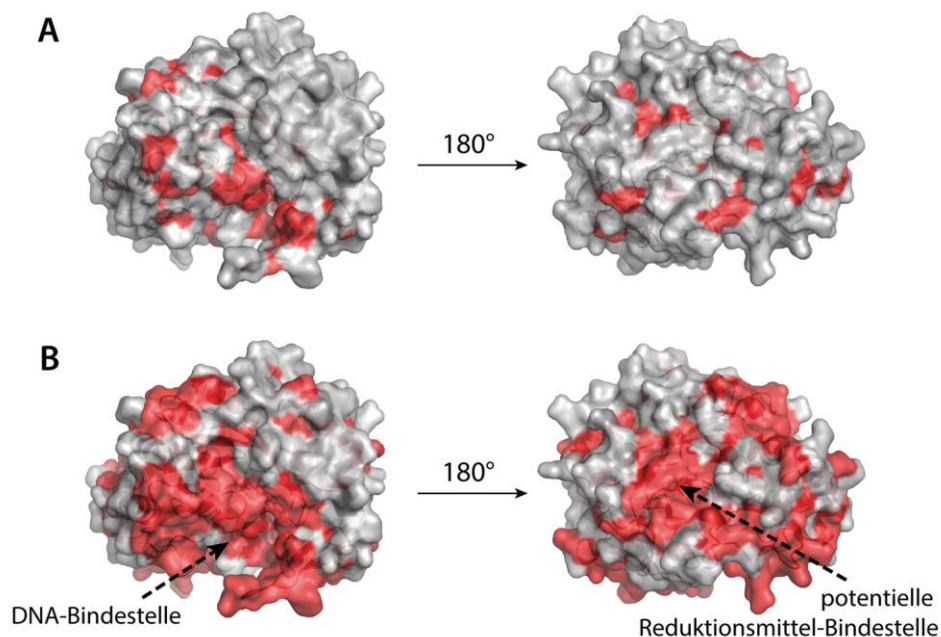
über das Y98 zum Ado<sup>•</sup> und zurück zum SAM-Cofaktor relativ schnell verlaufen könnte, da kein organisches Radikal im EPR beobachtet werden konnte.<sup>[356]</sup>



**Abbildung 40:** Aktueller, potentieller Reaktionsmechanismus der SP-Lyase. Reaktionsenthalpien<sup>[15-16,298]</sup> sind als kJ mol<sup>-1</sup> in Grau dargestellt. Die Reaktionsenthalpien der Y98-Schritte sind noch nicht geklärt. Theoretisch jedoch ist die Reaktion mit C140-S<sup>•</sup> neutral (+-), mit AdoH stark endotherm (++) und mit einem SP-Molekül weniger endotherm als mit AdoH (+).

Ein alternativer Weg wird in *Abbildung 40B* gezeigt. Da die Energiebarriere zwischen einem Tyrosyl-Radikal und einem 5'-Desoxyadenosyl-Radikal vermutlich sehr groß wäre, könnte Y98 selbst den nächsten Katalyse-Zyklus initiieren. Diese Reaktion wäre voraussichtlich weniger endotherm als die Regenerierung des Ado<sup>•</sup>. Da bislang immer eine AdoH-Produktion in SPL-Reaktionsansätzen nachgewiesen wurde obwohl nur katalytische Mengen an SAM verbraucht wurden,<sup>[11,326-327]</sup> erscheint diese Möglichkeit plausibel. Der SAM-Cofaktor würde hier nicht als wiederverwerteter Cofaktor verwendet werden. Stattdessen übernehme er die Rolle eines Initial-Starters, um die Reaktion über das Tyrosyl-Radikal in die Wege zu leiten. Dieser Reaktionsweg wurde in aktuellen Publikationen unserer Gruppe vorgestellt.<sup>[40,349]</sup> Allerdings weist auch dieser Weg gewisse Schwachstellen auf. So nähert sich das Tyrosyl-Radikal in der publizierten Struktur<sup>[8]</sup> von der falschen Seite der C6-Position im Dihydrothymine-Rest (*Abbildung 42*). Es wäre so gesehen wahrscheinlicher, dass von der Y98-Position das H<sub>proS</sub>-Atom abstrahiert wird anstatt dem H<sub>proR</sub> (*Abbildung 42*). Außerdem würde dieser Weg eine Zwischenspeicherung des Radikals am

Tyrosin-Rest bis zum nächsten Katalyse-Zyklus beinhalten. Wäre dies der Fall, sollte das Tyrosyl-Radikal jedoch mit spektroskopischen Methoden im Wildtyp nachweisbar sein.

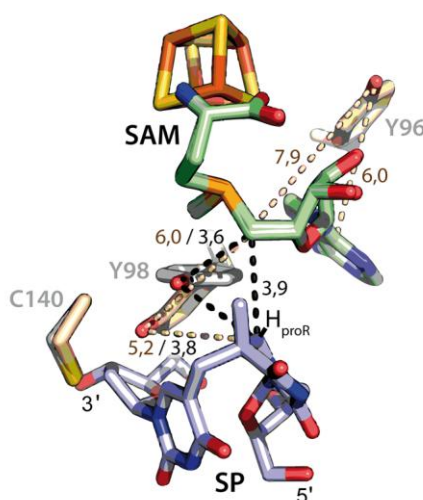


**Abbildung 41:** Konservierung der Oberflächen-Aminosäuren in der SPL-Familie. Unter Einbezug der *Clostridien*-Arten sind nur wenige Flächen 100% konserviert (**A**), selbst in der DNA-Bindestelle. Werden nur Mitglieder der Bacilli-Klasse verglichen (**B**), bilden sich große konservierte Flächen, unter anderem am 4Fe4S-Cluster-bindenden Loop auf der „Rückseite“ des *TIM-Barrels*, der eine potentielle Reduktionsmittel-Bindestelle sein könnte. PDB 4FHD

Vergleicht man die SP-Lyase mit der Lysin-2,3-Aminomutase, dem Radikal-SAM-Enzym, welches SAM definitiv regeneriert,<sup>[258,274]</sup> so stellt man wenig Gemeinsamkeiten im Reaktionsverhalten fest und die Regenerierung in der SP-Lyase erscheint unwahrscheinlicher. Die  $k_{\text{cat}}$ -Werte für verschiedene Substrate der SP-Lyase (*Tabelle 2*) liegen im Bereich von Radikal-SAM-Enzymen, die SAM nicht wiederverwenden.<sup>[333,351-354]</sup> Der  $k_{\text{cat}}$ -Wert der LAM dagegen ist um ein Vielfaches größer.<sup>[355]</sup> Wenn die SP-Lyase also wie LAM nur einmal reduziert werden müsste, wäre auch zu erwarten, dass die Umsätze höher sein würden. Außerdem sollte wie in der LAM keine konservierte Bindestelle für einen Reduktionsfaktor vorliegen. Für andere Radikal-SAM-Enzyme konnte eine Region an der Oberfläche der Proteine identifiziert werden, die in der jeweiligen Enzym-Klasse zu 100% konserviert ist. Da diese Region vor allem von dem Binde-Loop des 4Fe4S-Clusters gebildet wird, wurde vermutet, dass dies eine potentielle Bindestelle des Cluster-Reduktionsfaktors sein könnte.<sup>[262,273,310,312]</sup> Nur in LAM konnte eine solch hoch konservierte Domäne nicht identifiziert werden. In der SP-Lyase ist dies jedoch der Fall. Werden in den Sequenzvergleich auch *Clostridien*-SP-Lyasen mit einbezogen, sind nur wenige Stellen im Enzym 100% konserviert (*Abbildung 41A*); nicht einmal die DNA-Bindestelle. Betrachtet man jedoch nur SP-Lyasen aus der Bacilli-Klasse so findet sich eine relativ große, 100% konservierte

Region um den Cluster-Binde-Loop an der „Rückseite“ des *TIM-Barrels* (Abbildung 41 und Appendix 1). Dies lässt vermuten, dass die SP-Lyase *in vivo* durchaus öfter als einmal reduziert werden könnte.

All diese Spekulationen und teilweisen Widersprüche machen es jedoch schwierig das „Puzzle“ des SPL-Reaktionsmechanismus endgültig zusammenzufügen. Neue Teile dieses „Puzzles“ sind die in dieser Arbeit erhaltenen EPR-Ergebnisse. Im Folgenden werden diese im Hinblick auf den Mechanismus und durch Vergleich der Abstände und Konformationsänderungen im aktiven Zentrum der SP-Lyase<sup>[8]</sup> (Abbildung 42) diskutiert.



**Abbildung 42:** Abstände (in Ångström) im aktiven Zentrum der SP-Lyase vor (Beige) und nach Bindung des SP-Dinukleosids (Schwarz). Abstände zwischen Y98 und C140 sind nicht gegeben aus Gründen der Übersichtlichkeit. Abstand von Y98 zu C140 vor Bindung ist 4,2 Å und nach Bindung 5,1 Å. SAM-Cofaktor in Grün und SP-Dinukleosid in Hellblau. PDB 4FHC und 4FHD

Das starke cwEPR-Signal in der C140A-Mutante mit gebundener, ungeschädigter dsDNA wies deutlich auf ein organisches Radikal im aktiven Zentrum hin. Dieses könnte ein Ado<sup>•</sup> oder ein Y98<sup>•</sup> sein. In beiden Fällen würde die Theorie widerlegt werden, dass die Initiierung des ersten Reparatur-Zyklus durch das Ado<sup>•</sup> und aller Folgenden durch das Y98<sup>•</sup> erfolgen könnte.<sup>[349]</sup> Im ersten Fall – ein Ado<sup>•</sup> – hieße es, dass das Ado<sup>•</sup> ausreichend stabilisiert würde, so dass es mit großer Wahrscheinlichkeit am Ende des Zyklus regeneriert werden und den nächsten Zyklus mit oder ohne zwischenzeitliche Regenerierung des SAM-Cofaktors selbst initiieren könnte. Solch eine Stabilisierungs-Rolle wurde bereits für Y96 vorgeschlagen.<sup>[356]</sup> Zusammen mit Y98 könnte es das Ado<sup>•</sup> durchaus signifikant stabilisieren. Die Frage ist jedoch, ob die Stabilisierung so effizient wäre, dass dieses normalerweise sehr reaktive Molekül<sup>[16,298]</sup> als organisches Radikal mittels EPR-Spektroskopie detektiert werden könnte. Zusätzlich stellt sich die Frage, wieso dieses Radikal im Wildtyp mit ungeschädigter dsDNA kein vergleichsweise starkes Signal lieferte.

Wie könnte die Mutation von Cystein zu Alanin das Ado<sup>•</sup> weiter stabilisieren? Die Blockade des Radikal-Zyklus in der Mutante fällt hier nicht ins Gewicht, da das Signal mit ungeschädigter dsDNA erfasst wurde und dies somit ein Zustand vor der Reparatur-Reaktion ist.

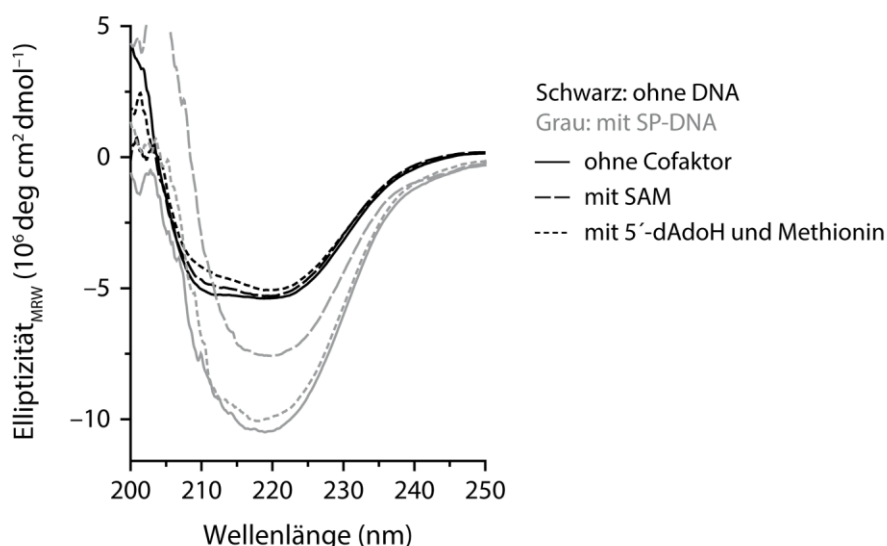
Im zweiten Fall würde es bedeuten, dass das Tyrosyl-Radikal bereits vor dem ersten Reparatur-Zyklus gebildet würde. Energetisch betrachtet macht dies durchaus Sinn, da ein Tyr<sup>•</sup> deutlich stabiler ist als ein Ado<sup>•</sup>.<sup>[16,298]</sup> Allerdings ist auszuschließen, dass es die Reaktion initiiert. Markierungsversuche haben eindeutig belegt, dass es das Ado<sup>•</sup> ist, welches das H<sub>proR</sub> am C6 des Dihydrothymine-Restes abstrahiert.<sup>[10-11]</sup> Angenommen, das Tyrosyl-Radikal würde aber tatsächlich vor Bindung des Sporen-Photoprodukts in der aktiven Tasche vom Ado<sup>•</sup> gebildet, so könnte sich dieses mit C140, welches nur 4,2 Å (*Abbildung 42*) entfernt ist,<sup>[8]</sup> austauschen. Durch diesen vermutlich regen Wechsel des H-Atoms von Tyrosin auf Cystein könnte die Konzentration beider Radikal-Intermediate zu gering für eine effiziente Detektion in der EPR-Spektroskopie sein. Das UV-Vis wäre ebenfalls zu wenig empfindlich für die Signale. Das AdoH wäre an diesem Austausch vermutlich nicht beteiligt, da es als Radikal zu instabil und der Abstand mit 6,0 Å sehr weit ist. Die Möglichkeit wäre aber nicht auszuschließen. Bindet das Sporen-Photoprodukt im aktiven Zentrum, so erfolgt eine Konformationsänderung des Tyrosins, welche das Tyrosyl-Radikal bis zu 3,6 Å an das AdoH heran bringt (*Abbildung 42*).<sup>[8]</sup> Dadurch könnte die Energiebarriere zur Bildung des Ado<sup>•</sup> gesenkt werden. Durch die Rotation des Y98 könnte zudem ein *fine tuning* der Stabilität des Radikals erfolgen. Der Rotationswinkel der Phenylringebene zum alpha-C-Atom wechselt während der Konformationsänderung<sup>[8]</sup> von 90° zu circa 60°. Im Vergleich mit DFT-Studien einer Tyr<sup>•</sup>-Modellverbindung lägen beide Winkel nahe dem globalen Energieminimum bei 80°. <sup>[375]</sup> Ab 60° beginnt jedoch der Anstieg zu einem Maximum bei 40°. Würde dieser Anstieg im SPL-System etwas früher beginnen, könnte die geringfügige Destabilisierung des Y98<sup>•</sup> nach Rotation zusätzlich die Energiebarriere zur Rückbildung des Ado<sup>•</sup> senken. Y96 könnte auch in diesem Fall durch Interaktionen über 6–8 Å zum AdoH dazu beitragen, dass das Ado<sup>•</sup> stabilisiert würde. Weiterhin könnte dieser thermisch ungünstige Schritt durch die folgenden, stark exothermen Reaktionen der Reparatur-Reaktion (*Abbildung 40*) begünstigt werden. Nach der Initiierung der Katalyse durch das Ado<sup>•</sup> könnte der Zyklus vollständig bis zum Tyrosyl-Radikal durchlaufen und die Ausgangssituation wieder hergestellt werden.

In der C140A-Mutante wäre der vorgeschlagene „Radikal-Austausch“ zwischen Tyrosin und Cystein im Ruhezustand des Enzyms gehemmt. Dadurch würde das Radikal am Tyrosin akkumulieren und das EPR-Signal könnte sich verstärken. Dabei wäre das Signal mit ungeschädigter dsDNA stärker, da das Radikal nicht durch die Reparatur-Reaktion abgebaut würde und durch die Bindung der dsDNA vor dem Lösungsmittel geschützt werden könnte. Das Ergebnis dieser Ar-



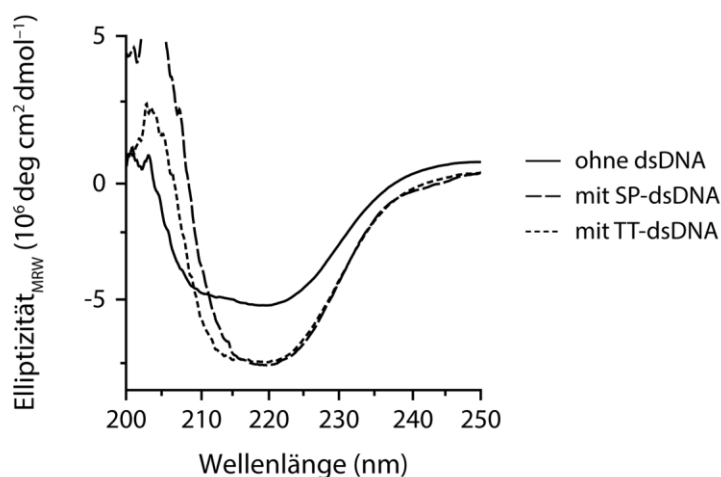
beit, dass mit dsDNA in gesättigten Konzentrationen der höchste SP-Umsatz pro gebildetem AdoH-Molekül erreicht wurde, könnte für diese Hypothese sprechen. Würde der SAM-Cofaktor in einer schnellen Reaktion über Y98<sup>•</sup> und Ado<sup>•</sup> regeneriert werden, bestünde keine Notwendigkeit der Abschottung des aktiven Zentrums, da keine organischen Radikale zwischengespeichert würden, die mit dem Lösungsmittel abreagieren könnten. Zwei weitere Voraussetzungen für diese angepasste SAM-Initial-Starter-Hypothese sind jedoch nötig. Zum Ersten müsste AdoH stark im aktiven Zentrum gebunden bleiben, damit es für jede neue Reaktion als „Radikalüberträger“ und Reaktions-Starter zur Verfügung stünde. Eine solch starke Bindung wurde in dieser Arbeit bereits bei der Interpretation des Produktinhibitionseffekts vorgeschlagen (*Kapitel 3.2*). Sie könnte unter anderem von Y96 vermittelt werden.<sup>[356]</sup> Zum Zweiten müsste das Sporen-Photoprodukt auch mit gebundenem AdoH und Methionin in die aktive Tasche geflippt werden können. Zwei Versuche in dieser Arbeit deuteten darauf hin: die Analyse der C140G-Mutante (*Kapitel 3.3*) und die im nächsten Kapitel gezeigten Bindungsstudien. Das einzige was in dieser Dissertation gegen diese Theorie spricht, ist ein minimales cwEPR-Signal in der Y98F-Mutante mit ungeschädigter dsDNA. Dieses könnte allerdings auch von einem transienten Ado<sup>•</sup> stammen, welches durch das Fehlen von Y98 akkumulieren aber aufgrund seiner Instabilität rapide abreagieren könnte. Außerdem muss man in Betracht ziehen, dass dieses Signal nur ein Artefakt der Messung sein könnte.

Ein wichtiger Punkt, der beachtet werden sollte, ist dass die Abstände nur an der Struktur mit gebundenem SAM-Cofaktor gemessen wurden (*Abbildung 42*).<sup>[8]</sup> Nach der Spaltung von SAM könnten weitere Konformationsänderungen stattfinden, welche die Abstände für den Mechanismus optimieren könnten. Zum Beispiel könnte das C5'-Atom des Ado<sup>•</sup> näher am Y98 zu liegen kommen, wodurch die initiale Bildung des Tyrosyl-Radikals begünstigt werden könnte. In der SAM-Struktur ist dieser Abstand mit 6,0 Å relativ groß.<sup>[8]</sup> Auch könnten die Abstände mit anderen SP-Substraten, wie SP-Dinukleosid-Monophosphat oder SP-dsDNA anders liegen. Die Bindung von dsDNA und das Flippen des Sporen-Photoprodukts könnten einen Einfluss auf die Konformation des Enzyms haben. Bisher ist nur eine Struktur mit SP-Dinukleosid verfügbar.<sup>[8]</sup>



**Abbildung 43:** CD-Spektren im fernen UV zur Analyse möglicher Konformationsänderungen im aktiven Zentrum nach Spaltung des SAM-Cofaktors. Gemessen wurde *G.tn.* –SPL ohne (**Schwarz**) oder mit (**Grau**) gebundener SP-dsDNA (13mer ODN1/2). (—) Apo-SPL, (– –) mit SAM, (– · –) mit AdoH und Methionin. Bedingungen: 0,3 g L<sup>-1</sup> SPL; 25 µM dsDNA; 100 µM SAM/AdoH/Methionin in 5 mM HEPES; 30 mM NaCl und 5% Glycerol (pH 7,5). Das Protein wurde mit DNA und Cofaktoren mindestens 30 min bei Raumtemperatur vor der Messung inkubiert. Als Referenz für Messungen ohne dsDNA wurde nur Puffer verwendet. Für die anderen Proben wurde dsDNA in Puffer gemessen und abgezogen.

In *Abbildung 43* sind CD-Spektren gezeigt, die verdeutlichen dass Konformationsänderungen nach SP-dsDNA-Bindung und nach SAM-Spaltung zu AdoH und Methionin erwarten werden könnten. Dass die Konformationsänderungen mit dem Flipp-Prozess des Sporen-Photoprodukts zusammen hängen ist unwahrscheinlich, weil dieselben Änderungen auch mit ungeschädigter dsDNA beobachtet werden konnten (*Abbildung 44*).



**Abbildung 44:** CD-Spektren im fernen UV zur Verdeutlichung möglicher Konformationsänderungen nach Bindung von dsDNA. Gemessen wurde *G.tn.* –SPL mit SAM und ohne dsDNA (—), mit ungeschädigter dsDNA (13mer ODN13/2) (– –) oder mit SP-dsDNA (13mer ODN1/2) (– · –). Bedingungen: siehe *Abbildung 43*.

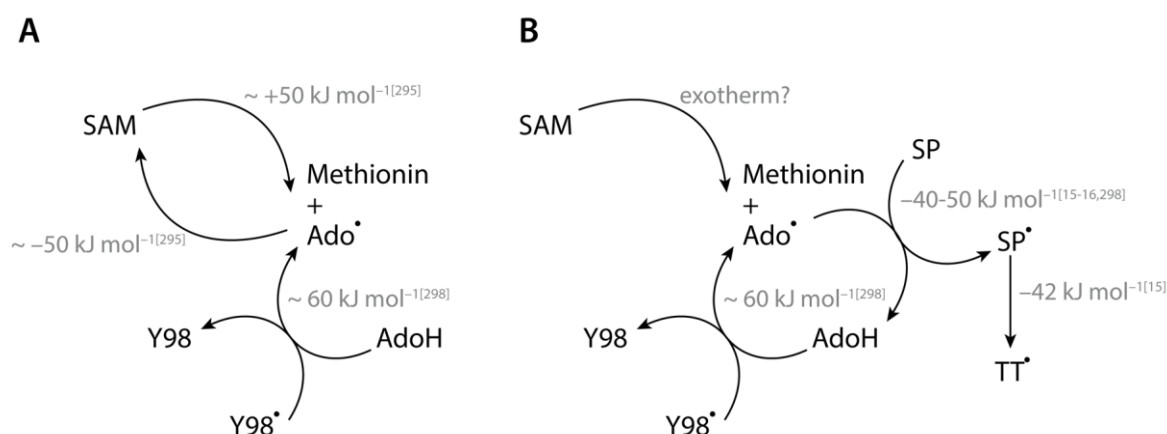
Derartige Konformationsänderungen wurden bereits zur Regenerierung des SAM-Cofaktors vorgeschlagen.<sup>[356]</sup> In dem vorgestellten Reaktionsmechanismus könnten sie dagegen nicht nur die Reaktion zwischen Tyrosyl-Radikal und AdoH erleichtern, sondern auch die Bindung von AdoH im aktiven Zentrum stärken, damit es während der Katalyse gebunden bliebe.

Da dieser Reaktionsmechanismus davon ausgeht, dass die SP-Lyase im Ruhezustand ein protein-gebundenes Radikal besitzen könnte, wäre er darauf angewiesen, dass das aktive Zentrum durch DNA geschützt wird. Im nächsten Kapitel wird der Mechanismus der Schadens-Suche eingeführt. In diesem kann ein Enzym an der DNA entlang gleiten, bis es den spezifischen Schaden gefunden hat.<sup>[376]</sup> In der SP-Lyase könnte während einem solchen Prozess das Radikal geschützt werden. Dieses Gleiten könnte jedoch gekoppelt mit gelegentlichen Sprüngen zu einem anderen DNA-Fragment sein.<sup>[376]</sup> In diesem Schritt läge das aktive Zentrum vermutlich offen und das Radikal könnte von dem Lösungsmittel abreagiert werden. Die SP-Lyase müsste folglich neu reduziert werden. Dies könnte der Grund sein, wieso eine ausgeprägte, potentielle Reduktionsfaktor-Bindestelle in der SP-Lyase vorhanden ist (*Abbildung 41*).

Vergleicht man die bislang stark vertretene SAM-Regenerierungs-Theorie mit dieser optimierten SAM-Initial-Starter-Hypothese so ist beiden die kurzfristige, endotherme Rückbildung des Ado<sup>•</sup> gemein. In der SAM-Regenerierungs-Theorie wird argumentiert, dass die Rückreaktion zum SAM und eventuelle Konformationsänderungen, welche die Energiebarriere senken könnten, die stark endotherme Reaktion vom Y98<sup>•</sup> zum Ado<sup>•</sup> ermöglicht.<sup>[356]</sup> Unter der Annahme, dass die Reaktionsenergie der SAM-Spaltung in allen SAM-regenerierenden Radikal-SAM-Enzymen ähnlich wäre, könnte die Spaltungsreaktion mit circa  $50 \text{ kJ mol}^{-1}$  endotherm sein (*Abbildung 45A*).<sup>[293,295]</sup> Dies würde die SAM-Regenerierung um circa  $-50 \text{ kJ mol}^{-1}$  exotherm machen. In LAM ist der letzte Schritt zur Rückbildung des Ado<sup>•</sup> nur  $29,4 \text{ kJ mol}^{-1}$  endotherm,<sup>[16]</sup> die durch diese stark exotherme Reaktionsenergie der SAM-Rückbildung ausgeglichen werden kann. In der SP-Lyase wäre der letzte Schritt allerdings mit circa  $60 \text{ kJ mol}^{-1}$  stärker endotherm,<sup>[298]</sup> weswegen die frei-werdende Energie der SAM-Regenerierung, als Ausgleich für den letzten Schritt, eventuell nicht ausreichen könnte.

Das cwEPR-Signal und die hohe, entkoppelte AdoH-Produktion belegten jedoch, dass die SAM-Spaltung bereits vor der Bindung des Sporen-Photoprodukts im aktiven Zentrum stattfinden kann. Auch die Bindung von ungeschädigter DNA war für die AdoH-Produktion nicht nötig (zum Beispiel *Abbildung 36* Wildtyp-SAM-Assay). Diese Ergebnisse lassen anzweifeln, ob die SAM-Spaltung tatsächlich endotherm sein könnte. Eine exotherme Reaktion, wie in Klasse-III-Radikal-SAM-Enzymen könnte plausibler sein.<sup>[296]</sup> Die SAM-Regenerierung wäre in diesem Fall inhibiert

und die Reaktion könnte über die Initial-Starter-Hypothese verlaufen. In dieser würde die stark endotherme  $\text{Ado}^\bullet$ -Rückbildung mit zwei exothermen Reaktionen gekoppelt werden (*Abbildung 45B*) – nämlich der Initiierung des SP-Substrat-Radikals<sup>[15-16,298]</sup> und der Spaltung der Methylenbrücke zu einem Thyminyll-Radikal.<sup>[15]</sup> Diese Hypothese würde also nicht nur physiologisch Sinn machen, da sie nur ein SAM-Molekül für mehrere Umsätze verwenden würde, sondern auch energetisch, da sie das katalytische Radikal an einer stabilen Tyrosin-Cystein-Schnittstelle zwischenspeichern und die  $\text{Ado}^\bullet$ -Regenerierung an exotherme Reaktionen koppeln würde.



**Abbildung 45:** Vergleich der potentiellen Reaktionsenergien bei SAM-Regenerierung (**A**) und bei der vorgeschlagenen SAM-Initial-Starter-Reaktion (**B**). Die SAM-Spaltung in (**A**) sollte im Vergleich mit anderen SAM-regenerierenden Radikal-SAM-Enzymen endotherm sein, zum Beispiel  $\sim 50 \text{ kJ mol}^{-1}$  wie in HydE<sup>[293,295]</sup>. Aufgrund der hohen entkoppelten SAM-Spaltung in der SP-Lyase könnte die SAM-Spaltung in (**B**) auch wie bei Klasse-III-Radikal-SAM-Enzymen exotherm sein.<sup>[296]</sup>

Der Einfluss der einzelnen Strategien auf die Umsatzgeschwindigkeit lässt sich schwierig abschätzen. In der Initial-Starter-Hypothese wäre zu erwarten, dass diese tatsächlich keine LAM-Höchstgeschwindigkeiten<sup>[355]</sup> erreichen könnte, da das aktive Zentrum empfindlich gegenüber Abreaktionen des zwischengespeicherten Aminosäure-Radikals wäre und die Initiation über einen endothermen Schritt erfolgen könnte.

Abschließend könnte man die diesem Kapitel vorangestellte Frage „Wird SAM im Mechanismus der SP-Lyase regeneriert?“ insofern beantworten, dass unter den hier ausgeführten energetischen Aspekten und dem neu detektierten organischen Radikal in der C140A-Mutante die Wahrscheinlichkeit der SAM-Regenerierung gering ist. Die in unseren Publikationen aufgegriffene Initial-Starter-Theorie,<sup>[349]</sup> müsste anhand der neuen EPR-Ergebnisse jedoch ebenfalls ausgeschlossen werden. Der neue Mechanismus-Vorschlag beruht vorwiegend auf der Initial-Starter-Theorie und zieht eine Parallele zur SAM-Regenerierungs-Theorie, indem das Ado-Radikal von dem Tyrosyl-Radikal nur zur Initiierung des nächsten Katalyse-Zyklus regeneriert wird.

## Ausblick

Ein potentieller Radikal-Mechanismus wurde in diesem Kapitel anhand der neuesten EPR-Ergebnisse und unter Berücksichtigung aller bisherigen Ergebnisse ausgiebig diskutiert. Um klare Aussagen über den Mechanismus treffen zu können, müssen jedoch weitere Untersuchungen durchgeführt werden.

Zunächst sollte das cwEPR-Signal der C140A-Mutante weiter interpretiert werden. Weitere Informationen über die Art des Radikals könnten durch 2-Puls-Hahn-Echo- bis hin zu ENDOR-Messungen gewonnen werden. Simulationen der Signale sollten das Radikal identifizieren können. Außerdem sollte die Radikalbildung in der C140A-Mutante ohne dsDNA und nur mit SAM überprüft werden. Um die Kinetik der Radikalbildung schließlich EPR-spektroskopisch genauer untersuchen zu können, könnten *Rapid-Freeze-Quench*-Ansätze durchgeführt werden. Letztendlich könnte versucht werden, das Radikalsignal im Wildtyp durch Bindung von ungeschädigter 39mer-dsDNA, in einer höheren Konzentration zur Absättigung des Enzyms, zu erhöhen. Ebenso könnten UV-Vis-Messungen mit der C140A-Mutante zur Aufklärung beitragen.

Im Hinblick auf die korrekte Konformation im aktiven Zentrum nach Flippen des Sporen-Photoprodukts wären Kristallstrukturen mit SP-Dinukleosid-Monophosphat oder sogar gebundener SP-dsDNA vor und nach Reduktion des 4Fe4S-Clusters interessant. Diese könnten für das bessere Verständnis des Mechanismus von Nutzen sein. Die Situation nach Cluster-Reduktion könnte auch durch Strukturen mit gebundenem AdoH und Methionin nachgestellt werden.

Aus solchen Kristallstrukturen könnte desweiteren die Energiebarriere und Reaktionsenergie der SAM-Spaltung berechnet und mit denen anderer Radikal-SAM-Enzyme verglichen werden. Studien der Reaktionsenergien zeigen einen deutlichen Unterschied zwischen solchen Radikal-SAM-Enzymen, die SAM regenerieren,<sup>[295]</sup> und solchen, die SAM stöchiometrisch umsetzen.<sup>[296]</sup> Die Berechnung in der SP-Lyase könnte also zur Aufklärung der SAM-Regenerierungs-Diskussion beitragen. QM/MM-Studien sollten außerdem einen genaueren Einblick in die Energiebarrieren der Radikalreaktion zwischen AdoH, Y98 und C140 geben können.

Mit etwas größerem Aufwand könnte man Y98 auch durch eine unnatürliche, Tyrosin-ähnliche Aminosäure ersetzen, welche die chemischen Eigenschaften an dieser Position moduliert. Fluorotyrosine, beispielsweise, verändern das Reduktionspotential und den  $pK_s$ -Wert des Aminosäure-Restes, wodurch Radikale an diesem Rest akkumulieren und im EPR gemessen werden können.<sup>[377-378]</sup> Die Gruppe von JoAnne Stubbe am *Massachusetts Institute of Technology* hat auf diesem Gebiet die meisten Fortschritte am Modell der Ribonukleotid-Reduktase geliefert. Unter anderem wurden genaue Protokolle zum Einbau dieser synthetischen Aminosäuren publi-

ziert.<sup>[379-380]</sup> Unnatürliche Tyrosin-Derivate könnten unter anderem helfen die Dynamik und den Einfluss des Tyrosins auf den Radikal-Mechanismus genauer zu untersuchen.

### 3.5. Der Schadens-Erkennungs-Prozess der SP-Lyase

#### **Kristallisationsstudien**

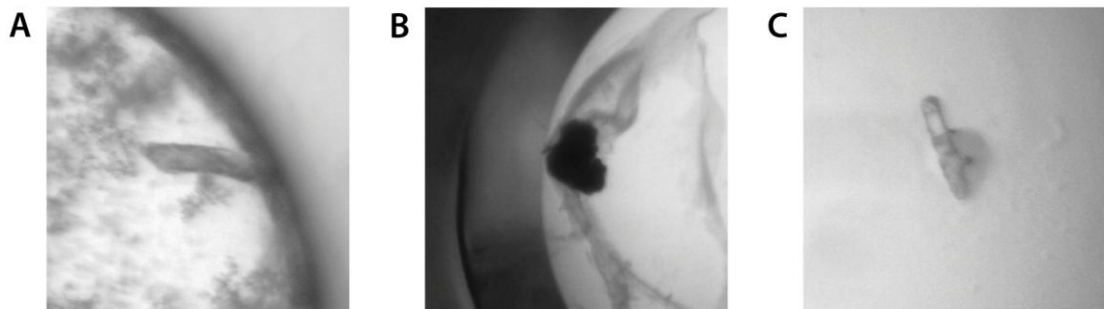
Aus dem vorausgehenden Kapitel wurde deutlich, dass Kristallstrukturen der SP-Lyase mit dsDNA und geflipptem Sporen-Photoprodukt sowie nach SAM-Spaltung für die Aufklärung des Reaktionsmechanismus durchaus sinnvoll wären. Zudem wäre es interessant einen Einblick in die Bindung von dsDNA vor und nach dem Flippen des Sporen-Photoprodukts in die aktive Tasche erhalten zu können. Deshalb wurden Kristallisations-Experimente mit dsDNA und SAM, sowie mit SP-Dinukleosid und AdoH/Methionin angesetzt. AdoH/Methionin-Ansätze erfolgten nur mit SP-Dinukleosid, da sie letztendlich mit der bereits vorhandenen SAM-Struktur verglichen werden sollten.

Zum *Screening* wurde versucht, die Kristallisationsbedingungen von *Benjdia et al.*<sup>[8]</sup> für Ansätze mit SP-Dinukleosid zu reproduzieren oder für Ansätze mit dsDNA zu optimieren. Außerdem wurden zum *Screening* geeigneter Kristallisationsbedingungen mit dsDNA *Suites* von Qiagen genutzt. Mit den fertig angesetzten Lösungen dieser *Suites* wurden Kristallisations-Experimente in 96-Well-Platten angesetzt. Bevorzugt wurde die *Nucleix Suite* verwendet, da der Hersteller (Qiagen) diese für DNA-bindende Proteine empfiehlt. Die Ansätze wurden in der Glove-Box pipettiert, wobei das Protein mit DNA/Dinukleosid und Cofaktoren zunächst bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Zum Kristallwachstum wurden die Platten schließlich in der Glove-Box oder außerhalb in einem Temperatur-regulierten Schrank (18 °C) aufbewahrt.

DNase-I-Versuche haben bereits gezeigt, dass die SP-Lyase einen neun-Basenpaar-langen Abschnitt der DNA schützt (5'-TAG AG **SP** GA-3').<sup>[331]</sup> Darum wurde diese Sequenz als Basis für die Kristallisationsstudien genommen. Sie wurde in eine GC-reiche Sequenz eingepasst, um die Schmelztemperatur zu erhöhen (ODN21/23, S. 118). Der Gegenstrang wurde so gewählt, dass keine Überhänge im Duplex vorlagen (ODN22, S. 118).

Die Versuche wurden zu Beginn mit *B.st.* –SPL durchgeführt. Da die Ausbeuten dieser SPL-Variante, wie zuvor berichtet, sehr gering waren und daher nur Protein-Konzentrationen von bis  $7 \text{ g L}^{-1}$  erhalten wurden, wurde auf rekonstituierte *G.tn.* –SPL umgestiegen sobald diese verfügbar war. Diese SPL-Variante wurde außerdem zur Kristallisation in *Benjdia et al.*<sup>[8]</sup> verwendet, weswegen die Wahrscheinlichkeit auf Kristalle größer sein sollte. Dennoch wurden nur nicht-streuende Objekte in den Ansätzen gefunden. Beispiele sind in *Abbildung 46* gezeigt. Die Objekte

wuchsen entweder aus Präzipitaten (A) oder aus Proteintropfen, die durch Phasentrennung vom Puffer gebildet wurden (C). Beide Objekte konnten Licht polarisieren und waren durchscheinend braun. FeS-Cluster-Proteine sollten nach Erfahrung von *Dr. Sabine Schneider* jedoch tief dunkelbraun sein, so dass der Polarisierungseffekt nicht mehr sichtbar sein sollte. Erstaunlicherweise wuchsen auch Salzkristalle (erkennbar aus dem Beugungsmuster) heran, die mit scheinbar präzipitiertem SPL-Protein ummantelt waren (B). Diese waren undurchsichtig und dunkelbraun, konnten aber auch kein Protein-Beugungsmuster liefern.



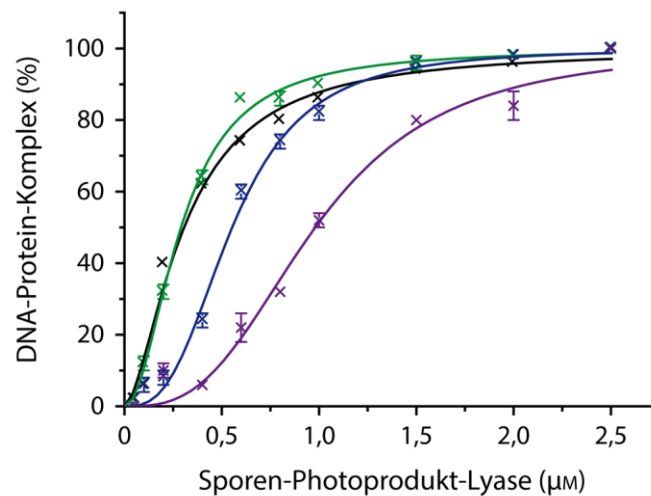
**Abbildung 46:** Beispiele für Kristallwachstum der SP-Lyase. Die Objekte wuchsen aus Präzipitaten (A) oder aus Proteintropfen, die durch Phasentrennung des Proteins vom Puffer gebildet wurden (C). Kuriositäten waren offensichtlich Salzkristalle, die mit dunkelbraunem, scheinbar präzipitiertem Protein ummantelt waren (B).

Weitere Optimierungsversuche standen jedoch aufgrund der hohen, benötigten Proteinkonzentrationen mit den EPR-Versuchen in Konkurrenz. Mit Hilfe von Bindungsstudien wurde daher versucht, den Protein-DNA-Komplex zunächst genauer zu verstehen, um dadurch zukünftige Kristallisationsversuche zu verbessern.

### **Initiale Bindungsstudien**

Zur Untersuchung der DNA-Bindungseigenschaften an die SP-Lyase wurden Fluoreszenz-Polarisations-Messungen durchgeführt. Durch die Änderung der Polarisations-Eigenschaften eines fluoreszenzmarkierten DNA-Stranges mit der Bildung eines DNA-Protein-Komplexes kann die relative Konzentration dieser Komplexe bestimmt werden. Die DNA-Protein-Komplex-Konzentration  $B$  kann man in nM oder als Fraktion der eingesetzten DNA ( $B \cdot c(\text{DNA})_{\text{total}}^{-1}$ ) in Prozent (%) angeben.<sup>[350,381]</sup> Sie wird gegen die steigende Proteinkonzentration aufgetragen, wodurch man Bindungskurven erhält.<sup>[350]</sup> Die Dissoziationskonstante  $K_d$  wird mit dem *Langmuir*-Isotherm, dass vergleichbar ist zur *Michaelis-Menten*-Gleichung, berechnet.<sup>[350]</sup> Sie entspricht ähnlich dem  $K_m$ -Wert der Substrat- oder in diesem Fall Proteinkonzentration zu der 50% des freien Proteins oder in diesem Fall der freien DNA gebunden sind.<sup>[382]</sup> Die beiden Konstanten  $K_d$  und  $K_m$  sind aber nicht gleich. Für die Berechnung des  $K_m$ -Werts wird die Reaktionsgeschwindigkeit

im Zeitrahmen der linearen Anfangsgeschwindigkeit gemessen. Der  $K_d$ -Wert ist dagegen nur ein Maß der Bindung, nicht der Aktivität und wird nach Einstellung des Bindungsgleichgewichts gemessen.<sup>[350]</sup>



**Abbildung 47:** Beispielkurven zur Bestimmung der Dissoziationskonstante der SP-Lyase. Die DNA-Protein-Komplex-Konzentration ist im Verhältnis zur DNA-Konzentration in % aufgetragen gegen die ansteigende SPL-Konzentration in  $\mu\text{M}$ . Die Kurven zeigten keinen hyperbolen, sondern einen sigmoidalen Verlauf. (**Schwarz**) *B.st.* – SPL Wildtyp ( $n = 1,7 \pm 0,1$ ), (**Grün**) *B.st.* – SPL C140A ( $n = 2,0 \pm 0,1$ ), (**Violett**) *B.st.* – SPL Y98F ( $n = 2,9 \pm 0,2$ ) und (**Blau**) *G.tn.* – SPL Wildtyp ( $n = 2,9 \pm 0,3$ ) mit SAM und SP-dsDNA. Die Hill-Koeffizienten  $n$  als Maß dieser scheinbaren Kooperativität sind in Klammern angegeben. Die  $R^2$ -Werte der Kurven liegen zwischen 0,98 und 1,00.

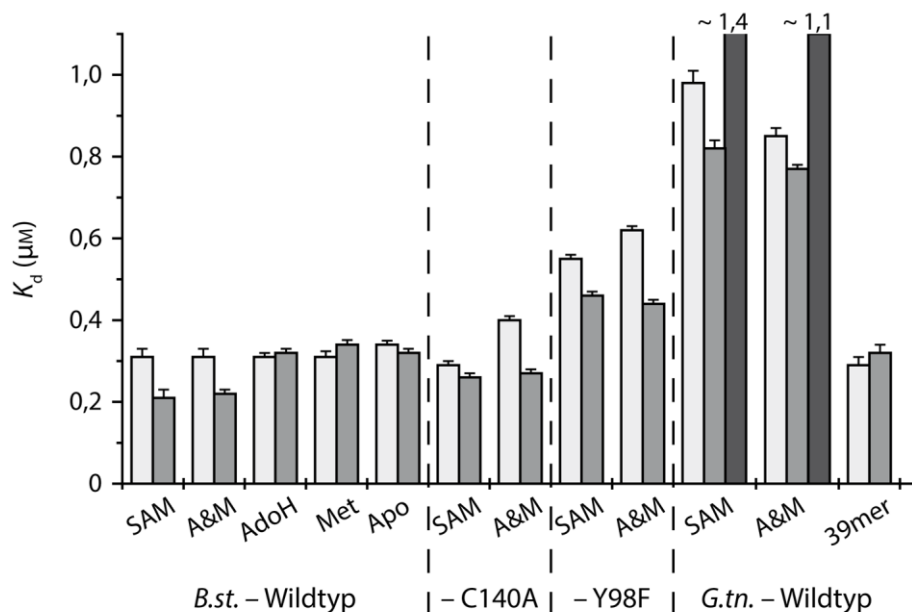
Beispielkurven dieser Messungen sind in *Abbildung 47* gezeigt. Normalerweise erwartet man, wie für die *Michaelis-Menten*-Kurve, einen hyperbolischen Kurvenverlauf.<sup>[350]</sup> In diesen Messungen waren die Kurven jedoch sigmoidal, was dadurch erklärt werden könnte, dass die Bindungsaffinität mit steigender Proteinkonzentration zunimmt. Dieser Effekt könnte nach Literaturangaben durch thermodynamische oder kinetische Kooperativität erklärt werden<sup>[383]</sup> – im nächsten Abschnitt wird eingehender besprochen, welche der beiden für das SPL-DNA-System zutreffen könnte. In beiden Fällen wird zur Bestimmung des  $K_d$ -Wertes standardgemäß das *Langmuir*-Isotherm um den Hill-Koeffizienten  $n$  erweitert, der als Maß der Kooperativität gilt. Die Formel wird daher auch als *Hill-Gleichung* bezeichnet.<sup>[383-384]</sup>

$$B = c(\text{SPL})^n / (K_d^n + c(\text{SPL})^n) \times c(\text{DNA})_{\text{total}}$$

$B$  ist dabei die DNA-Protein-Komplex-Konzentration in einer molaren Einheit und  $c$  die Konzentration der Komponenten in einer molaren Einheit. Die  $R^2$ -Werte der mit diesem Isotherm angenäherten Kurven lagen zwischen 0,98 und 1,00 und sprechen für einen guten Abgleich der Daten.



Die Dissoziationskonstante der SP-Lyase wurde für *B.st.* –SPL Wildtyp und seine Aktivitätsmutanten unter verschiedenen Bedingungen gemessen. Zum Vergleich wurden außerdem die  $K_d$ -Werte der *G.tn.* –SPL unter gleichen Bedingungen bestimmt. Die Werte (Abbildung 48) lagen für die *B.st.* –SPL mit SP-13mer-dsDNA oder ungeschädigter 13mer-dsDNA, mit SAM oder AdoH und Methionin im Bereich von 0,2–0,6  $\mu\text{M}$ . Die  $K_d$ -Werte der *G.tn.* –SPL sind dagegen ein wenig höher und liegen bei 0,8–1,0  $\mu\text{M}$ . Dieser Unterschied könnte den minimal höheren  $K_m$ -Wert der *G.tn.* –SPL, verglichen mit dem der *B.st.* –SPL, aus Kapitel 3.2 erklären. Die Güte der Bindungsstärke steht im Vergleich zur eingesetzten Konzentration des konstant gehaltenen Bindungspartners.<sup>[350]</sup> Liegt der  $K_d$ -Wert in der Größenordnung dieser Konzentration, so wird die Bindung als sehr stark betrachtet. In diesen Versuchen war die eingesetzte DNA-Konzentration 0,05  $\mu\text{M}$ . Die beobachteten Bindungsstärken lagen somit in einem Bereich mittlerer Bindungsstärke.



**Abbildung 48:** Dissoziationskonstanten  $K_d$  von *B.st.* –SPL Wildtyp und Aktivitätsmutanten sowie von *G.tn.* –SPL Wildtyp. Die Konstanten wurden bestimmt mit SP-dsDNA (Hellgrau), TT-dsDNA (Grau) und dsDNA mit Zufallssequenz (Dunkelgrau). Außerdem wurden der Einfluss von SAM und seinen Spaltprodukten auf die Bindung analysiert. **SAM:** mit SAM, **A&M:** mit AdoH und Methionin, **AdoH:** mit AdoH, **Met:** mit Methionin, **Apo:** ohne Cofaktor. Alle Messungen wurden mit 13mer-dsDNA durchgeführt (ODN1/12, ODN13/12 und ODN14/15) außer der mit **39mer** gekennzeichneten. Diese wurden mit SP-39mer-dsDNA (ODN1/4/16 und ODN13/4/16) und SAM gemessen. Die Reaktionsbedingungen sind in Kapitel 4.6 gegeben.

Bislang wurden noch keine Bindungsdaten für die SP-Lyase publiziert, jedoch sind Vergleichsdaten mit ungeschädigter 94mer-dsDNA aus der Dissertation von *Egidijus Zilinskas* aus der Gruppe von *Joan Broderick* verfügbar.<sup>[385]</sup> Die  $K_d$ -Werte sind etwas niedriger als die hier Gemessenen für 13mer-dsDNA. Da hier auch deutlich niedrigere Werte mit 39mer-dsDNA gemessen werden

konnten (*Abbildung 48*), ist anzunehmen, dass die Bindungsstärke mit der Länge des DNA-Stranges zunehmen könnte. Im *Kapitel 3.2* wurde ein vergleichbarer Effekt bei der Aktivität beobachtet. Ebenfalls zeigen die Daten *Zilinskas* nur geringfügige Unterschiede zwischen der SP-Lyase ohne SAM, mit SAM, ohne Cluster oder unter Sauerstoff-Atmosphäre. Auch in dieser Arbeit lagen die Werte für SPL-Wildtyp ohne Cofaktor (Apo-SPL) und mit SAM oder dessen Spaltprodukten im selben Bereich (circa 0,2–0,35  $\mu\text{M}$ ). Dies deutet darauf hin, dass die DNA-Bindung unabhängig von der Beschaffenheit der Cluster-Umgebung sein könnte.

Betrachtet man nur die Werte mit 13mer-dsDNA (*Abbildung 48*) so fällt auf, dass die Werte mit ungeschädigter dsDNA minimal niedriger waren als mit SP-dsDNA. Dieser Trend war nur bei den Messungen mit SAM-Cofaktor oder mit beiden SAM-Spaltprodukten, AdoH und Methionin, zu beobachten. In einem Review, der sich mit dem Schadens-Erkennungs-Mechanismus von DNA-bindenden Proteinen auseinandersetzt, wird der Vorschlag unterbreitet, dass die Energie für den energetisch kostspieligen Flipp-Mechanismus aus der Bindungsenergie zur DNA genommen wird.<sup>[376]</sup> Die Bindungsenergie ist direkt abhängig von der Dissoziationskonstante:<sup>[350]</sup>

$$\Delta G = RT \ln(K_d)$$

Daher ist anzunehmen, dass der Flipp-Mechanismus ebenfalls einen Einfluss auf die Dissoziationskonstanten besitzen könnte. Die niedrigeren  $K_d$ -Werte mit ungeschädigter DNA als mit SP-DNA könnten unter anderem damit erklärt werden; mit SP-DNA müsste zusätzliche Energie in den Flipp-Prozess fließen und der  $K_d$ -Wert würde sich erhöhen. Die Werte für ungeschädigte und SP-DNA lagen für die Versuche mit nur AdoH, nur Methionin oder ohne Cofaktor gleichauf (*Abbildung 48*). Dies könnte ein Hinweis sein, dass die SP-Lyase für diese Bedingungen eine höhere Energie zum Flippen aufbringen müsste. Das Flippen könnte eventuell nur mit gebundenem SAM-Cofaktor oder beiden Spaltprodukten, AdoH und Methionin, effizient erfolgen.

Allerdings ist es eine rein spekulative Annahme, dass die beobachtete Differenz in den  $K_d$ -Werten mit dem Flipp-Mechanismus korreliert. Der Effekt wurde beispielsweise aufgehoben, wenn längere (39mer) dsDNA verwendet wurde (*Abbildung 48*). Außerdem ist für SP-dsDNA mit vollständigem Rückgrat eine bessere Bindung zu erwarten: *Zilinskas* berichtet unter anderem von einer um 8,5  $\text{kJ mol}^{-1}$  schwächeren Bindung des Dinukleosids gegenüber dem Dinukleosid-Monophosphat.<sup>[385]</sup> Dies entspricht wenig mehr als einer Größenordnung für die  $K_d$ -Werte. Ein so starker Unterschied würde jedoch für die dsDNA mit SP-Dinukleosid zu dsDNA mit vollständigem Rückgrat nicht erwartet werden, da die Bindung durch den Duplex bereits verstärkt wurde. Außerdem wurden die  $K_d$ -Werte von ungeschädigter dsDNA und SP-dsDNA mit zunehmender Länge (39mer) in einem ähnlichen Größenverhältnis kleiner.

Um den Zusammenhang der Unterschiede im  $K_d$ -Wert mit dem Flipp-Prozess zu testen, wurden zum Ende der Doktorarbeit Versuche eines 2-Aminopurin-Assays durchgeführt.<sup>[386-389]</sup> Die Fluoreszenz dieser Base wird durch deren Positionierung im DNA-Duplex gequencht. Wird die gegenüberliegende Base jedoch aus dem Duplex geflippt, so sollte ein Signal sichtbar sein.<sup>[386-389]</sup> Leider überlagerte in diesen ersten Messungen die intrinsische Fluoreszenz des SPL-Proteins mit 24 Tyrosinen und zwei Tryptophanen das Signal des 2-Aminopurins. Die Ansätze konnten nicht ausgewertet werden.

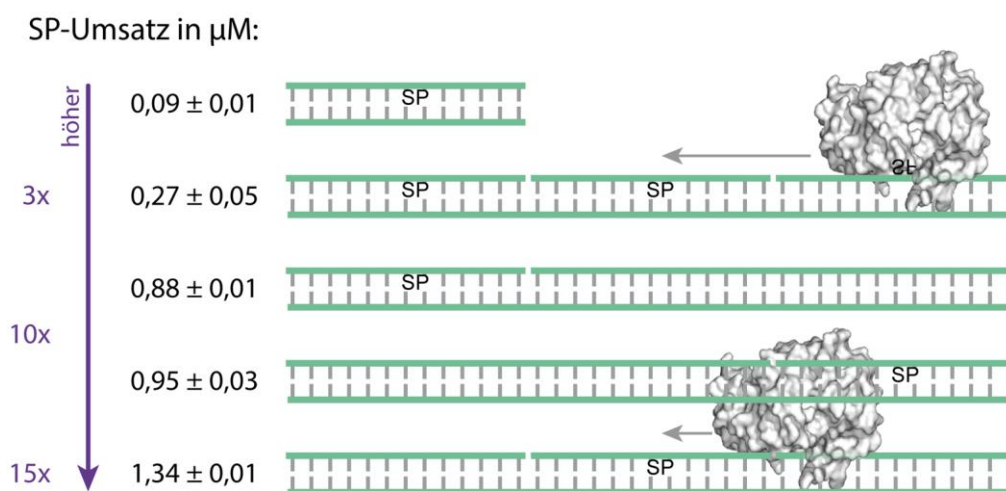
### ***Der Schadens-Such-Prozess der SP-Lyase***

Im Vergleich von CPD-Photolyasen und SP-Lyasen zeigt sich ein großer Unterschied in der Bindungsaffinität zu unspezifischer DNA. CPD-Photolyasen weisen eine um vier Größenordnungen niedrigere Bindungsaffinität zu DNA ohne UV-Schäden auf,<sup>[159,178,186-187,390]</sup> während die SP-Lyasen, wie oben gezeigt wurde, ähnlich große Bindungsaffinitäten zu DNA mit oder ohne Sporen-Photoprodukt besitzen. Dies deutet darauf hin, dass die beiden Enzym-Familien ihre Substrate auf unterschiedliche Art und Weise erkennen könnten.

Auch die SP-Lyase wies eine gewisse Sequenz-Spezifität auf. Die meisten Messungen mit ungeschädigter DNA erfolgten mit der Produkt-Sequenz des verwendeten SP-Stranges (TT anstatt SP). Wählte man jedoch eine zufällige Sequenz ohne TT-Stellen (ODN14/15), so vergrößerte sich der  $K_d$ -Wert (*Abbildung 48*). Die SP-Lyase schien damit bevorzugt an TT-reiche Stellen binden zu können. Dies ist physiologisch sinnvoll, da sich die UV-Schäden an solchen Sequenz-Stellen akkumulieren sollten. Die Verschlechterung lag aber auch hier nur im Bereich einer Größenordnung.

Da die SPL-Werte in einem Bereich mittlerer Bindungsstärke lagen, könnte die SP-Lyase dem Review von *Friedman & Stivers* zufolge an der DNA entlang gleiten (engl.: *sliding*).<sup>[376]</sup> Der Mechanismus des Gleitens ist für DNA-Reparaturenzyme sehr sinnvoll, um die spezifischen Schäden in dem großen Gewirr der genomischen DNA zu finden – sozusagen die „Nadel im Heuhaufen“. Dabei stellt man sich vor, dass der Gleit-Prozess als 1D-Diffusion entlang der DNA gekoppelt ist mit Sprüngen (engl.: *hopping*) auf benachbarte DNA-Fragmente (3D-Diffusion).<sup>[376]</sup> Die 1D-Diffusion erhöht die Effizienz der Schadens-Suche, da die Suche direkt am DNA-Strang erfolgt und die Schäden durch spezifische Interaktionen erkannt werden könnten. Allerdings wäre dieses Gleiten an der DNA abhängig von der Lebenszeit des Enzyms an der DNA;<sup>[376]</sup> die Lebenszeit korreliert mit der Affinität des Enzyms an unspezifische DNA. Die folgende Dissoziation des Enzyms von der DNA würde den Sprung auf ein neues, benachbartes DNA-Fragment ermög-

lichen.<sup>[376]</sup> Da sich ein Enzym durch die 1D-Diffusion auch von einem Schaden entfernen kann, anstatt sich einem zu nähern – bei der SP-Lyase, beispielsweise, wenn es durch das Gleiten eine TT-reiche Sequenz verlässt – wären solche Sprünge durchaus sinnvoll. Es wird angenommen, dass durch eine geeignete Kombination von Gleit- und Sprung-Phasen jedes Enzym die Effizienz der Schadens-Suche für sein Substrat optimiert hat.<sup>[391]</sup> Berechnungen zufolge variieren die abgesuchten DNA-Abschnitte zwischen 10 und 100 Basenpaaren.<sup>[376]</sup> Umso länger der abgesuchte Abschnitt ist, desto besser sollte die Bindung an unspezifische DNA sein.<sup>[376]</sup> Dieses Modell könnte somit die relativ hohe Bindungsaffinität der SP-Lyase an unspezifische DNA erklären. Auch für CPD-Photolyasen wäre ein Gleit-Prozess vorstellbar, in dem allerdings wesentlich kürzere Abschnitte abgesucht würden und dadurch eine geringere Affinität zur DNA ohne CPD-Schäden notwendig wäre.



**Abbildung 49:** SPL-Reaktionen mit unterschiedlichen dsDNA-Substraten zur Untersuchung der Gleitfähigkeit und Direktionalität der SP-Lyase. Es wurden 13mer-dsDNA (ODN1/2) und 39mer-dsDNA mit drei gleichmäßig verteilten SP-Dinukleosiden ( $3 \times \text{ODN1}$ ,  $1 \times \text{ODN17}$ ), mit einem SP-Dinukleosid am 5'-Ende (ODN1/18/19), mit einem SP-Dinukleosid am 3'-Ende (ODN1/18/20) und mit einem SP-Dinukleosid in der Mitte des Stranges ( $2 \times \text{ODN4}$ ,  $1 \times \text{ODN1/5}$ ) untersucht. Die DNA-Stränge wurden aus Einzelsträngen zusammengesetzt, so dass derselbe SP-Strang verwendet werden konnte. Reaktionsbedingungen:  $10 \mu\text{M}$  rekonstituierte *G.tn.* –SPL,  $20 \mu\text{M}$  dsDNA,  $1 \text{ mM}$  SAM,  $1 \text{ mM}$  Dithionit in  $50 \text{ mM}$  HEPES,  $200 \text{ mM}$  NaCl und  $5\%$  Glycerol (pH 7,5) bei  $35^\circ\text{C}$  für  $5 \text{ h}$ . Die Proben wurden anschließend auf der HPLC analysiert.

Die Hypothese, dass die SP-Lyase an der DNA entlang gleiten und dadurch spezifische und unspezifische DNA gleich affin binden könnte, sollte mit einem einfachen Versuch bekräftigt werden. Der Umsatz (in  $\mu\text{M}$ ) verschiedener SP-DNA-Stränge wurde in einer Endpunkt-Reaktion miteinander verglichen. Nach fünf Stunden wurden  $0,09 \pm 0,01 \mu\text{M}$  einer 13mer-dsDNA mit einem Sporen-Photoprodukt repariert. Wurde ein dreimal längeres dsDNA-Substrat mit drei SP-Molekülen verwendet, so war der Umsatz pro DNA-Strang gleich ( $0,09 \pm 0,02 \mu\text{M}$ ), der Umsatz pro Sporen-Photoprodukt war aber um das Dreifache größer ( $0,27 \pm 0,05 \mu\text{M}$ ). Dies könnte

so interpretiert werden, dass die SP-Lyase einmal an den Strang bindet und nach erfolgter, erster Reparatur an der DNA entlang gleitet, um die beiden anderen Schäden reparieren zu können (*Abbildung 49*).

Um festzustellen, ob das Enzym in eine bestimmte Polaritäts-Richtung gleiten könnte, wurden außerdem 39mer-Stränge getestet, die das Sporen-Photoprodukt am 5'-Ende, am 3'-Ende oder in der Mitte binden (*Abbildung 49*). Die SP-Lyase würde wenn in eine willkürliche Richtung gleiten, da der Umsatz mit 5'-SP und 3'-SP ungefähr gleich war. Bemerkenswert war jedoch, dass zehnmal mehr Sporen-Photoprodukt repariert wurde als im einfachen 13mer. Der Strang mit einem Sporen-Photoprodukt in der Mitte wurde sogar 15-mal häufiger repariert. Dies zeigte, dass die SP-Lyase auf beiden Seiten des Schadens einen gewissen Bindungsanspruch an unspezifische DNA besitzen könnte. Vermutlich könnte sie die zusätzlichen Basenpaare benötigen, um die DNA effizient zu krümmen; dies ist ein Prozess der den Flipp-Mechanismus begleiten könnte. Dieses Ergebnis war erstaunlich, da durch DNase-I-Verdau-Experimente gezeigt wurde, dass die SP-Lyase nur einen DNA-Abschnitt von neun Basenpaaren schützt.<sup>[331]</sup> Dieser Wert würde daher nicht mit der effizientesten Stranglänge zur Bindung beziehungsweise Reparatur übereinstimmen. Dass die SP-Lyase eine stärkere Bindung an das 39mer mit einem Sporen-Photoprodukt aufwies, wurde bereits in *Abbildung 48* gezeigt. Dass sich dies positiv auf die katalytische Effizienz auswirkte, wurde bereits im *Kapitel 3.2* angesprochen.

Die Ergebnisse sind vergleichbar mit anderen Enzymen, die an der DNA gleiten: Die Glykosylase ROS1, die an der DNA-Demethylierung in *Arabidopsis* beteiligt ist, gleitet ebenfalls ohne Direktionalität und der Gleit-Prozess wirkt sich stark positiv auf die katalytische Aktivität aus.<sup>[392]</sup> Auch die humane *O*<sup>6</sup>-Alkylguanin-DNA-Alkyltransferase (AGT) zeigt keine Direktionalität an dsDNA und nur eine geringe Sequenzspezifität.<sup>[393]</sup>

### **Potentielles Bindungsmodell der SP-Lyase mit dsDNA**

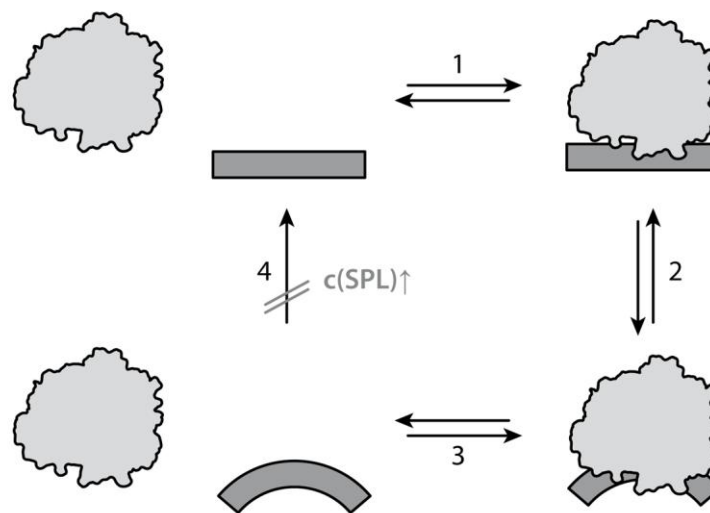
In den Bindungskurven der SP-Lyase (*Abbildung 47*) zeigte sich eine offensichtliche Kooperativität, da die Kurven keinem hyperbolischen, sondern einem sigmoidalen Verlauf folgten.<sup>[350]</sup> Unter Kooperativität versteht man normalerweise den Effekt, dass die Bindung eines Liganden die Bindung eines zweiten Liganden positiv oder negativ beeinflusst.<sup>[394-395]</sup> Dies kann auch mit der Oligomerisierung des Proteins einhergehen, wie zum Beispiel im tetrameren Hämoglobin, welches Sauerstoff positiv kooperativ bindet.<sup>[396]</sup> Mittlerweile wurde ein Effekt der dem der Kooperativität gleich kommt auch in monomeren Enzymen mit nur einer Substratbindestelle gefunden.<sup>[383]</sup> Das beste Beispiel dafür ist die Glucokinase.<sup>[397]</sup> Die sigmoidalen Kurven werden

hier durch langsame strukturelle Änderungen im Enzym erklärt, wie zum Beispiel im LIST-Modell (engl.: *ligand induced slow transition*).<sup>[398]</sup> Durch diesen Unterschied wird der erste, „wahre“ Kooperativitäts-Effekt als thermodynamische Kooperativität und der zweite, auf strukturellen Änderungen beruhende Effekt als kinetische Kooperativität bezeichnet.<sup>[383]</sup> Beide Arten von Effekten werden mit der *Hill*-Gleichung (S. 90).<sup>[384]</sup> ausgewertet. In der thermodynamischen Kooperativität gibt der *Hill*-Koeffizient die Anzahl der gebundenen Liganden wieder. In der kinetischen Kooperativität ist er nur eine relative Größe des Kooperativitäts-Effekts.<sup>[383]</sup>

Während der Bindung der SP-Lyase an DNA könnte es durchaus möglich sein, dass mehrere SPL-Moleküle gleichzeitig an ein DNA-Molekül binden. Aus der Kristallstruktur<sup>[8]</sup> (zum Beispiel *Abbildung 53*) erscheint es dagegen weniger wahrscheinlich, dass zwei Bindungsstellen für die DNA existieren könnten. Um das Bindeverhältnis zu bestimmen wurde deshalb versucht die Methode des *Job's Plots*<sup>[399]</sup> auf die Fluoreszenz-Polarisation anzuwenden. Leider war dies auch nach mehreren Ansätzen nicht umsetzbar. Der Grund könnte sein, dass die Fluoreszenz-Polarisations-Methode nur einen relativen Wert der DNA-Protein-Komplex-Konzentration wiedergibt und so nicht dem *Beer'schen* Gesetz gehorcht.<sup>[399]</sup>

Deshalb wurden die *Hill*-Koeffizienten betrachtet. Eine Sammlung dieser ist in *Appendix 6* zu finden. Die Werte lagen für Bindungsstudien mit 13mer-dsDNA bei 1,7–5,2; einzelne Werte lagen sogar darüber mit bis zu 20,5. Diese starke Schwankung der Werte ist eher unüblich für den *Hill*-Koeffizienten einer thermodynamischen Kooperativität, der die Anzahl der gebundenen Substrate an ein Protein wiedergibt.<sup>[350]</sup> Im Fall der Fluoreszenz-Polarisation sollte er, aufgrund der inversen Messung (Proteinkonzentration nimmt zu), die Anzahl der Proteine, die an ein DNA-Molekül binden, wiedergeben. Es ist jedoch sehr unwahrscheinlich, dass mehr als zwei Proteine an ein 13mer binden, da die SP-Lyase mindestens neun Basenpaare zur Bindung benötigt, wie mittels der DNase-I-Versuche<sup>[331]</sup> und der Ergebnisse oben gezeigt wurde. Betrachtet man die *Hill*-Koeffizienten der Bindungsstudien mit 39mer-dsDNA so lagen diese, ähnlich wie für 13mer-dsDNA, bei 2,1 und 2,4. Aufgrund dieser Inkonsistenz gibt der *Hill*-Koeffizient im SPL-System vermutlich nicht die Anzahl der an der DNA gebundenen Proteine wieder. Stattdessen könnte hier der Effekt der kinetischen Kooperativität vorliegen. Würde längere DNA verwendet werden, würden sich die beiden Effekte voraussichtlich mischen, da mehrere Proteine an die DNA binden könnten. Einen weiteren Hinweis auf kinetische Kooperativität in der SP-Lyase gab der hyperbole Kurvenverlauf der *Michaelis-Menten*-Messungen in *Abbildung 27*. Würde es sich um thermodynamische Kooperativität handeln, so sollte sich diese auch in der Messung des  $K_m$ -Wertes als sigmoidale Kurve widerspiegeln.<sup>[350]</sup> Die  $K_m$ -Kurven folgten aber einem hyperbolischem Verlauf (*Abbildung 27*).

Wie aber kann erklärt werden, dass sich die Affinität des Proteins an die DNA verbesserte, wenn die Proteinkonzentration vergrößert wurde? In anderen Systemen, wie der Glucokinase, wird die Affinität mit steigender Substratkonzentration verbessert.<sup>[383]</sup> Als Erklärung werden langsame, strukturelle Änderungen im Enzym gegeben, die vom Substrat induziert werden und die Affinität zu diesem erhöhen (kinetische Kooperativität).<sup>[383]</sup> Da in den FP-Messungen nicht die Substrat-, sondern die Proteinkonzentration variiert wurde, sollte es in Betracht gezogen werden, dass sich dieser Effekt umkehren könnte. Statt strukturellen Änderungen im Protein könnte eine langsame Konformationsänderung der DNA durch die SP-Lyase hervorgerufen werden. Die CD-Spektren in *Abbildung 44 (Kapitel 3.4)* zeigten, dass nach Bindung von ungeschädigter oder SP-dsDNA Konformationsänderungen auftreten könnten. Unter dieser Annahme wurde ein hypothetisches Bindungsmodell der SP-Lyase erstellt (*Abbildung 50*):



**Abbildung 50:** Potentielles Bindungsmodell der SP-Lyase zur Erklärung des Kooperativitäts-ähnlichen Effekts. Während der Bindung könnte die SP-Lyase eine Konformationsänderung der DNA verursachen. Bei einer geringen SPL-Konzentration könnte die DNA nach Dissoziation wieder in die Ausgangs-Konformation relaxieren und zur Bindung eines neuen SPL-Moleküls würde der Prozess von vorn begonnen werden. Bei einer hohen SPL-Konzentration jedoch wäre die Wahrscheinlichkeit höher, dass ein neues SPL-Molekül sofort an die dissoziierte DNA bindet und diese nicht wieder relaxieren könnte. Dadurch könnte sich bei hohen SPL-Konzentrationen ein Bindungs-Gleichgewicht im Schritt 3 einstellen.

Das Modell geht zunächst von einer geringen SPL-Konzentration aus. Im ersten Schritt würde das Protein mit geringer Affinität an die DNA binden. Um die Affinität zu erhöhen und vermutlich eine bessere Ausgangssituation zur Katalyse zu schaffen, könnte das Protein daraufhin die DNA umformen (Schritt 2). Die Bindung ist allerdings eine Gleichgewichtsreaktion, das heißt Protein und DNA würden im dritten Schritt erneut dissoziieren. Wegen der nur geringen SPL-Konzentration, wäre die Wahrscheinlichkeit, dass sofort ein zweites SPL-Molekül binden könnte, klein. Die DNA hätte also genug Zeit, um wieder zu relaxieren. Da es energetisch unwahrschein-

lich ist, dass sich die DNA in Lösung zurückformen könnte (Schritt 4 wäre irreversibel), würde die nächste Bindungsreaktion wieder von Schritt 1 starten.

Ist die SPL-Konzentration dagegen sehr viel größer als die DNA-Konzentration, so dass die DNA mit Protein abgesättigt wäre, wäre die Wahrscheinlichkeit hoch, dass nach Dissoziation sofort ein weiteres SPL-Molekül binden könnte. Die DNA könnte somit nicht relaxieren und läge für die Bindung bereits in der für die SP-Lyase hoch-affinen Konformation vor. Dies bedeutet, dass bei hohen SPL-Konzentrationen Schritt 4 wegfiel und sich stattdessen ein Gleichgewicht der Reaktionen im dritten Schritt einstellen würde. Mit steigender SPL-Konzentration würde sich die Fraktion der Moleküle vergrößern, die im dritten Schritt im Gleichgewicht stehen könnte. Damit würde sich auch die Affinität der SP-Lyase zur DNA erhöhen, wodurch ein kooperativer Effekt hervorgerufen werden könnte.

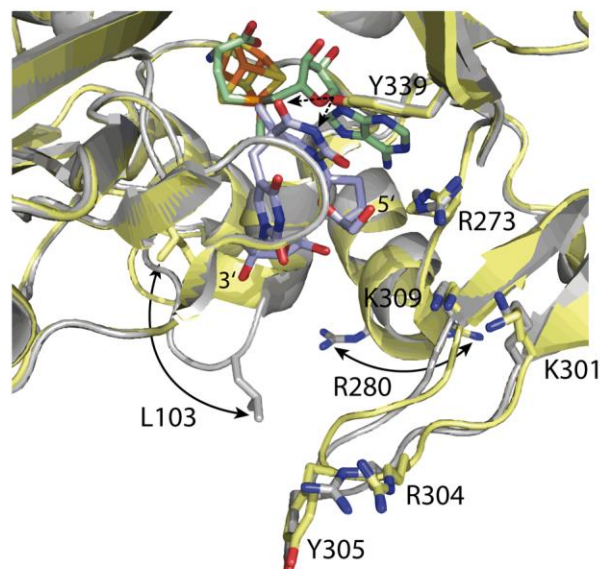
Nun stellt sich die Frage, welcher Art die strukturelle Änderung der DNA sein könnte. Für DNA-Reparaturenzyme sind zwei wesentliche Konformationsänderungen bekannt: der Flipp-Prozess und eine Krümmung der DNA, um das Flippen zu erleichtern.<sup>[376]</sup> Die erstere kann für das Kooperativitätsmodell ausgeschlossen werden, da die Bindung auch mit ungeschädigter DNA kooperativ ist (*Appendix 6*). Die Krümmung der DNA, dagegen, könnte einen solchen Effekt auslösen. Ein starker Krümmungswinkel von 50° wird zum Beispiel in der CPD-Photolyase erreicht.<sup>[189]</sup> Es ist jedoch unklar, ob diese DNA-Biegung auch vor dem Flippen erfolgen oder ob beide Vorgänge konzertiert ablaufen würden. Im letzten Fall bliebe im Hinblick auf die *in-vivo*-Situation der SP-Lyase noch eine weitere Erklärung: Da die SP-Lyase in der ersten Phase nach der Keimungsinitiierung der bakteriellen Sporen aktiv ist,<sup>[6,316,321]</sup> könnte sie für die Bindung an AB-DNA anstatt an B-DNA optimiert sein. Der Effekt der Kooperativität würde außerdem bedeuten, dass die SP-Lyase in der Lage wäre kurze DNA-Stränge in AB-DNA umzuwandeln. Demzufolge könnte *in vivo* kein Kooperativitätseffekt vorliegen, da die DNA durch die Bindung der SASPs bereits als AB-DNA vorliegt<sup>[17]</sup> (*Kapitel 1.3*).

### ***Aminosäuren beteiligt an der DNA-Bindung und dem Flipp-Mechanismus***

Die Entdeckung, dass die SP-Lyase vermutlich an der DNA entlang gleitet, warf die Frage auf, wie das Sporen-Photoprodukt während diesem Prozess erkannt werden könnte, welche Reste an der DNA-Bindung beteiligt sein könnten, und welche Interaktionen das Flippen auslösen könnten. Um erste Daten zur Beantwortung dieser Frage zu sammeln, wurden acht Aminosäure-Reste im aktiven Zentrum und der potentiellen DNA-Bindestelle mutiert und analysiert (*Abbildung 51*). Zur Unterscheidung zu den Aktivitätsmutanten aus den ersten Kapiteln werden diese vereinfacht als Flipp-Mutanten bezeichnet.



Es wurden zunächst Reste ausgewählt (*Abbildung 51*), die eindeutige Konformationsänderungen nach der Bindung des Sporen-Photoprodukts in der aktiven Tasche durchlaufen (L103 und R280). Zudem sind Reste der  $\beta$ -Haarnadelschleife interessant, da für dieses Strukturmotiv bereits eine Rolle an der DNA-Bindung und dem Flipp-Prozess vorgeschlagen wurde.<sup>[8]</sup> Es wurden die beiden Reste an der Spitze (R304 und Y305) sowie die beiden positiv geladenen Lysine am Anfang und Ende der Schleife (K301 und K309) gewählt. R273 wurde ausgesucht, da dieser ebenfalls positiv geladene Rest in der strukturellen Nähe zum SP-Dinukleosid liegt (*Abbildung 51*) und daher am Flipp-Mechanismus beteiligt sein könnte. Die letzte Aminosäure Y339 scheint an der Bindung und Stabilisierung des Sporen-Photoprodukts in der aktiven Tasche beteiligt zu sein.<sup>[8]</sup> Deshalb wurde diese als Positivkontrolle ebenfalls mutiert. Um die Ladungseigenschaften der Aminosäuren in den Mutanten auszuschalten, wurden alle Lysine und Arginine zu einem Alanin mutiert; die Tyrosine wurden durch Phenylalanine ersetzt und das Leucin durch ein Glycin.



**Abbildung 51:** Darstellung der Aminosäuren im aktiven Zentrum und der DNA-Bindestelle der SP-Lyase, die zur Untersuchung der DNA-Bindung und des Flipp-Mechanismus mutiert wurden. Es wurden solche Aminosäuren ausgewählt, die eine deutliche Konformationsänderung während der Bindung des Sporen-Photoprodukts durchlaufen (L103 und R280), solche, die an der Spitze der  $\beta$ -Haarnadelschleife sitzen (R304 und Y305) und solche, die eine positive Ladung besitzen (K301, K309 und R273) oder an der SP-Bindung beteiligt sind (Y339).<sup>[8]</sup> Tyrosine wurden in Phenylalanine mutiert, L103 in ein Glycin und alle anderen in Alanine. Die Struktur vor der SP-Bindung ist in Grau, die Struktur nach der SP-Bindung in Gelb, das Sporen-Photoprodukt in Blau und der SAM-Cofaktor in Grün dargestellt. PDB 4FHD und 4FHC

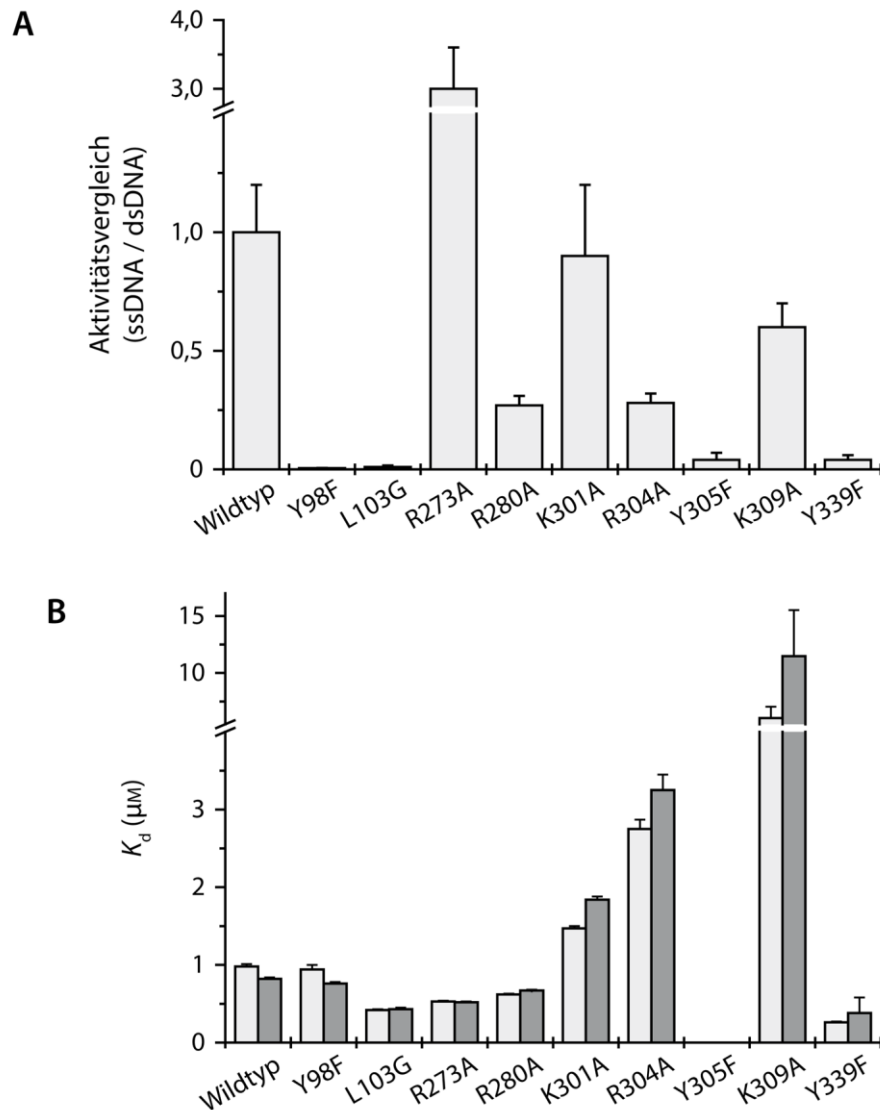
Zur Evaluation dieser Flipp-Mutanten wurden zwei unterschiedliche Reaktionsansätze durchgeführt und miteinander verglichen. Zum einen wurde die relative Aktivität der Mutanten gemessen. In *Kapitel 3.2* wurde beschrieben, dass ssDNA schneller von der SP-Lyase repariert wurde als dsDNA, da vermutlich keine zusätzliche Energie zum Flippen aufgewandt werden müsste. Wird allerdings eine Aminosäure mutiert, die am Flipp-Prozess und daher an der Stabilisierung des

geflippten SP-Stranges beteiligt sein könnte, könnte auch ssDNA schlechter umgesetzt werden, da diese dem geflippten SP-Strang entspricht. Bestimmt man die Aktivität der SPL-Mutanten mit ssDNA und dsDNA, setzt sie zueinander ins Verhältnis und normiert sie auf das Wildtyp-Verhältnis (*Abbildung 52A*), so sollte man feststellen können, welche der Aminosäuren vermutlich eine entscheidende Rolle spielen. Diese Größe wird im Folgenden als „Aktivitätsvergleich“ bezeichnet. Für diesen Ansatz wurde eine DNA-Konzentration gewählt, die dem  $wtK_m$ -Wert entspricht und mittels Zeitreaktionen wurde  $V_{max}/2$  als Aktivitätswert bestimmt (*Appendix 7*). Aus den  $V_{max}/2$ -Werten wurde schließlich der „Aktivitätsvergleich“ bestimmt.

Mutanten, deren Reste nicht am Flipp- jedoch am Gleit-Prozess beziehungsweise nur an der Bindung der DNA beteiligt sein könnten, sollten voraussichtlich nicht an ihrer Aktivität einbüßen. Um diese dennoch charakterisieren zu können und zudem die Flipp-Kandidaten zu überprüfen, wurden auch die  $K_d$ -Werte der SPL-Mutanten gemessen (*Abbildung 52B*).

Neben diesen Mutanten wurden die Messungen mit Wildtyp zur direkten Kontrolle und mit der Y98F-Aktivitätsmutante durchgeführt. Diese zeigte bereits in den vorangegangenen Kapiteln Verschlechterungen im  $K_m$ -Wert und der katalytischen Effizienz  $k_{cat}/K_m$ , die durch beeinträchtigte Konformationsänderungen im aktiven Zentrum erklärt werden könnten. Der „Aktivitätsvergleich“ von Y98F zeigte einen maximalen Aktivitätsverlust bei ssDNA; der Umsatz der dsDNA blieb jedoch im selben Größenbereich wie der des Wildtyps (*Appendix 7*). Die Dissoziationskonstanten mit SP-dsDNA und ungeschädigter dsDNA belegten, dass die Bindung der DNA durch die Mutation nicht beeinflusst wurde. Es kann daher angenommen werden, dass die Konformationsänderung im aktiven Zentrum, die nach Bindung des Schadens stattfindet,<sup>[8]</sup> in der Mutante beeinträchtigt sein könnte. Womöglich könnte dadurch die Ausrichtung oder Stabilisierung des Sporen-Photoprodukts im aktiven Zentrum gestört werden. In ssDNA wäre dieser Effekt drastischer, da die Stabilisierung durch den Gegenstrang fehlen würde.

Ähnlich wie Y98F wiesen L103G, R280A und Y339F (*Abbildung 51*) eine hohe beziehungsweise sogar höhere Bindungsaffinität auf als die Wildtyp-SPL, während ihre relative Aktivität schlecht bis sehr schlecht war. Die Reste schienen somit nicht an der DNA-Bindung beteiligt zu sein, könnten aber dennoch die Aktivität der SP-Lyase beeinträchtigen. Für Y339F wurde ein solcher Effekt im Vorfeld erwartet (Positivkontrolle), da dieser Rest an der Bindung des Sporen-Photoprodukts beteiligt ist.<sup>[8]</sup> Nach Mutation zu Phenylalanin würde somit die Stabilisierung oder Ausrichtung des Schadens beziehungsweise das Flippen beeinträchtigt werden.



**Abbildung 52:** Vergleich der relativen Aktivität **(A)** und der Dissoziationskonstanten **(B)** der *G.tn.* –SPL-Flipp-Mutanten. **(A)** Die relative Aktivität wurde als Aktivitätsvergleich zwischen ssDNA und dsDNA gemessen und auf den Wert des Wildtyps normiert. Die Einzelwerte und Reaktionsbedingungen sind in *Appendix 7* angegeben. **(B)** Die Messungen erfolgten mit SAM und SP-dsDNA (ODN1/12, Hellgrau) oder TT-dsDNA (ODN13/12, Grau). Die Hill-Koeffizienten sind in *Appendix 6* gegeben. Für Y305F konnte keine Bindung gemessen werden.

Für L103G und R280A lässt sich keine einfache Erklärung für dieses Verhalten finden. Beide Reste sind nicht direkt im aktiven Zentrum lokalisiert,<sup>[8]</sup> besonders R280A (*Abbildung 51*). Daher scheint eine Beeinträchtigung des Mechanismus oder der direkten Stabilisierung des Sporen-Photoprodukts unwahrscheinlich zu sein. Der Einfluss könnte daher indirekter Art sein. Beispielsweise könnte das positiv geladene R280 vor, beziehungsweise, nach dem Flipp-Prozess mit dem SP-Strang interagieren und ihn stabilisieren. Dies wäre weniger gut vorstellbar für L103, da dieser Rest einen hydrophoben Charakter besitzt. Betrachtet man die Position und die Konformationsänderung nach SP-Bindung von L103<sup>[8]</sup> (*Abbildung 51*), so wäre es aber möglich, dass dieser Rest vor dem Flippen das aktive Zentrum vom Lösungsmittel abschotten könnte. Nach Flippen

des Sporen-Photoprodukts in die aktive Tasche würde diese Funktion nicht mehr benötigt werden und L103 könnte durch die Konformationsänderung, die in der Mutante beeinträchtigt zu sein scheint, stattdessen dem SP-Strang Platz in der aktiven Tasche schaffen.

Die Mutante R273A zeigte, nicht wie die anderen Mutanten, auf den ersten Blick keine vergleichbare Beeinträchtigung. Die Bindung und die Aktivität waren ausgezeichnet. Dieser Arginin-Rest schien also nicht nennenswert an der Stabilisierung des geflippten Stranges beteiligt zu sein, obwohl er dafür gut positioniert wäre (*Abbildung 51*). Allerdings ist auffällig, dass ssDNA dreifach besser als im Wildtyp repariert wurde. Eine Rolle im Flipp-Mechanismus könnte daher nicht vollständig ausgeschlossen werden. Das Arginin könnte beispielsweise während dem Flipp-Prozess den SP-Strang aktiv in die Tasche ziehen. dsDNA würde deswegen in der Mutante noch langsamer umgesetzt werden als ssDNA, da noch mehr Energie als im Wildtyp für den Flipp-Mechanismus aufgewandt werden müsste.

Von den vier  $\beta$ -Haarnadelschleifen-Mutanten, war nur K301A vergleichbar aktiv zum Wildtyp (*Abbildung 52*). Die Affinität zur DNA war jedoch um fast das Doppelte geringer. Dieses Lysin könnte daher nur an der DNA-Bindung mitwirken. Die drei anderen Mutanten, R304A, Y305F und K309A, zeigten sowohl eine schlechtere relative Aktivität, als auch eine erniedrigte Affinität an die DNA. Für Y305F konnte nicht einmal eine Bindung an das Protein detektiert werden und daher wies es nur minimalste Aktivität auf (*Appendix 7*). In K309A war andererseits die Bindung stärker beeinträchtigt als die relative Aktivität. Seine Funktion der DNA-Bindung könnte daher wichtiger sein. Für alle drei Reste wäre aufgrund dieser Ergebnisse und ihrer Positionierung in der DNA-Bindungstasche<sup>[8]</sup> (*Abbildung 51*) eine Rolle beim Schadens-Erkennungs- und Flipp-Prozess vorstellbar.

Für R304 und Y305 wäre eine Rolle in der Schadens-Erkennung durchaus plausibel, da Arginine und aromatische Aminosäuren auch in anderen Reparaturenzymen an diesem Prozess beteiligt sind: In der CPD-Photolyase interagiert R429 mit einem Adenin im Gegenstrang des geflippten Stranges, um diesen zu stabilisieren.<sup>[189]</sup> Auch in der *O*<sup>6</sup>-Alkylguanin-DNA-Alkytransferase fördert R128 vermutlich den Flipp-Prozess durch Interkalation und letztendlich Stabilisierung der Lücke im offenen Duplex.<sup>[393]</sup> In der UV-Schadens-Endonuklease<sup>[400]</sup> dagegen schiebt sich ein Tyrosin in die DNA-Helix, um so das Flippen zu fördern, genau wie in der RECQ1-Helikase,<sup>[401]</sup> in der sich das Tyrosin ebenfalls an der Spitze einer  $\beta$ -Haarnadelschleife befindet. Die Erkennung des Schadens könnte, wenn es, wie im Fall des MutS-Enzyms,<sup>[402]</sup> über Stapelkräfte zur Fehlpaarung erfolgt, auch über ein Phenylalanin stattfinden.<sup>[403]</sup> Da die Mutation von Y305 zu einem

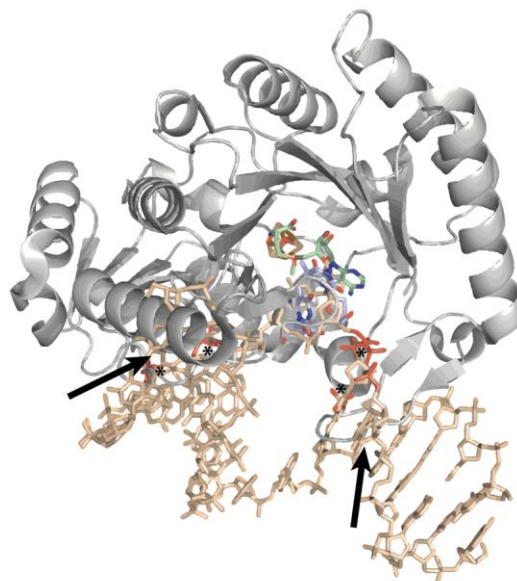
Phenylalanin jedoch einen derart drastischen Effekt zeigte, könnten noch Interaktionen über die OH-Gruppe von Y305 zur DNA ausgebildet werden.

Die meisten der untersuchten Reste sind hoch bis 100% konserviert in der SPL-Familie (*Appendix 1*). R304 und Y305, die eine wichtige Rolle spielen könnten, sind überraschenderweise nur in der Bacilli-Klasse 100% konserviert. In Clostridien befinden sich ein Phenylalanin und ein Glutamin an den entsprechenden Positionen. Da die Clostridien-SPL aber viele Abweichungen in der Aminosäuresequenz aufweisen – unter anderem ein Alanin anstatt dem am Radikal-Zyklus beteiligten Cystein (C140 in *Geobacillus*-SPL) – ist es möglich, dass die  $\beta$ -Haarnadelschleife in der Clostridien-SPL anders ausgerichtet sein könnte. An den Positionen, die in der *G.tn.*-SPL 302 und 307 entsprechen, liegen beispielsweise zwei Tyrosine, die dort eine Rolle in der Schadens-Erkennung übernehmen könnten.

### **Weiterführende Spekulationen zur Bindung an AB-DNA**

In der Diskussion des Kooperativitäts-Effekts wurde der Vorschlag unterbreitet, dass die SP-Lyase mit höherer Affinität an AB-DNA als an B-DNA binden könnte. Dieser Gedanke wurde hier weiter verfolgt, um festzustellen, dass dies physiologisch gesehen durchaus sinnvoll wäre.<sup>[6,315,321]</sup> Die SP-Lyase ist während der Sporenphase in den bakteriellen Endosporen eingelagert. Die SPL-Reparatur beginnt sofort nach der Initiierung der Keimung, hört aber in einer späteren Phase auf und überlässt die restlichen Sporen-Photoprodukte dem Nukleotid-Exzisions-Mechanismus.<sup>[6,316,321]</sup> Für den effizienten Start der Reparatur wäre es sinnvoll, wenn die SP-Lyase in der Sporenphase bereits an der DNA positioniert wäre und eventuell sogar daran gebunden hätte. Läge sie im Cytosol, so würde die Reparatur verzögert stattfinden. Die SP-Lyase müsste in diesem Fall an die große Furche der AB-DNA binden, da die kleine Furche mit den SASP-Proteinen, welche die Konformationsänderung der DNA zum AB-Typ auslösen, gesättigt ist.<sup>[17]</sup> Die SASP-Proteine werden im Laufe der Keimung jedoch abgebaut<sup>[404]</sup> und die DNA regeneriert sich so zur B-Form. Dieser Prozess könnte mit dem Aktivitätsverlust der SP-Lyase korrelieren. Die SP-Lyase könnte vorwiegend für die Reparatur des Sporen-Photoprodukts in der AB-DNA und die NER für die Reparatur in der B-DNA zuständig sein, wobei sie ab einer bestimmten Phase des SASP-Abbaus ineinander übergehen könnten. Diese Kombination würde nicht nur eine effiziente, sondern auch eine sehr schnelle SP-Reparatur während der Keimung ermöglichen. Da keiner der beiden Prozesse in der Sporen-Phase aktiv ist, scheinen sie Aktivierungsfaktoren zu benötigen,<sup>[6]</sup> die erst nach Start der Keimung von der Zelle zur Verfügung gestellt werden können, wie beispielsweise ein Reduktionsmittel für die SP-Lyase.

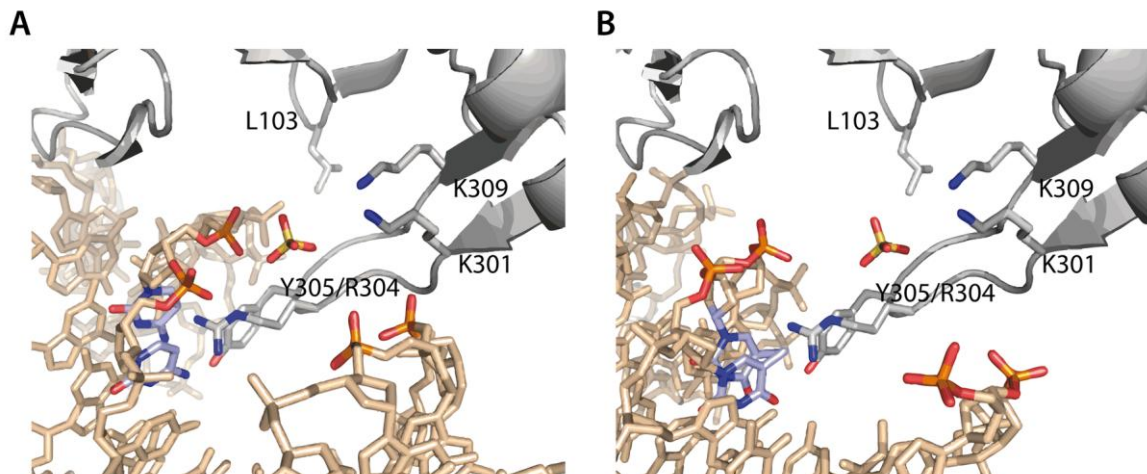
In diesem Zusammenhang wären folglich Experimente – insbesondere Kristallstrukturen – interessant, mit Hilfe derer man die Konformation der DNA nach Bindung an die SP-Lyase untersuchen könnte. Da Kristallstrukturen von SPL-DNA-Komplexen bislang erfolglos waren, haben *Benjdia et al.*<sup>[8]</sup> die starre DNA der (6–4)-Photolyase<sup>[144]</sup> in das aktive Zentrum der SP-Lyase gemodelt (*Abbildung 53*). Dabei wurde sich vor allem an den in der SP-Lase gebundenen Sulfaten und dem Pyrophosphat orientiert, so dass Phosphate des DNA-Rückgrats an diesen Positionen zu liegen kamen. Betrachtet man die globale Struktur dieses Modells – welches hier nachgestellt wurde (*Abbildung 53*) – fällt allerdings auf, dass die (6–4)-DNA nicht annähernd perfekt in die Bindungstasche der SP-Lyase passt. Der geflippte Strang würde zwar gut in die aktive Tasche passen, doch die DNA kollidiert in diesem Modell an zwei Stellen mit dem Enzym (Pfeile in *Abbildung 53*), unter anderem mit der  $\beta$ -Haarnadelschleife. Dies könnte darauf hinweisen, dass die SP-Lyase die DNA beim Flippen voraussichtlich stärker oder in einem anderen Winkel krümmen könnte als die (6–4)-Photolyase. Außerdem nimmt die (6–4)-DNA auch in der gekrümmten Form den Typ der B-DNA an.<sup>[144]</sup> Da im Vergleich die AB-DNA bereits aufgrund der C3'-endo-Konformation der Zucker leicht gekrümmt ist (*Abbildung 4*),<sup>[17]</sup> könnte diese Form der DNA besser in die Bindungstasche der SP-Lyase passen.



**Abbildung 53:** Modell der SP-Lyase mit dsDNA aus der (6–4)-Photolyase-Struktur (PDB 3CVU, *Abbildung 11*). Die DNA wurde manuell ins aktive Zentrum gemodelt, so dass die Phosphate im Rückgrat an der Position der Sulfate in der Kristallstruktur zu liegen kamen (mit \* markiert, vergleiche *Benjdia et al.*<sup>[8]</sup>). Der Fit ist nicht optimal, da die DNA mit dem Protein an zwei Stellen kollidiert (Pfeile). Die (6–4)-DNA ist in Beige, das Sporen-Photoprodukt in Blau und der SAM-Cofaktor in Grün dargestellt. PDB 4FHC und 4FHD

In *Kapitel 1.3* wurden die Unterschiede von B- und AB-DNA genau beschrieben. Einer der Unterscheidungsunkte ist die unterschiedliche Ausprägung der großen und kleinen Furchen. Dies könnte einen Einfluss auf die Bindungsaffinität der SP-Lyase haben. Zur Veranschaulichung wur-

den ungeschädigte B- und AB-DNA an die SP-Lyase, vergleichbar zum Modell mit (6–4)-DNA, gemodelt (*Abbildung 54*). Dieses starre Modell spiegelt sehr voraussichtlich nicht die korrekte Bindung wieder, doch veranschaulicht es, dass die SP-Lyase mit seiner  $\beta$ -Haarnadelschleife besser in die tiefe, große Furche der AB-DNA passen würde (*Abbildung 54A*), als in die etwas breitere, große Furche der B-DNA (*Abbildung 54B*).



**Abbildung 54:** Bindung der  $\beta$ -Haarnadelschleife der SP-Lyase an die große Furche von AB-DNA (**A**) und B-DNA (**B**). Die DNA wurde jeweils manuell an die SP-Lyase vor SP-Bindung (Grau) gemodelt, so dass die Interaktionen mit den untersuchten Aminosäure-Resten und die Positionen von Phosphaten im DNA-Rückgrat an die Sulfate im Protein passten ohne mit dem Protein zu kollidieren. Phosphate des Rückgrats, die an Interaktionen beteiligt sein könnten, sind hervorgehoben. Die potentielle Position des SP-Schadens in der DNA (Dicytosin in (**A**) und Dithymidin in (**B**)) ist in Blau, und die DNA in Beige dargestellt. PDB 2Z3X, 3BSE und 4FHC

Würde die SP-Lyase aber tatsächlich in der großen Furche binden, dann wäre der SP-Strang in der initialen Bindung 5'  $\rightarrow$  3' polarisiert. Das Sporen-Photoprodukt bindet in der aktiven Tasche jedoch in einer 3'  $\rightarrow$  5'-Richtung (*Abbildung 51*).<sup>[8]</sup> Dies würde bedeuten, dass der Schaden nicht in einer simplen 180°-Drehung in das aktive Zentrum geflippt werden könnte. Das Protein könnte dieses Problem dadurch lösen, dass es wie in der Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase (Fpg)<sup>[405]</sup> während dem Flipp-Prozess die Furche wechselt. Andernfalls würde die initiale Bindung des Proteins an die DNA über die kleine Furche erfolgen müssen. Letztendlich könnte jedoch nur die Lösung der Struktur eines SPL-DNA-Komplexes zeigen, in welcher Konformation und an welcher Furche die DNA gebunden wird.

## Fazit

In diesem letzten Kapitel konnte gezeigt werden, dass die SP-Lyase mit einem  $K_d$ -Wert mittlerer Bindungsstärke an der DNA entlang gleiten könnte, um nach dem SP-Schaden zu suchen. Dabei wies das Enzym eine geringe Sequenzspezifität auf, mit der es bevorzugt an TT-Sequenzen bin-



det – vermutlich um die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen, ein Sporen-Photoprodukt zu finden. Der Gleitprozess würde zudem ohne Direktionalität erfolgen.

Die Bindung, wie auch die Aktivität, verbesserte sich mit der Länge der DNA-Stränge. Voraussichtlich könnte die SP-Lyase eine gewisse Sequenzlänge unspezifischer DNA neben dem SP-Schaden benötigen, um den Flipp-Prozess zu erleichtern. Dies könnte auch mit einer Umformung der DNA zusammenhängen, die scheinbar für eine höhere Affinität zum Enzym notwendig sein könnte. Mit steigenden Enzym-Konzentrationen nahm auch die Affinität an die DNA zu. Dieser Effekt könnte mittels kinetischer Kooperativität erklärt werden.<sup>[383]</sup>

Desweiteren wurden zur Untersuchung der DNA-Bindung und des Flipp-Prozesses spezifische Aminosäuren im aktiven Zentrum und der Bindetasche mutiert und anhand ihrer relativen Aktivität und ihrer Dissoziationskonstanten analysiert. Die Mutanten der  $\beta$ -Haarnadelschleife waren vorwiegend in ihrer DNA-Bindungseigenschaft beeinträchtigt, wodurch auch die Aktivität der SP-Lyase sank. Die entsprechenden Reste könnten bei der Schadens-Erkennung beteiligt sein. Die anderen Reste, L103, R273, R280 und Y339, scheinen eine direkte oder indirekte Rolle im Flipp-Prozess und bei der Stabilisierung des Sporen-Photoprodukts im aktiven Zentrum zu spielen.

## **Ausblick**

Die hier vorgestellten Versuche lieferten erste Einblicke in den DNA-Binde- und Flipp-Mechanismus der SP-Lyase. Für klare Aussagen müssten jedoch Kristallisationsstudien mit dsDNA wieder aufgenommen werden.

Die Kristallisation der SP-Lyase mit AdoH und Methionin, welche für theoretische Studien zum Radikal-Mechanismus vorgeschlagen wurde, könnte in der Apo-Form optimiert werden und nach Wachstum von Kristallen könnte das SP-Dinukleosid wie in *Benjdia et al.*<sup>[8]</sup> in das Protein *soaked* werden.

Für die Protein-DNA-Struktur sind ebenfalls Verbesserungen möglich. Zum einen könnte das aktive Zentrum, aufgrund der relativ hohen Bindeaffinität zu DNA, durch die Bindung von SAM und DNA effektiv abgeschottet werden. Die Ansätze könnten so auch an Luft inkubieren werden. Der Effekt, dass Substrat den Cluster vor Oxidation mit Sauerstoff schützen kann, wurde bereits für andere Radikal-SAM-Enzyme berichtet.<sup>[360]</sup> Dies wäre umso besser, da die Kristallisationsplatten durch den stetigen Austausch der N<sub>2</sub>-Atmosphäre in der Glove-Box relativ schnell austrocknen und die Glove-Box-Pumpe sowie andere heftige Bewegungen im Raum Vibrationen auslösten, die nicht optimal für das Kristallwachstum sind.



Zum anderen könnten die DNA-Substrate für die Kristallisation optimiert werden. Vor allem könnte man längere DNA-Stränge verwenden beziehungsweise anstatt *Blunt*-Enden, Doppelstränge mit Überhängen testen. Der beobachtete Effekt der Kooperativität lässt außerdem vermuten, dass die Affinität zur DNA unter den zur Kristallisation verwendeten Konzentrations-Verhältnissen sehr schwach ist. Das Konzentrations-Verhältnis müsste demnach zu höheren Proteinkonzentrationen geändert werden. Diese sollten jedoch nicht zu groß sein, da sonst die Gefahr besteht, dass nur Proteinkristalle ohne DNA gebildet würden.

Falls die SP-Lyase tatsächlich eine höhere Affinität zur AB-DNA als zur B-DNA besitzt, könnten SASPs, wie zum Beispiel das bereits kristallisierte SspC,<sup>[17]</sup> helfen den SPL-DNA-Komplex zu stabilisieren und die Kristallisation zu erleichtern.

In diesem Zusammenhang wäre es außerdem interessant, die Struktur des Sporen-Photoprodukts in einer AB-DNA-Umgebung zu analysieren. Um eine DNA in der AB-Konformation zu halten könnte wiederum SspC verwendet werden.<sup>[17]</sup>



## 4. Experimentalteil

### 4.1. Material

Chemikalien und Lösungsmittel in BioChemika-Qualität wurden vor allem von AppliChem GmbH (Darmstadt), Bio-Rad (München), Merck KGaA (Darmstadt), Carl Roth (Karlsruhe), Sigma-Aldrich / Fluka (St. Louis, USA), VWR International (Darmstadt) und Starlab (Hamburg) erworben.

Verbrauchsmaterial wurde verwendet von Eppendorf (Hamburg), Kimberly-Clark (Weinheim), Millipore (Schwalbach), VWR International (Darmstadt) und Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA).

Laborgeräte für Routinearbeiten, wie Zentrifugen, Waagen und Vortexer, stammen von Sartorius (Göttingen), VWR International (Darmstadt), Carl Roth (Karlsruhe), Heraeus (Buckinghamshire, England), Eppendorf (Hamburg), Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA), SANYO (Bad Nenndorf), BOSCH (Gerlingen), New Brunswick Scientific (Edison, USA), Millipore (Schwalbach), PEQLAB Biotechnologie (Erlangen), Bio-Rad (München), SCHOTT Instruments (Mainz), Mettler-Toledo GmbH (Giessen), Heidolph Instruments GmbH & Co.KG (Schwalbach), BANDELIN electronic (Berlin) und Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen (Osterode).

#### ***Wichtige (Mess-)Geräte***

<b>Gerät</b>	<b>Spezifikation</b>	<b>Firma</b>
Glove-Box mit Temperatur- und Sauerstoffsensoren	Unilab 230 V	MBraun (Garching)
UV-Vis Spektrophotometer mit Temperatur-Kontrolleinheit	Jasco V-650	JASCO GmbH Deutschland (Groß-Umstadt)
CD-Spektropolarimeter	Jasco J-810	JASCO GmbH Deutschland (Groß-Umstadt)
Temperatur-Kontrolleinheit des CD-Spektropolarimeters	Jasco Model JWJTC-484	JASCO GmbH Deutschland (Groß-Umstadt)
RP-HPLC-System	Alliance 2695	Waters GmbH (Eschborn)
UV-Vis-Detektor der HPLC	PDA 2996	Waters GmbH (Eschborn)
Fluoreszenz-Detektor der HPLC	2475 Multi $\lambda$	Waters GmbH (Eschborn)
Tecan-Reader	Genios Pro	Tecan Group AG (Männedorf, Schweiz)
PCR-Cycler	Mastercycler <sup>®</sup>	Eppendorf (Hamburg)

2-Puls-Hahn-Echo-EPR-Spektrometer	Elexsys E680	Bruker BioSpin GmbH (Karlsruhe)
MW-Pulsbrücke des 2-Puls-Hahn-Echo-EPR-Spektrometers	ER 046 MRT	Bruker BioSpin GmbH (Karlsruhe)
1-kW-TWT-Verstärker des 2-Puls-Hahn-Echo-EPR-Spektrometers	117X	Applied Systems Engineering Inc. (Fort Worth, USA)
Resonator des 2-Puls-Hahn-Echo-EPR-Spektrometers	ER 4118X-MD5	Bruker BioSpin GmbH (Karlsruhe)
Kühleinheit des 2-Puls-Hahn-Echo-EPR-Spektrometers	CF9350 mit ITC4	Oxford Instruments (Abingdon, England)
<i>Continous-Wave-EPR-Spektrometer</i>	EMX 048T	Bruker BioSpin GmbH (Karlsruhe)
MW-Brücke des cwEPR-Spektrometers	ER 041 MR	Bruker BioSpin GmbH (Karlsruhe)
Resonator des cwEPR-Spektrometers	4122-SHQ-E	Bruker BioSpin GmbH (Karlsruhe)
Kühleinheit des cwEPR-Spektrometers	ESR 900 mit ITC 503	Oxford Instruments (Abingdon, England)

### **Primer**

PCR-Primer	Sequenz	Modifikation	$T_M$
<i>B.st.</i> –SPL-C140A/G (vorwärts)	5'- <b>GCC</b> ACG TCC GAC ATT GTC GGG ATC G-3'	5'-Phosphat	61 °C
<i>B.st.</i> –SPL-C140A (rückwärts)	5'-TGC CGC CTC GAA GCG AGT GAT C-3'	5'-Phosphat	60 °C
<i>B.st.</i> –SPL-C140G (vorwärts)	5'- <b>GGC</b> ACG TCC GAC ATT GTC GGG ATC-3'	5'-Phosphat	61 °C
<i>B.st.</i> –SPL-Y98F (vorwärts)	5'- <b>TTT</b> TGC AAA CGA CAT TAG GAA GCA AGC C-3'	5'-Phosphat	58 °C
<i>B.st.</i> –SPL-Y98F (rückwärts)	5'-AGC AAT AAT GGC AAT GGC CCA TGC-3'	5'-Phosphat	57 °C
pET28a- <i>Blunt-End</i> (vorwärts)	5'-CAT GCT AGC CAT ATG GCT GCC-3'	–	56 °C
pET28a- <i>Blunt-End</i> (rückwärts)	5'-CTC GAG CAC CAC CAC CAC-3'	–	55 °C
<i>G.tn.</i> –SPL- <i>Blunt-End</i> (vorwärts)	5'- <b>CTC GAG</b> ATG AAA CCG TTT GTT CCG AAA CTG G-3'	5'-Phosphat	56 °C

<i>G.tn.</i> –SPL- <i>Blunt-End</i> (rückwärts)	5'-CCA GGT ACC TTA GGT AAA ATA CTGC-3'	5'-Phosphat	56 °C
<i>G.tn.</i> –SPL-C140A (vorwärts)	5'- <b>GCG</b> ACC AGC GAT ATT GTT GGT ATT GAT CAT C-3'	5'-Phosphat	57 °C
<i>G.tn.</i> –SPL-C140A (rückwärts)	5'-TGC TGC TTC AAA ACG GGT AAT TTC C-3'	5'-Phosphat	56 °C
<i>G.tn.</i> –SPL-C140G (vorwärts)	5'- <b>GGT</b> ACC AGC GAT ATT GTT GGT ATT GAT CAT C-3'	5'-Phosphat	57 °C
<i>G.tn.</i> –SPL-Y98F (vorwärts)	5'- <b>TTC</b> TGC AGA CCA CCC TGG GTA G-3'	5'-Phosphat	58 °C
<i>G.tn.</i> –SPL-Y98F (rückwärts)	5'-AAC AAT AAT GAC AAT GAC CCA TAC AAC CG-3'	5'-Phosphat	57 °C
<i>G.tn.</i> –SPL-L103A (vorwärts)	5'-GGG TAG CAA ACC GTA TAT TCG TG-3'	5'-Phosphat	55 °C
<i>G.tn.</i> –SPL-L103A (rückwärts)	5'- <b>GCG</b> GTG GTC TGC AGA TAA CAA TAA TGA C-3'	5'-Phosphat	56 °C
<i>G.tn.</i> –SPL-R273A (vorwärts)	5'-GAT TCA GCA <b>TGC</b> <b>GTT</b> TAC CAA ACC GGC-3'	5'-Phosphat	56 °C
<i>G.tn.</i> –SPL-R273A (rückwärts)	5'-AGT TCA AAG GTC AGA TCG CTC AG-3'	5'-Phosphat	55 °C
<i>G.tn.</i> –SPL-R280A (vorwärts)	5'-GGC AAA <b>AGC GGT</b> TAT TGA ACA GCG TTA TCC-3'	5'-Phosphat	57 °C
<i>G.tn.</i> –SPL-R280A (rückwärts)	5'-GGT TTG GTA AAA CGA TGC TGA ATC AG-3'	5'-Phosphat	56 °C
<i>G.tn.</i> –SPL-K301A (vorwärts)	5'- <b>GCG</b> TGG GGT CGC TAT GGC ATT GG-3'	5'-Phosphat	56 °C
<i>G.tn.</i> –SPL-K301A (rückwärts)	5'-GTA TTT ACG TTT GGT TTC ATC CAG ATC-3'	5'-Phosphat	55 °C
<i>G.tn.</i> –SPL-R304A (vorwärts)	5'-CAA ACG TAA ATA CAA ATG GGG <b>TGC</b> <b>GTA</b> TGG C-3'	5'-Phosphat	57 °C
<i>G.tn.</i> –SPL-R304A (rückwärts)	5'-GTT TCA TCC AGA TCC AGA CGG G-3'	5'-Phosphat	57 °C

<i>G.tn.</i> –SPL-Y305F (vorwärts)	5'- <b>TTT</b> GGC ATT GGC AAA TAT GTG TAT CGT C-3'	5'-Phosphat	56 °C
<i>G.tn.</i> –SPL-Y305F (rückwärts)	5'-GCG ACC CCA <b>TTT</b> GTA TTT ACG TTT G-3'	5'-Phosphat	56 °C
<i>G.tn.</i> –SPL-K309A (vorwärts)	5'-CAT TGG <b>CGC</b> <b>GTA</b> TGT GTA TCG TGA TGA AG-3'	5'-Phosphat	56 °C
<i>G.tn.</i> –SPL-K309A (rückwärts)	5'-CCA TAG CGA CCC CAT TTG TAT TTA C-3'	5'-Phosphat	56 °C
<i>G.tn.</i> –SPL-Y339F (vorwärts)	5'-GGG TGC ATA TGT GCA <b>GTT</b> TTT TAC C-3'	5'-Phosphat	56 °C
<i>G.tn.</i> –SPL-Y339F (rückwärts)	5'-GGA AAA AAC TGT TCG ATA TAA CGA CGC-3'	5'-Phosphat	57 °C

Alle aufgelisteten Primer wurden von Metabion (Planegg-Martinsried) erworben. Die in fett hervorgehobenen Nukleotide sind von der Templat-Sequenz abweichende Sequenzen, wie zusätzliche Restriktionsschnittstellen oder Mutagenese-Stellen. Sie wurden nicht in die Berechnung der Schmelztemperatur ( $T_M$ ) mit einbezogen.

Für die Berechnung der Schmelztemperatur wurde der Service der Promega-Seite (<http://www.promega.com/techserv/tools/biomath/calc11.htm>) genutzt.

Sequenzier-Primer	Sequenz	Modifikation
<i>G.tn.</i> –SPL-Mitte (vorwärts)	5'-GTT GCA CCG ATT TAT CG-3'	–
pBR2 (rückwärts)	5'-GGA GCC ACT ATC GAC TAC-3'	–
T7 (vorwärts)	5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3'	–
T7-Terminator (rückwärts)	5'-TAT GCT AGT TAT TGC TCA G-3'	–

## Mikrobiologische Utensilien

Bakterienstämme	Genotyp	Firma
BL21	<i>fhuA2 [lon] ompT gal [dcm] ΔhsdS</i>	New England Biolabs (Frankfurt a.M.)
NEB 5α	<i>fhuA2 Δ(argF-lacZ)U169 phoA glnV44 φ80Δ (lacZ)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17</i>	New England Biolabs (Frankfurt a.M.)
NEB 10β	<i>Δ(ara-leu)7697 araD139 fhuA ΔlacX74 galK16 galE15 e14-φ80dlacZΔM15 recA1 relA1 endA1 nupG rpsL (Str<sup>R</sup>) rph spoT1 Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC)</i>	New England Biolabs (Frankfurt a.M.)
Top10 (Invitrogen™)	<i>F<sup>-</sup> mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str<sup>R</sup>) endA1 nupG</i>	Life Technologies (Carlsbad, USA)
Tuner(DE3)pLysS (Novagen®)	<i>F<sup>-</sup> ompT hsdSB (rB<sup>-</sup> mB<sup>-</sup>) gal dcm lacY1(DE3) pLysS (CamR)</i>	Merck KGaA (Darmstadt)

Alle aufgelisteten Bakterienstämme sind chemisch kompetent.

Plasmide	Firma
pET28a (ohne Insert, Novagen®)	Merck KGaA (Darmstadt)
pETm11 (mit <i>G.tn.</i> – <i>spl</i> -Insert)	GeneArt (Regensburg)
pDEST17 (ohne Insert, Invitrogen™)	Life Technologies (Carlsbad, USA)

Antibiotika / Induktionsmittel	Stammlösung	Verdünnung im Medium
Carbenicillin	100 mg mL <sup>-1</sup> in ddH <sub>2</sub> O	100 µg mL <sup>-1</sup>
Kanamycin	15 mg mL <sup>-1</sup> in ddH <sub>2</sub> O	15 µg mL <sup>-1</sup>
Isopropyl-β-D-Thiogalaktopyranosid (IPTG)	1 M in ddH <sub>2</sub> O	0,1–1 mM

Die Stammlösungen wurden steril filtriert, aliquotiert und bei –20 °C gelagert.

Anstatt Ampicillin wurde Carbenicillin zur Selektion von Ampicillin-resistenten Klonen verwendet. Carbenicillin weist dieselben Charakteristiken wie Ampicillin als Antibiotikum auf, ist jedoch stabiler.

### ***Sonstige molekularbiologische, proteinchemische und enzymologische Utensilien***

<b>Produkt</b>	<b>Firma</b>
Amicon 10 K 0,5 mL Zentrifugenfilter	Millipore (Schwalbach)
Benzonase <sup>®</sup> Nuklease (Novagen <sup>®</sup> )	Merck KGaA (Darmstadt)
BugBuster <sup>®</sup> 10X (Novagen <sup>®</sup> )	Merck KGaA (Darmstadt)
DMPD ( <i>N,N</i> -Dimethyl- <i>p</i> -Phenylendiamin)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
DNA-Standards (1 kb, 100 bp, 2-Log)	New England Biolabs (Frankfurt a.M.)
dNTPs (2mM) (Novagen <sup>®</sup> )	Merck KGaA (Darmstadt)
Dpn I	New England Biolabs (Frankfurt a.M.)
Ferene (3-(2-Pyridyl)-5,6-Di(2-Furyl)-1,2,4-Triazin-5',5''-Disulfonsäure-Dinatrium-Salz)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
<i>GeneJet Gel Extraction Kit</i> (Fermentas)	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
<i>GeneJet Plasmid Mini Kit</i> (Fermentas)	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Heparin Sepharose 6 <i>Fast Flow</i>	GE Healthcare (Freiburg)
Lysozym	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Ni-Sepharose <i>High Performance</i>	GE Healthcare (Freiburg)
PD-10 Entsalzungssäulen	GE Healthcare (Freiburg)
Phusion <sup>®</sup> HF-Puffer (5X)	New England Biolabs (Frankfurt a.M.)
Phusion <sup>®</sup> <i>High-Fidelity</i> -(HF) DNA Polymerase	New England Biolabs (Frankfurt a.M.)
Protease-Inhibitor ohne EDTA	Roche (Basel, Schweiz)
Protein-Standard: PageRuler™ <i>Unstained</i> (Fermentas)	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Pst I	New England Biolabs (Frankfurt a.M.)
Puffer 4 (10X)	New England Biolabs (Frankfurt a.M.)
Rotiphorese <sup>®</sup> Gel 30 (30% Acrylamid/Bisacrylamid 37,5:1)	Carl Roth (Karlsruhe)



S-Adnosylmethionin-Iodid/Chlorid	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
T4 DNA Ligase (Fermentas)	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
T4 DNA Ligase-Puffer (10X) (Fermentas)	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Xho I	New England Biolabs (Frankfurt a.M.)

### **Medien, Lösungen und Puffer**

<b>TAE-Puffer-50X</b>	2 M 100 mM	Tris-Acetat Dinatrium-EDTA in ddH <sub>2</sub> O, pH 8,3 (Acetat)
<b>Agarose-Gelpuffer</b>	1X	TAE-Puffer
<b>Agarose-Gel-Laufpuffer</b>	0,5X	TAE-Puffer
<b>Agarose-Auftragspuffer-6X</b>	30% (v/v) 0,12% (w/v) 0,03% (w/v) 0,03% (w/v)	Glycerol SDS Bromphenolblau Xylencyanol FF in ddH <sub>2</sub> O <i>aliquotiert und bei –20 °C gelagert</i>
<b>Luria-Bertani-(LB)-Medium</b>	0,5% (w/v) 1,0% (w/v) 1,0% (w/v) <i>nach Autoklavieren</i>	Hefe-Extrakt NaCl Pepton aus Casein in VE-Wasser, pH 7,5 (NaOH/HCl) <i>Antibiotika in der Verdünnungs-Konzentration zugegeben</i>
<b>LB-Agar</b>	1,5% (w/v) <i>nach Autoklavieren</i>	Agar-Agar in LB-Medium <i>Antibiotika in der Verdünnungs-Konzentration zugegeben im Kühlschrank bei 4 °C bis zur Verwendung gelagert</i>
<b>Lyse-Puffer</b>	50 mM 100 mM 10 mM 5% (v/v)	HEPES NaCl Imidazol Glycerol in ddH <sub>2</sub> O, pH 7,5 (NaOH/HCl) <i>steril filtriert und mit N<sub>2</sub> entgast</i>

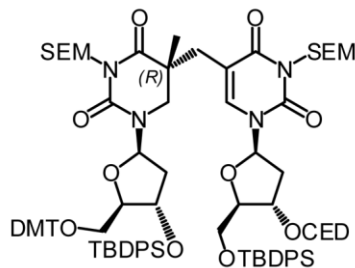
<b>BugBuster®-1X</b>	90% (v/v)	Lyse-Puffer
	10% (v/v)	BugBuster®-10X
	1 Tablette pro 50 mL	Protease-Inhibitor ohne EDTA
	1 KU mL <sup>-1</sup>	Lysozym
	25 U mL <sup>-1</sup>	Benzonase
		<i>frisch hergestellt in der Glove-Box</i>
<b>His-AC-Waschpuffer</b>	50 mM	HEPES
	100 mM	NaCl
	20 mM	Imidazol
	0,5% (v/v)	Tween-20
	5% (v/v)	Glycerol
		in ddH <sub>2</sub> O, pH 7,5 (NaOH/HCl)
		<i>steril filtriert und mit N<sub>2</sub> entgast</i>
	5 mM	β-Mercaptoethanol
		<i>frisch hinzugefügt in der Glove-Box</i>
<b>His-AC-Elutionspuffer</b>	50 mM	HEPES
	100 mM	NaCl
	250 mM	Imidazol
	5% (v/v)	Glycerol
		in ddH <sub>2</sub> O, pH 7,5 (NaOH/HCl)
		<i>steril filtriert und mit N<sub>2</sub> entgast</i>
<b>His-AC-Spülpuffer</b>	50 mM	HEPES
	100 mM	NaCl
	1 M	Imidazol
		in ddH <sub>2</sub> O, pH 7,5 (NaOH/HCl)
		<i>steril filtriert und mit N<sub>2</sub> entgast</i>
<b>Heparin-AC-PufferA</b>	50 mM	HEPES
	100 mM	NaCl
	5% (v/v)	Glycerol
		in ddH <sub>2</sub> O, pH 7,5 (NaOH/HCl)
		<i>steril filtriert und mit N<sub>2</sub> entgast</i>
<b>Heparin-AC-PufferB</b>	50 mM	HEPES
	300 mM	NaCl
	5% (v/v)	Glycerol
		in ddH <sub>2</sub> O, pH 7,5 (NaOH/HCl)
		<i>steril filtriert und mit N<sub>2</sub> entgast</i>
<b>Heparin-AC-Spülpuffer</b>	50 mM	HEPES
	1 M	NaCl
		in ddH <sub>2</sub> O, pH 7,5 (NaOH/HCl)
		<i>steril filtriert und mit N<sub>2</sub> entgast</i>
<b>SDS-PAGE-Trenngelpuffer</b>	1,5 M	Tris
		in ddH <sub>2</sub> O, pH 8,8 (NaOH/HCl)

<b>SDS-PAGE-Sammelgelpuffer</b>	0,5 M	Tris-HCl in ddH <sub>2</sub> O, pH 6,8 (HCl)
<b>SDS-PAGE-Laufpuffer-10X</b>	0,25 M 1,29 M 1% (w/v)	Tris-HCl Glycin SDS in ddH <sub>2</sub> O
<b>SDS-PAGE-Auftragspuffer-5X</b>	0,225 M 50% (v/v) 5% (w/v) 0,05% (w/v) 0,25 M	Tris-HCl (pH 6,8) Glycerol SDS Bromphenolblau DTT in ddH <sub>2</sub> O <i>aliquotiert und bei –20 °C gelagert</i>
<b>Coomassie-Färbelösung</b>	0,25% (w/v) 20% (v/v) 10% (v/v)	Coomassie Brilliant Blue R 250 Ethanol (vergällt) Essigsäure in VE-Wasser
<b>Coomassie-Entfärbelösung</b>	20% (v/v) 10% (v/v)	Ethanol (vergällt) Essigsäure in Leitungswasser
<b>S-Adenosylmethionin-Lösung</b>	10 mM oder 50 mM	S-Adenosylmethionin- Iodid/Chlorid in ddH <sub>2</sub> O <i>steril filtriert, aliquotiert und bei –80 °C gelagert</i>
<b>HPLC-PufferA</b>	100 mM	Triethylammoniumacetat in ddH <sub>2</sub> O
<b>HPLC-PufferB</b>	100 mM	Triethylammoniumacetat in 80% Acetonitril

### ***SPL-Substrate / Oligo-2'-Desoxynukleotide (ODNs)***

Als SPL-Substrat wurde in dieser Arbeit das (5*R*)-Sporen-Photoprodukt-Dinukleosid verwendet. Aus synthetisch-praktischen Gründen – die Synthese wäre mit Phosphat sehr kompliziert und die Ausbeuten entsprechend gering – fehlt in dieser Modellverbindung das Phosphat zwischen den beiden Nukleosiden. Vorwiegend wurde das SP-Dinukleosid von *Dr. Korbinian Heil* und *Dr. Gengo Kashiwazaki* als Phosphoramidit-Baustein (*Abbildung 55*)<sup>[140,145]</sup> synthetisiert und über DNA-Festphasen-Synthese in Oligo-2'-Desoxynukleotide (ODN) bestimmter Länge eingebaut. Für die Fluoreszenz-Markierung der SP-Stränge wurde Dy547-Phosphoramidit von Glen Research (Sterling, USA) bezogen. Dieser Farbstoff besitzt als Einziger keine OH-Gruppen, die

bei der Entschützung des Sporen-Photoprodukts nach der DNA-Synthese angegriffen werden könnten. Das Absorptionsmaximum liegt bei 547 nm und das Emmisionsmaximum bei 563 nm.



**Abbildung 55:** SP-Phosphoramidit.

Alle anderen Stränge wurden von Metabion (Planegg-Martinsried) oder Ella Biotech (Planegg) erworben.

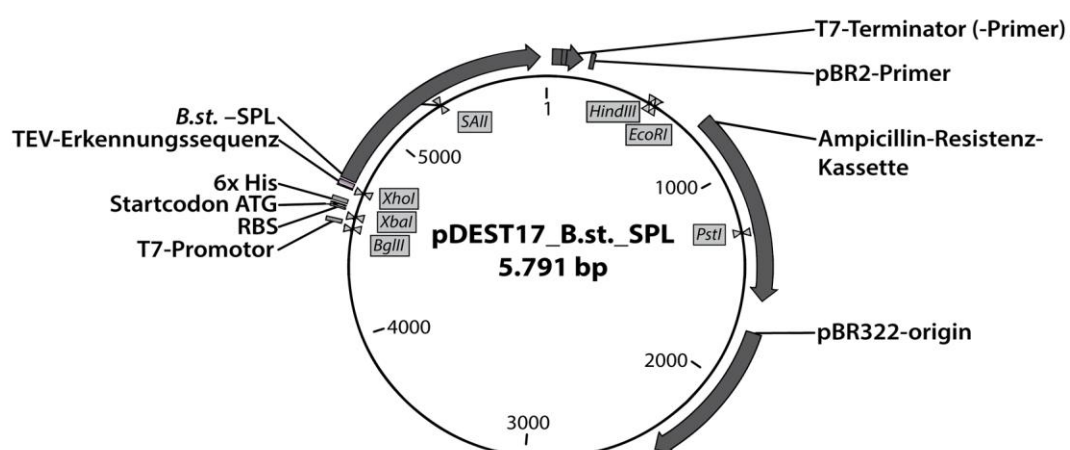
Um doppelsträngige ODN-Substrate zu erhalten, wurden die komplementären Stränge in Puffer mit mindestens 30 mM NaCl hybridisiert. Die DNA-Lösung wurde dazu im PCR-Cycler eine Minute bei 90 °C ( $2\text{ °C s}^{-1}$ ) erhitzt und anschließend langsam auf 4 °C abgekühlt (alle 20 sec um 1 °C). Lag die geschätzte Schmelztemperatur ( $T_M$ ) nahe an der Raumtemperatur, so wurden die Proben auf Eis gestellt. Für die Berechnung der Schmelztemperatur wurde der Service der Promega-Seite (<http://www.promega.com/techserv/tools/biomath/calc11.htm>) genutzt.

ODN	Beschreibung	Sequenz	$T_M$
1	SP-13mer	5'-CAG CGG <b>SPG</b> CAG G-3'	< 44 °C
2	Gegenstrang ODN1	5'-CCT GCA ACC GCT G-3'	44 °C
3	SP-6mer	5'-GG <b>SP</b> GG-3'	< 20 °C
4	Füllstrang für 39mer – ODN1/4/5	5'-GCA GCT CGT ACC G-3'	44 °C
5	Gegenstrang für 39mer – ODN1/4/5	5'-CGG TAC GAG CTG GGG TGC AAC CGC TGC GGT ACG AGC TGC-3'	76 °C
6	Fragment1 ODN1	5'-CAG CGG T-3'	24 °C
7	Fragment2 ODN1	5'-TGC AGG-3'	20 °C
8	SP-15mer-Fluo	5'-Dy547-ACA GCG <b>GSP</b> GCA GCT-3'	< 45 °C
9	Gegenstrang ODN8	5'-AGC TGC AAC CGC TGT-3'	45 °C
10	Fragment ODN8	5'-Dy547-ACA GCG GT-3'	26 °C
11	TT-15mer – ODN8 ohne SP	5'-ACA GCG GTT GCA GCT-3'	45 °C
12	Fluo-Gegenstrang ODN1	5'-Fluoreszein-CCT GCA ACC GCT G-3'	44 °C

13	TT-13mer – ODN1 ohne SP	5'-CAG CGG TTG CAG G-3'	44 °C
14	13mer mit Zufallssequenz	5'-CGG TAC GAG CTG C-3'	44 °C
15	Gegenstrang ODN14	5'-Fluoreszein-GCA GCT CGT ACC G-3'	44 °C
16	Fluo-Gegenstrang für 39mer – ODN1/4/16	5'-Fluoreszein-CGG TAC GAG CTG GGG TGC AAC CGC TGC GGT ACG AGC TGC-3'	76 °C
17	Gegenstrang für 39mer – ODN1/17	5'-CCT GCA ACC GCT GCC TGC AAC CGC TGC CTG CAA CCG CTG-3'	76 °C
18	Füllstrang für 39mer – ODN1/18/19 oder ODN1/18/20	5'-GTG TAC GGC ATG GCA GGC CTA GTG CG-3'	66 °C
19	Gegenstrang für 39mer – ODN1/18/19	5'-CGC ACT AGG CCT GCC ATG CCG TAC ACC CTG CAA CCG CTG-3'	75 °C
20	Gegenstrang für 39mer – ODN1/18/20	5'-CCT GCA ACC GCT GCG CAC TAG GCC TGC CAT GCC GTA CAC-3'	75 °C
21	SP-9mer	5'-CCG CG <b>SP</b> GC-3'	< 32 °C
22	Gegenstrang für ODN21	5'-GCA ACG CGG-3'	32 °C
23	TT-9mer – ODN21 ohne SP	5'-CCG CGT TGC-3'	32 °C

## 4.2. Molekularbiologische Methoden

### Klonierung der SPL-Expressionsvektoren

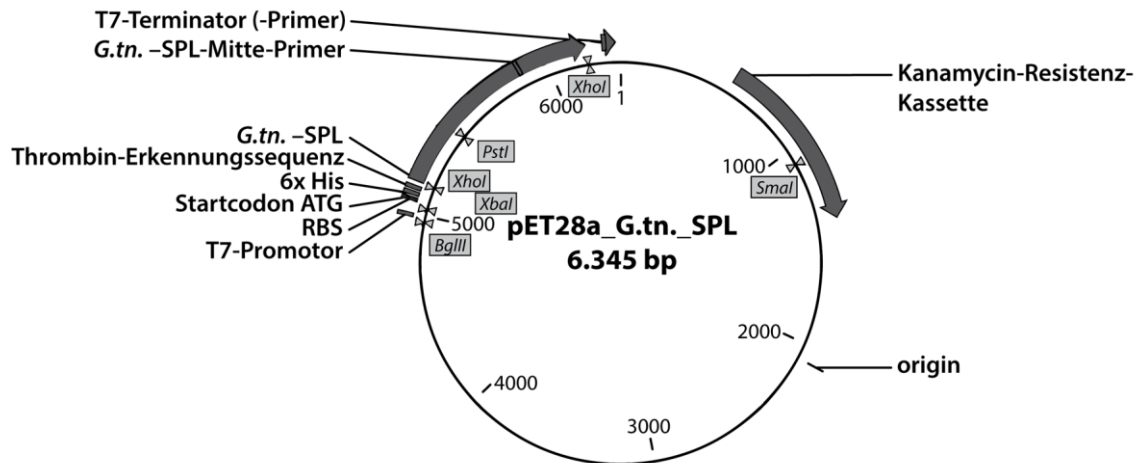


**Abbildung 56:** Vektor-Karte von pDEST17\_B.st.\_SPL, dem Plasmid, welches das *spl*-Gen aus *Geobacillus stearothermophilus* kodiert. Die Karte wurde mit dem Programm CLC Sequence Viewer 6 erstellt.

Das *spl*-Gen aus *Geobacillus stearothermophilus* (*B.st.*) wurde vorab von Dr. Ulrike Lischke in den pDEST17-Zielvektor kloniert. Genaue Angaben können in der Publikation von Heil *et al.*<sup>[140]</sup> nachgelesen werden. Der konstruierte Expressionsvektor (*Abbildung 56*) enthält einen T7-Promotor zur Induktion der SPL-Expression mit IPTG in *E. coli*, einen His<sub>6</sub>-Tag zur erleichterten Isolierung des Proteins und eine Ampicillin-Resistenz-Kassette zur Selektion positiver Klone.

Die Sequenz des *spl*-Gens aus *Geobacillus thermodenitrificans* (*G.tn.*) wurde Codon-optimiert und bei GeneArt (Regensburg) bestellt. Das *spl*-Insert wurde in einem pETm11-Vektor geliefert. Als Ziel-Expressionsvektor wurde pET28a gewählt, da dieser nach Herstellerangaben (Novagen<sup>®</sup>, Merck KGaA) besser für die Expression potentiell schwer löslicher Proteine ist. Der Vektor enthält einen T7-Promotor zur Induktion der SPL-Expression in *E. coli*, einen His<sub>6</sub>-Tag zur erleichterten Isolierung des Proteins und eine Kanamycin-Resistenz-Kassette zur Selektion positiver Klone (*Abbildung 57*). Der Transfer des *spl*-Inserts in den pET28a-Vektor erfolgte über eine *Blunt-End*-Strategie. Alle Restriktions-Klonierungs-Strategien mit Überhängen waren erfolglos. Andere Strategien konnten aufgrund der fehlenden Sequenzen im GeneArt-Plasmid nicht angewandt werden.

In einer *Blunt-End*-Klonierung weisen das linearisierte Plasmid und das Insert keine Überhänge an ihren Enden auf. Dadurch können sich die Enden des Plasmids und des Inserts nur über eine sehr kurzlebige Interaktion der 5'-Phosphate und der 3'-Hydroxylgruppen finden. Somit ist die Effizienz dieses Ansatzes um geringer als bei der Aneinanderlagerung komplementärer Überhänge, die über Wasserstoffbrücken-Bindungen stabilisiert werden. Es sind weniger positive Kolonien zu erwarten und die Hälfte der eingebauten Inserts sollte mit falscher Orientierung im Plasmid liegen. Außerdem ist die Wahrscheinlichkeit hoch, dass sich die Plasmide während der Ligation ohne Insert wieder schließen könnten. Es ist jedoch möglich dem entgegenzuwirken, indem die Enden des Plasmids dephosphoryliert und die Enden des Inserts phosphoryliert werden. Dadurch sollte eine Interaktion zwischen Insert und Plasmid, anstatt zwischen Plasmid-Ende und Plasmid-Ende, bevorzugt stattfinden. Deswegen wurde das pET28a-Plasmid mit normalen Primern und das *spl*-Insert aus dem pETm11-Vektor mit 5'-phosphorylierten Primern über die Polymerase-Ketten-Reaktion (engl.: *polymerase chain reaction*, PCR) vervielfältigt. Die Primerpaare pET28a-*Blunt-End* und *G.tn.* –SPL-*Blunt-End* wurden so konzipiert, dass der pET28a-Vektor vor der Xho-I-Erkennungssequenz linearisiert wird und das *spl*-Insert am 5'-Ende eine zusätzliche Xho-I-Schnittstelle erhält. Die Assoziation der Fragmente erfolgte im Leseraster. Bei richtiger Orientierung des Inserts nach Ligation, sollte je eine Xho-I-Schnittstelle vor und nach der *spl*-Sequenz liegen (*Abbildung 57*).



**Abbildung 57:** Vektor-Karte von pET28a\_G.tn.\_SPL, dem Plasmid, welches das *spl*-Gen aus *Geobacillus thermodenitrificans* kodiert. Die Karte wurde mit dem Programm CLC Sequence Viewer 6 erstellt.

Die Polymerase-Ketten-Reaktion ist eine Standard-Methode zur Amplifikation von längeren DNA-Fragmenten. Das Prinzip beruht auf der Trennung der DNA-Duplexe bei hohen Temperaturen (98 °C), der Anlagerung der beiden Primer knapp unter ihrer Schmelztemperatur ( $T_m$ ) und der Neusynthese des Gegenstranges durch eine Polymerase (72 °C für die Phusion<sup>®</sup>-Polymerase), welche sich an die Primer anlagert. Für die Berechnung der Schmelztemperatur wurde der Service der Promega-Seite (<http://www.promega.com/techserv/tools/biomath/calc11.htm>) genutzt. Neben der herkömmlichen Berechnungsmethode, konnte man die Primer auch anhand ihrer  $T_m$ -Werte nach Einbeziehung der Salzkonzentration und der Nukleotidsequenz evaluieren.

Für die *Blunt-End*-Klonierung wurde folgender PCR-Ansatz gewählt:

10 µM	Primer (vorwärts)	1,5 µL
10 µM	Primer (rückwärts)	1,5 µL
5X	HF-Puffer	10 µL
2 mM	dNTPs	5 µL
2.000 U mL <sup>-1</sup>	Phusion <sup>®</sup> -Polymerase	0,5 µL
100 ng	Plasmid	0,5 µL
	ddH <sub>2</sub> O	31 µL
		Σ 50 µL

Im PCR-Cycler wurde folgendes Programm eingestellt:

98 °C 5 min – (98 °C 15 sec, 1–2 °C über  $T_m$  15 sec, 72 °C 2 min) × 32 – 72 °C 5 min – 4 °C ∞

Die Amplifizierung der DNA-Fragmente in der PCR wurde mit Hilfe eines Agarose-Gels überprüft. Währenddessen wurde das Templat-Plasmid im PCR-Mix (45 µL) mit Dpn I (1 µL, 20.000

U mL<sup>-1</sup>) in Enzympuffer (Puffer 4, 5 µL) bei 37 °C für 1,5 h verdaut. Dpn I schneidet nur Methyl-Cytosin, welches am neu synthetisierten Strang nicht vorkommt. Im Anschluss wurde der PCR-Mix vollständig auf ein Agarose-Gel aufgetragen und nach Lauf des Gels die DNA-Fragmente unter UV-Belichtung aus dem Gel ausgeschnitten. Die Isolierung der Fragmente aus dem Gel erfolgte mit dem *GeneJet Gel Extraction Kit* nach Anweisungen des Herstellers.

Die Ligation der beiden Fragmente ist erneut ein kritischer Schritt. Indem man die Insert-Konzentration höher hält als die Plasmid-Konzentration sollten Ligrationsreaktionen zwischen zwei Plasmid-Enden minimiert werden. Allerdings darf die Insert-Konzentration nicht zu hoch sein, da sonst mehrere Inserts in das Plasmid eingebaut werden könnten. Hier wurden eine Plasmid-Konzentration von 0,0063 pmol µL<sup>-1</sup> und eine 8-fache Insert-Konzentration von 0,15 pmol µL<sup>-1</sup> gewählt. Zusammen mit der T4-DNA-Ligase (1 µL) wurde dieser Ansatz in Ligation-Puffer (2 µL) und Nuklease-freiem ddH<sub>2</sub>O (bis Σ 20 µL) bei Raumtemperatur für 20 min inkubiert. 5 µL dieser Ligationlösung wurden in NEB-10β-Zellen transformiert. Tatsächlich wurde nur eine Kolonie erhalten, die sich nach Isolierung der Plasmid-DNA und Überprüfung durch einen Xho-I- und Pst-I-Verdau sowie durch Sequenzierung als positiver Klon herausstellte.

### **Ortsspezifische Mutagenese**

Die Mutagenese *spl*-Gene aus *G. stearothermophilus* und *G. thermodenitrificans* wurde nach Vorlage des *Phusion™ Site-Directed Mutagenesis Kit* von Finnzymes (Thermo Fisher Scientific) durchgeführt. Dazu wurden Primer konstruiert, die das neue, zu ersetzende Codon entweder am 5'-Ende oder in der Mitte enthalten. Nur einer der beiden Primer, vorwärts oder rückwärts gerichtet, trägt diese Punktmutation und das Primerpaar überlappt sich nicht. Stattdessen setzen sie direkt hintereinander an. Da die Primer eine 5'-Phosphat-Modifikation besitzen, konnten die linearen Plasmide nach erfolgreicher PCR einfach ligiert werden.



Folgender Ansatz wurde für die Mutagenese-PCR gewählt:

10 $\mu\text{M}$	Primer (vorwärts)	1,5 $\mu\text{L}$
10 $\mu\text{M}$	Primer (rückwärts)	1,5 $\mu\text{L}$
5X	HF-Puffer	10 $\mu\text{L}$
2 mM	dNTPs	5 $\mu\text{L}$
2.000 U $\text{mL}^{-1}$	Phusion <sup>®</sup> -Polymerase	0,5 $\mu\text{L}$
80–100 ng	Plasmid	1 $\mu\text{L}$
	ddH <sub>2</sub> O	29,5 $\mu\text{L}$
		$\Sigma$ 50 $\mu\text{L}$

Im PCR-Cycler wurde folgendes Programm eingestellt:

98 °C 5 min – (98 °C 15 sec, 1–2 °C über  $T_m$  15 sec, 72 °C 2 min)  $\times$  32 – 72 °C 5 min – 4 °C  $\infty$

Überprüfung, Dpn-I-Verdau und Gel-Reinigung der amplifizierten Plasmide erfolgte wie im vorangehenden Kapitel beschrieben. Für die Ligation sollte das PCR-Produkt eine Konzentration von maximal 10 ng  $\mu\text{L}^{-1}$  aufweisen. Die Plasmide (8,6  $\mu\text{L}$ ) wurden dann mit T4-DNA-Ligase (0,4  $\mu\text{L}$ ) in Ligase-Puffer (1  $\mu\text{L}$ ) bei Raumtemperatur für 2 h inkubiert. Der komplette Ansatz wurde im Anschluss in Top-10-, NEB-5 $\alpha$ - oder NEB-10 $\beta$ -Zellen transformiert. Nach Isolierung der Plasmid-DNA wurden die Produkte mittels Sequenzierung überprüft.

Die Mutagenese der L103A-Mutante ergab überraschenderweise anstatt eines Alanins, ein Glycin anstelle des Leucins (L103G). Da dies immer noch ein effektiver *Knock-Out* der sperrigen Aminosäure Leucin ist, wurde die Mutante als solche verwendet.

### **Agarose-Gel-Elektrophorese**

Die Agarose-Gel-Elektrophorese wird dazu genutzt DNA-Fragmente nach ihrer Größe aufzutrennen und die relative Größe der Fragmente anhand eines DNA-Standards zu bestimmen. Dazu wurde vorerst ein Gel in der Gel-Kammer der Elektrophorese-Vorrichtung gegossen. 1–2% Agarose, abhängig von der gewünschten Trennleistung, wurde in Agarose-Gelpuffer aufgekocht bis sie vollständig gelöst war. Nach kurzem Abkühlen wurde Ethidiumbromid (6–8  $\mu\text{L}$  einer 1-mg- $\text{mL}^{-1}$ -Lösung) als Detektionsmittel hinzugefügt und die Lösung in die Kammer gegossen. Mittels eines Kamms wurden Taschen in das Gel geformt, in die später die DNA-Proben, versetzt mit Agarose-Auftragspuffer-6X, pipettiert werden konnten. Zur Trennung der Fragmente im Gel wurde dieses in die Elektrophorese-Apparatur gelegt, mit Agarose-Gel-Laufpuffer übergossen und nach Probenauftragung eine Spannung von 60–120 V angelegt. Je niedriger die Spannung ist,

desto schöner sollte die Auftrennung sein. Die DNA-Fragmente wandern unter der Spannung zur Anode und werden umso mehr von der polymeren Struktur der Agarose verzögert je größer sie sind.<sup>[350]</sup> Für die Trennung kleinerer Fragmente wird ein höher-prozentiges Agarose-Gel verwendet und für größere Fragmente *vice versa*. Der Farbstoff im Auftragspuffer gibt einen Anhaltspunkt wie weit die Auftrennung fortgeschritten ist. Die DNA-Banden konnten nun durch fluoreszierendes, interkaliertes Ethidiumbromid ( $\lambda_{\text{Abs}} = 300 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{Em}} = 595 \text{ nm}$ ) visualisiert werden.

### **Konzentrationsbestimmung von DNA**

DNA-Konzentration von Plasmiden und ODN-Substraten wurden am NanoDrop-Spektrophotometer bestimmt. Dieses detektiert die Absorption der DNA-Basen bei 260 nm und wandelt sie über folgende Beziehung in die Konzentration um:

$$1,0 A_{260}\text{-Einheiten} = 50 \mu\text{g mL}^{-1} \text{ dsDNA} = 33 \mu\text{g mL}^{-1} \text{ ssDNA}$$

Das Verhältnis der Absorptions-Werte bei 260 nm und 280 nm, charakteristisch für die Absorption aromatischer Aminosäuren, gibt die Reinheit der DNA-Lösung wieder. Für reine DNA wird ein Wert von 1,8 bis 2,0 erwartet. Kontaminationen mit Proteinen oder gering-molekularen Substanzen zeichnen sich durch kleinere oder höhere Werte aus.

### **Überprüfung von Plasmiden**

Die Richtigkeit von Plasmiden wurde teils zuerst mit einem Restriktionsverdau überprüft. Dazu wurden passende Restriktionsenzyme aus der Vektor-Karte ausgewählt. Ein Testverdau wurde mit circa 100 ng DNA, den Enzymen und den vom Hersteller empfohlenen Puffern sowie Zusätzen, wie BSA, angesetzt (10–20  $\mu\text{L}$ ) und für 1,5 h bis 4 h bei 37 °C inkubiert. Der Verdau wurde anschließend auf ein Agarose-Gel aufgetragen und das Ergebnis mit den erwarteten Fragmentgrößen verglichen. Diese Art von Kontrolle kann jedoch nicht die Richtigkeit der Sequenz überprüfen. Darum wurden alle klonierten Plasmide zur *Sanger*-Sequenzierung (30 ng  $\mu\text{L}^{-1}$  in 30  $\mu\text{L}$ ) zu GATC Biotech (Konstanz) geschickt. Je nachdem welchen Sequenzabschnitt die Sequenzierung abdecken sollte wurden unterschiedliche Sequenzier-Primer gewählt. Für eine Standard-Sequenzierung des *spl*-Gens vom 5'-Ende sowie vom 3'-Ende wurden der T7-Primer, der T7-Terminator-Primer und der pBR2-Primer verwendet. Für die Mutationen am Ende des *spl*-Gens im pET28a\_G.tn.\_SPL-Vektor wurde zusätzlich der *G.tn.* –SPL Mitte-Primer genutzt.

### 4.3. Mikrobiologische Methoden

#### ***Transformation chemisch kompetenter E. coli -Zellen***

Zur Vervielfältigung der Plasmide oder zur Expression der Proteine wurden die jeweiligen Plasmide in *E. coli* -Zellen transformiert. Dafür wurden Aliquots der chemisch kompetenten Zellen (20–50 µL) auf Eis aufgetaut. 0,5 µL des Plasmids (80–100 ng µL<sup>-1</sup>) oder 10 µL der Ligationslösung wurden hinzugefügt und vorsichtig durch dreimaliges Fingerschnippen vermischt. Die Zellsuspension wurde für mindestens 30 min auf Eis inkubiert und anschließend 30 sec im 42-°C heißen Wasserbad erhitzt (Hitzeschock). Um die Zellen an neues Medium zu gewöhnen bevor sie auf Medium-Agar-Platten mit Antibiotika ausgestrichen werden, wurden 500 µL Raumtemperatur-warmes LB- oder SOC-Medium (mit den kompetenten Zellen geliefert) zu den Zellen gegeben und für mindestens 30 min bei 37 °C geschüttelt. Währenddessen wurden die Kühlschrank-kalt-feuchten LB-Agar-Platten mit entsprechenden Antibiotika-Zusätzen bei 37 °C getrocknet. Der Deckel wurde dabei schräg auf die Platten gelegt. Bis zu 100 µL der Plasmid-Zellsuspension oder 500 µL der Ligations-Zellsuspension wurden dann auf die vorgewärmten Platten mit einer zum Drygalski-Spatel verformten Pasteur-Pipette unter sterilen Bedingungen ausgestrichen. Damit die Zellsuspension vollständig vom Agar aufgenommen werden konnte, ließ man die Platten ein paar Minuten stehen, bevor sie kopfüber bei 37 °C über Nacht inkubiert wurden. Bei erfolgreichem Kolonien-Wachstum wurden die Platten mit Parafilm verschlossen und zur kurzzeitigen Lagerung in den Kühlschrank (4 °C) – erneut kopfüber, damit sich das Kondenswasser nicht auf dem Agar sammelt – gestellt.

#### ***Cryokonservierung transformierter E. coli -Zellen***

Zur Langzeit-Lagerung wurden über-Nacht-Kulturen (siehe unten) der transformierten Zellen angesetzt. Aus der erhaltenen Zellsuspension wurden 800 µL mit 200 µL autoklaviertem Glycerin (80%) vorsichtig vermischt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei –80 °C aufbewahrt.

#### ***Isolierung von Plasmid-DNA aus transformierten E. coli -Zellen***

Um Plasmide zu vervielfältigen wurde eine Kolonie der transformierten Zellen (Top10, NEB 5α, NEB 10β) über Nacht in 3–5 mL LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika bei 37 °C geschüttelt. Die Zellen wurden dann geerntet und ihre Plasmid-DNA wurde durch Zellaufschluss und mit Hilfe von speziellen Puffern und Säulen des *GeneJet Plasmid Mini Kits* isoliert und gereinigt. Die komplette Prozedur erfolgte nach Anleitung des Herstellers. Allerdings wurde die DNA nicht mit

dem empfohlenen Puffer, sondern mit 30  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O von den Säulen eluiert. Abschließend wurde die DNA-Konzentration bestimmt und die isolierten Plasmide wurden bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

## 4.4. Proteinchemische Methoden

### *Proteinexpression in E. coli -Zellen*

Verschiedene Bedingungen der Proteinexpression wurden vorab getestet und im Laufe der Doktorarbeit optimiert, um möglichst hohe Ausbeuten der SP-Lyase zu erhalten und proteolytische Verkürzungen zu minimieren. Die Plasmide wurden dazu in Tuner(DE3)pLysS-Zellen transformiert. Zur Expression wurde eine über-Nacht-Kultur (circa 30 mL pro Liter Expressionsmedium) mit mindestens zwei Kolonien in LB-Medium mit den jeweiligen Antibiotika angesetzt und bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  geschüttelt. Am folgenden Tag wurde die optische Dichte der Kultur bei 600 nm ( $OD_{600}$ ) bestimmt und anhand dieser das Volumen zur Animpfung eines Liters LB-Medium berechnet. Bei einer  $OD_{600}$  von 1,0 wurde mit 20 mL angeimpft, bei einer  $OD_{600} > 1,0$  mit entsprechend weniger. Das angesetzte Expressionsmedium, versetzt mit den jeweiligen Antibiotika, wurde nun bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  und 175 rpm geschüttelt bis eine  $OD_{600}$  von circa 0,2 erreicht wurde. Dann wurde die Temperatur auf  $22\text{ }^{\circ}\text{C}$  reduziert. Erreichten die Zellen eine  $OD_{600}$  von mindestens 0,7, wurde eine kleine Spatelspitze Eisen(III)-Chlorid als Eisen-Quelle für die Assemblierung der 4Fe4S-Cluster zugegeben und die Expression am T7-Promotor mit 1 mM IPTG induziert. Es ist wichtig eine Eisen(III)-Verbindung zu wählen, da Bakterien über ihre Siderophore nur Eisen(III)-Ionen aufnehmen können.<sup>[406]</sup> Der Expressionsansatz wurde für 2 h bei  $22\text{ }^{\circ}\text{C}$  und 100 rpm weitergeschüttelt. Die Senkung der Geschwindigkeit des Schüttlers wurde vorgenommen, um die Sauerstoff-Konzentration im Medium einzuschränken. Dadurch wurden die neu gebildeten FeS-Cluster weniger der Gefahr der Oxidierung ausgesetzt und die Bakterien produzierten wegen dem erhöhten Stress mehr Chaperone für die Proteinexpression. Dadurch konnte die Löslichkeit der SP-Lyase erhöht werden. Vor der IPTG-Induktion sowie am Ende der zweistündigen Expressionsphase wurde eine kleine Probe zur späteren Analyse auf einem SDS-Gel abgenommen. Diese wurde bei höchster Geschwindigkeit für 10 min zentrifugiert, das Zellpellet mit SDS-Auftragspuffer vorbereitet (50  $\mu\text{L}$  pro 1 mL Zellsuspension) und anschließend bis zur weiteren Verwendung bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert. Die Zellen wurden letztendlich in einer Sorvall-Zentrifuge (SLA-3000 Rotor, Thermo Fisher Scientific) bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  und 8.000 rpm für 8 min geerntet. Während der Überstand des Zellpellets abgegossen wurde, wurde Argon in die Zentrifugenbecher gespült, um die Zellen vor der Zell-Lyse unter anaerober Atmosphäre zu halten. Die Zellpellets wurden im Zentrifugenbecher bis zur weiteren Verarbeitung bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  weggefroren.

Die Kurzzeit-Expression wurde speziell für die *B.st.* –SPL optimiert, da diese SPL-Variante sehr anfällig gegenüber proteolytischem Abbau ist (*Kapitel 3.1*). *G.tn.* –SPL ist dagegen stabiler und ihre Expressionsausbeute konnte durch folgende Bedingungen deutlich verbessert werden: Die Anwuchsphase der Zellen bis zu einer  $OD_{600}$  von mindestens 0,7 erfolgte bei 37 °C und 175 rpm. Zur Induktion wurden nur 0,1 mM IPTG und eine kleine Spatelspitze Eisen(III)-Chlorid zugegeben. Die Expressionsansätze wurden schließlich bei 16 °C und 175 rpm über Nacht geschüttelt und am nächsten Tag geerntet.

### **Chemischer Zellaufschluss**

Zur Zell-Lyse und nachfolgender Proteinaufreinigung unter anaeroben Bedingungen wurden die Zellpellets mit Kühlelementen in die Glove-Box eingeschleust (genauer siehe 4.5). Da keine speziellen Geräte zum Zellaufschluss in der Glove-Box vorhanden waren, wurde ein chemischer Zellaufschluss gewählt, der gleichzeitig schonend für instabile Proteine wie die SP-Lyase ist. Dazu wurden je 5 mL BugBuster®-1X zu einem Gramm Zellen gegeben und diese auf einem Magnetrührer resuspendiert. Da die im BugBuster® enthaltenen Detergenzien während der Resuspension für gewöhnlich Schaum erzeugen, welcher Proteine an seiner Flüssig-Luft-Phasengrenze denaturieren lässt, wurde der BugBuster®-10X-Zusatz des Puffers erst nach diesem Schritt zugegeben. Die Lyse-Suspension wurde dann in ein 50-mL-Röhrchen umgefüllt und auf einem Wippschüttler bei Raumtemperatur für 20 min inkubiert. Da in der Glove-Box nur eine Zentrifuge für kleine Reaktionsgefäße zur Verfügung stand, wurde die Suspension in 2-mL-Reaktionsgefäße aliquotiert. Zur Abtrennung der meisten *E. coli* -Proteine wurde die Lyse-Lösung vor Zentrifugation auf 60 °C in einem Thermomixer erhitzt. Beide SPL-Varianten stammen aus thermophilen Organismen, so dass sie durch diesen Hitzeschritt nicht denaturiert wurden. Nach Zentrifugation bei 4 °C und 13.200 rpm (Mikrozentrifuge 5415R, Eppendorf) für 20 min wurde der Überstand abpipettiert und für die nachfolgenden Aufreinigungsschritte mit den Kühlelementen gekühlt. Da die SPL-Proteine wegen ihres 4Fe4S-Clusters eine braune Farbe aufweisen, konnte nach Zentrifugation geschätzt werden, wie viel SP-Lyase in der unlöslichen Fraktion (teils schwarzbraunes Pellet) vorlag.

### **His<sub>6</sub>-Affinitäts-Chromatographie**

Der His<sub>6</sub>-Affinitäts-Tag ist eine viel genutzte Proteinmarkierung, welche die Aufreinigung der Proteine durch Koordination an eine Nickel-Matrix erleichtert. Der Tag ist klein, nur schwach immunogen, ist bei pH 8,0 ungeladen und beeinträchtigt daher nicht die Faltung des Fusionspro-

teins in der Zelle (siehe: *The QIAexpressionist*<sup>TM</sup>, Qiagen). Die Interaktionen der Proteine zum Nickel werden für gewöhnlich durch hohe Imidazol-Konzentration wieder gelöst.

Da die Ausbeuten an SP-Lyase pro Liter Expressionsmedium sehr mäßig ausfielen, wurde eine Proteinaufreinigung normalerweise mit den Zellpellets aus vier 1-L-Expressionsansätzen durchgeführt. Die Prozedur erfolgte unter anaeroben Bedingungen in der Glove-Box, um die 4Fe4S-Cluster möglichst intakt zu halten. Dazu wurde eine leere Flüssig-Chromatographie-Säule (wiederverwendbar mit Luer-Lock-Gewinde, 16-mL-Bett-Volumen, Sigma-Aldrich) verwendet. Alternativ wurden auch leere PD-10-Säulen verwendet. In die Säule wurden 1–2 mL Ni-Sepharose pipettiert und mit Lyse-Puffer äquilibriert. Zu der kalt-gestellten Lyse-Lösung wurden währenddessen 5 mM (0,35 µL pro mL) β-Mercaptoethanol gegeben. Durch diesen Zusatz konnten unspezifische Bindungen an die Ni-Matrix minimiert werden. Anschließend wurde die Säule mit der Lyse-Lösung aufgefüllt, verschlossen und für mindestens 10 min auf einem Wipp-Schüttler geschwenkt. Dadurch konnten die His<sub>6</sub>-markierten SPL-Proteine effizient an die Ni-Ionen binden (*Batch*-Format). Der Durchfluss wurde durch Abtropfen gesammelt und die Säule schließlich neu beladen. Dies wurde solange wiederholt, bis die Lyse-Lösung aufgebraucht war. Bei hohen SPL-Konzentrationen verfärbte sich die ursprünglich blaue Ni-Matrix zu Braun. Das Säulenmaterial wurde nun mit 40–50 mL His-AC Waschpuffer, mit geringfügig erhöhter Imidazol-Konzentration, gewaschen. Der Zusatz von Tween-20 im Puffer ermöglichte eine weitere Reduzierung der unspezifischen Bindung von Proteinen an die Ni-Matrix. Die gebundenen Proteine wurden mit circa 20 mL His-AC-Elutionspuffer eluiert bis die blaue Farbe des Säulenmaterials wiederhergestellt wurde. Genauere Informationen zur Optimierung dieser Aufreinigungsstrategie sind in meiner Master-Arbeit zu finden.<sup>[339]</sup> Eine Probe des Eluats von 15 µL wurde abgenommen und zur späteren Analyse auf einem SDS-Gel vorbereitet. Die Ni-Sepharose wurde mit His-AC Spülpuffer, ddH<sub>2</sub>O und 20% unvergälltem Ethanol gewaschen und in letzterem zur Wiederverwendung gelagert (1–2 Mal).

### **Heparin-Affinitäts-Chromatographie**

Für viele enzymatische Analysen und unter anderem Kristallisationsstudien müssen die zu untersuchenden Proteine in ausreichender Reinheit (> 90%) vorliegen. Deshalb wurde das His<sub>6</sub>-Eluat mit Hilfe einer zweiten Prozedur weiter aufgereinigt. Da die SP-Lyase ein DNA-bindendes Protein ist, wurde die Heparin-Affinitäts-Chromatographie gewählt. Heparin besitzt einen ähnlichen strukturellen Aufbau wie DNA sowie eine negative Ladung im basischen pH-Bereich und ist daher optimal für die Reinigung von DNA-bindenden Proteinen geeignet.

Die Heparin-AC sollte möglichst immer direkt nach der His<sub>6</sub>-AC durchgeführt werden, da die SPL-Stabilität signifikant abnimmt, wenn sie über Nacht bei 4 °C zwischen gelagert wird (*Kapitel 3.1*).

Wie zuvor wurden circa 1–2 mL Säulenmaterial in eine zweite Flüssig-Chromatographie-Säule (siehe oben) pipettiert und mit His-AC Elutionspuffer äquilibriert. Die Säule wurde dann mit His<sub>6</sub>-Eluat aufgefüllt, verschlossen und für mindestens 10 min auf einem Wipp-Schüttler geschwenkt (*Batch*-Format). Nachdem alles His<sub>6</sub>-Eluat auf diese Weise mit dem Heparin-Säulenmaterial inkubiert wurde, wurde das Material mit einer Füllung (circa 15 mL) Heparin-AC-PufferA gewaschen. Die SP-Lyase wurde schließlich als braunes Eluat mit Heparin-AC-PufferB gesammelt. Durch diese plötzliche Elution blieb die SP-Lyase stabil. Eine Probe des Eluats von 15 µL wurde abgenommen und zur späteren Analyse auf einem SDS-Gel vorbereitet. Die Heparin-Sepharose wurde mit Heparin-AC Spülpuffer, ddH<sub>2</sub>O und 20% unvergälltem Ethanol gewaschen und in Letzterem zur Wiederverwendung gelagert (3–4 Mal).

### ***Konzentrierung und Anpassung des Puffer-Systems***

Die gesäuberte SPL-Lösung wurde nach der Heparin-Affinitäts-Chromatographie mit Hilfe von Amicon-Zentrifugenfiltern konzentriert. Da sich herausstellte, dass die SP-Lyase stabiler bei höheren Temperaturen war (*Kapitel 3.1*), wurde die Zentrifuge für diesen Prozess auf 25 °C geheizt und die Zentrifugen-Schritte bei 9.000 rpm (Mikrozentrifuge 5415R, Eppendorf) für 5–7 min durchgeführt.

Die Salzkonzentration der SPL-Lösung wurde durch Zugabe desselben Puffers mit höherer beziehungsweise niedrigerer Salzkonzentration angepasst. Dies war beispielsweise bei Reaktionsansätzen erforderlich. Mussten andere Bedingungen des Puffersystems geändert werden, wurde das Protein in Amicon-Zentrifugenfiltern umgepuffert. Andere Methoden, wie Dialyse oder PD-10-Säulen, sind nicht empfehlenswert, da das Protein während dieser Prozeduren fast vollständig ausfiel (*Kapitel 3.1*).

### ***Rekonstitution des 4Fe4S-Clusters in der SP-Lyase***

Die Rekonstitution von FeS-Clustern beruht auf dem Prinzip der spontanen Selbstassoziation. Dabei werden die Cluster von freien Eisen- und Sulfid-Ionen in Abhängigkeit geeigneter Thiol-Liganden gebildet. Im Fall der FeS-Protein-Rekonstitution fungiert das Protein als Thiol-Gruppen-Donor, welcher die Bildung des richtigen Cluster-Typs dirigiert.<sup>[342,407]</sup>

Zur Rekonstitution der SP-Lyase musste die Proteinkonzentration auf  $> 5 \text{ g L}^{-1}$  eingestellt werden, da bei einer Konzentration  $< 5 \text{ g L}^{-1}$  zu viele Nebenreaktionen auftraten, so dass die Protein-Lösung tief schwarz und zäh wie Teer wurde. Konnte die Konzentration nicht weiter erhöht werden, wurden im Folgenden geringere Eisen- und Sulfid-Mengen zugegeben. 2 mM Dithiothreitol (DTT, 100 mM Stammlösung) und 10% (w/v) Ammonium-Eisen(II)-Sulfat (100% w/v Stammlösung) wurden zur SPL-Lösung pipettiert und für 5 min auf 35 °C gestellt. Nach der Zugabe von 10% Natriumsulfid (100% w/v Stammlösung) wurde die Lösung für 1 h bei 35 °C inkubiert. Alternativ erfolgte die Rekonstitution bei 20 °C über Nacht. Es war wichtig, dass alle zugegebenen Lösungen vorgewärmt wurden, da ansonsten SPL-Protein ausfiel.

Nicht reagierte Eisen- und Sulfid-Ionen wurden mit Hilfe einer PD-10-Säule abgetrennt. Die Entsalzung wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt und das Protein mit demselben Puffersystem eluiert. Das Protein wurde danach erneut konzentriert und in Aliquots von 5–100 µL in Cryo-Gefäßen mit luftdichtem Schraubverschluss (O-Ring-System) bei –80 °C weggefroren.

### **SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (PAGE)**

Die SDS-PAGE ist eine Standardmethode zur Analyse und Auftrennung von Proteingemischen nach ihrer relativen Molekülgröße. Die Proteine werden mit dem anionischen Detergens Natrium-Dodecyl-Sulfat (engl.: *sodium dodecyl sulfate*, SDS) inkubiert. SDS bindet über seine aliphatischen Gruppen an hydrophobe Flächen im Protein. Dieses wird denaturiert und durch die gegenseitige Abstoßung der SDS-Moleküle linearisiert.<sup>[350]</sup> Die Zugabe eines Reduktionsmittels, wie DTT ermöglicht außerdem die Spaltung von Disulfidbrücken in den Proteinen. Der resultierende Komplex aus SDS und Protein weist eine starke, negative Ladung auf. Daher wandern diese Komplexe im Polyacrylamid-Gel zur Anode und werden anhand ihrer Größenunterschiede getrennt.<sup>[350]</sup> Größere Proteine werden stärker von der polymeren Struktur des Gels zurück gehalten als kleine Proteine. Die Trennleistung hängt auch bei dieser Art von Gel von der Dichte des Polymers ab. Für die Trennung kleinerer Peptide wird ein größerer Prozentanteil des Acrylamids verwendet und für größere Proteine *vice versa*. Üblicherweise wird ein Acrylamid-Gehalt von 5–20% für Proteine mit Molekulargewichten von 10–100 kDa verwendet.<sup>[350]</sup>

Die SDS-PAGE wurde in einem diskontinuierlichen 2-Gel-System durchgeführt. Die Proteine werden dabei zuerst von einem Sammelgel fokussiert und von einem nachfolgenden Trenngel nach der relativen Molekülgröße getrennt. Die beiden Gele wurden nach folgendem Rezept hergestellt:



<b>4 SDS-Gele</b>	<b>Trenngel 12%</b>	<b>Sammelgel 5%</b>
ddH <sub>2</sub> O	5,28 mL	3,4 mL
Rotiphorese®Gel 30	6,4 mL	0,83 mL
SDS-PAGE Trenngelpuffer	4 mL	–
SDS-PAGE Sammelgelpuffer	–	0,63 mL
10% (w/v) SDS	160 µL	50 µL
10% (w/v) APS	160 µL	50 µL
TEMED	16 µL	5 µL

Die letzten drei Komponenten müssen jeweils kurz vor dem Gießen in die Gel-Apparatur zugegeben werden. Ammoniumpersulfat (APS) und Tetramethylethyldiamin (TEMED) sind die Starter der Radikalreaktion. Das Trenngel wurde zuerst gegossen und nach erfolgter Polymerisierung wurde das Sammelgel obenauf gegossen. Mit Hilfe eines Kamms wurden Taschen in das Gel geformt. Nach vollständiger Polymerisierung konnten die Gele, umwickelt mit nassen Papiertüchern, im Kühlschrank für ein paar Wochen aufbewahrt werden.

Die Gele wurden schließlich in der Elektrophorese-Apparatur installiert und mit SDS-PAGE-Laufpuffer-1X übergossen. Die Proteinproben wurden 5 min mit SDS-PAGE-Auftragspuffer-1X bei 95 °C gekocht. Dieser enthält SDS, zur Denaturierung der Proteine, DTT, zur Reduktion von Disulfidbrücken, Glycerol, um der Lösung Dichte zu geben, damit die Proben auf den Boden der Geltaschen sinken und Bromphenolblau, um den Fortschritt der Elektrophorese zu verfolgen.<sup>[350]</sup> Zell-Lysat-Proben wurden außerdem 1–2 min ins Ultraschallbad gehalten. Dadurch wird genomische DNA zerstört, die ansonsten das Pipettieren erschweren und zu Schlieren auf dem Gel führen könnte. Je nach geschätztem Proteingehalt wurden 2–20 µL der Proben und 5 µL eines Protein-Standards aufgetragen. Eine Spannung von konstanten 120 V wurde solange angelegt, bis das Bromphenolblau bis zum unteren Rand des Gels gelaufen war. Die fertigen Gele wurden mit Coomassie-Färbelösung angefärbt und mit Coomassie-Entfärbelösung und Leitungswasser wieder entfärbt, so dass klare Proteinbanden gegen den entfärbten, leicht bläulichen Hintergrund sichtbar wurden.

### **Konzentrationsbestimmung von Proteinen**

Proteinkonzentrationen wurden mit Hilfe des Bradford-Assays bestimmt.<sup>[408]</sup> Diese Methode macht sich die Eigenschaft des Coomassie-Brilliantblau-G250-Farbstoffes zunutze, sein Absorptionsmaximum nach Assoziation an Proteine von 465 nm auf 595 nm zu wechseln.

Abhängig von der erwarteten Konzentration wurden 0,5–2 µL der Proteinprobe mit ddH<sub>2</sub>O auf 50 µL aufgefüllt und mit 950 µL 20% (v/v) Bradford-Reagenz (Bio-Rad) in ddH<sub>2</sub>O vermischt. Nach 5-minütiger Inkubation wurden die Proben mit einem vorkalibrierten BioPhotometer gemessen, welches den Proteingehalt in µg wiedergab. Die Kalibrierung wurde mit BSA-Lösungen (engl.: *bovine serum albumin*) bekannter Konzentration vorgenommen. Meist wurden 2–3 Proben der Proteinlösung gemessen und der Mittelwert davon bestimmt.

#### **4.5. Arbeitsablauf unter anaeroben Bedingungen**

Da die Sporen-Photoprodukt-Lyase wegen ihres labilen 4Fe4S-Clusters extrem sauerstoffsensitiv ist, wurden die meisten Arbeitsschritte unter anaerober Atmosphäre (< 2 ppm O<sub>2</sub>) in einer Glove-Box durchgeführt. Darunter fallen der chemische Zellaufschluss, die Proteinreinigung, sowie alle Enzym-Assays. Die Glove-Box war mit einem Temperatursensor und einem speziellen Sauerstoffsensor zur sensitiven Sauerstoffdetektion unter feuchter Atmosphäre ausgestattet. Puffer und Lösungen, die für Ansätze unter anaerober Atmosphäre benötigt wurden, wurden mit Stickstoff entgast bevor sie wie alles Verbrauchsmaterial über wiederholte Vakuum-Flut-Zyklen in die Glove-Box eingeschleust wurden. Meist blieben die Materialien über Nacht unter Vakuum, damit der im Plastik und Papier gespeicherte Sauerstoff entweichen konnte. Manche Lösungen wurden direkt in der Glove-Box hergestellt, indem die benötigten Festsubstanzen, wie Dithionit, eingeschleust und mit dem entgasten Puffer in der Glove-Box gelöst wurden. Zell-Pellets, Proteinproben und sensitive Geräte sollten nicht über den Vakuum-Mechanismus eingeschleust werden, damit keine Schäden entstehen können. Stattdessen wurden sie in der Schleuse bei minimal geöffneten Schleusendeckeln für mindestens 30 min mit der Stickstoffatmosphäre in der Glove-Box-Kammer gespült. Erhöhte Druckeinstellungen verhinderten dabei, dass Luftsauerstoff aus der Umgebung in die anaerobe Kammer gelangte. Wurde die Kammer trotzdem mit kleinen Mengen Sauerstoff verunreinigt, wurde dieser durch das wiederholte Umwälzen der Luft über einen Cu-Katalysator heraus gefiltert. Nahm die Leistung des Katalysators ab, so wurde er nach Herstellerangaben regeneriert.

#### **4.6. Enzym-Analysen**

##### ***Theoretischer Aminosäure-Sequenz-Vergleich***

Die Suche nach homologen Proteinsequenzen zur SPL aus *Geobacillus stearothermophilus* wurde mit der Protein-BLAST-Funktion (engl.: *basic local alignment search tool*) der Protein-

Datenbank NCBI durchgeführt (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Die Sequenz der *B.st.* –SPL wurde in das Suchfeld eingegeben und die folgenden Kriterien eingestellt:

Datenbank	Nicht-redundante Proteinsequenzen
Organismen	Keine Ausschlüsse oder Spezifikationen
Algorithmus	Protein-Protein BLAST (blastp)
Maximale Zielsequenzen	1000
Kurze Abfragen	Nein
<i>Expect threshold</i>	1
Wortgröße	3

Alle anderen Suchkriterien wurden aus der Voreinstellung übernommen.

Die erhaltenen, potentiellen SPL-Homologe wurden anschließend nach ihrer Sequenzabdeckung und ihrem E-Wert, der die Signifikanz der Übereinstimmung wiedergibt, evaluiert. Ausgesuchte Sequenzen wurden anschließend mit der *Alignment*-Funktion des *CLC Sequence Viewer 6* gegenübergestellt (Einstellungen: *gap open cost* 10, *gap extension cost* 1, *very accurate*).

### ***Tryptischer Verdau von Proteinen und Sequenz-Analyse via LC-ESI-MS/MS***

Zur Bestimmung der Proteinsequenz von isolierten und in der SDS-PAGE aufgetragenen Proteinen, wurden die jeweiligen Protein-Banden aus den SDS-Gelen ausgeschnitten und im Gel einem tryptischen Verdau unterzogen. Dazu wurde nach einem Standard-Protokoll des *Carell-Labors* gearbeitet.<sup>[409]</sup> Die Analyse der Sequenzen mit dem LC-ESI-MS/MS wurden von *Dr. Christian Deiml* und *Michael Gattner* durchgeführt und die Bedingungen der Massenanalyse sind ebenfalls in der Publikation von *Gattner et al.* nachzulesen.<sup>[409]</sup> Anhand der gefundenen Sequenzen wurde überprüft, ob die Proteinbanden zur SP-Lyase gehören.

### ***Bestimmung des Eisen- und Sulfid-Gehalts in der SP-Lyase***

Die Methode zur Bestimmung des Eisen- und Sulfid-Gehalts in Proteinproben wurde von *Fluhe et al.* übernommen.<sup>[281]</sup> Sie beruht auf der Proteindenaturierung und anschließenden Bildung von Farbkomplexen mit Eisen und Sulfid. Die Absorption dieser Komplexe wurde schließlich spektroskopisch gemessen und die Konzentration durch Vergleich mit Eisen- und Sulfid-Standards berechnet.

Zur Herstellung der Eisenstandards wurde eine 0,5 mM Ammoniumeisensulfat-Stocklösung angesetzt. Jeweils drei Ansätze mit 0 nmol, 1 nmol, 3 nmol, 7 nmol, 15 nmol und 30 nmol Fe(II) in ddH<sub>2</sub>O ( $\Sigma$  100  $\mu$ L) wurden für die Messung der Eisen-Standardkurve vorbereitet. Für die Sulfid-Standard-Reihe wurde eine 1 mM Stocklösung Dinatriumsulfid in 10 mM NaOH hergestellt und 1 h mit Argon gespült. Wiederum wurden je drei Ansätze mit 0 nmol, 1 nmol, 3 nmol, 7 nmol, 15 nmol und 30 nmol Sulfid in ddH<sub>2</sub>O ( $\Sigma$  200  $\mu$ L) für die Messung der Sulfid-Standardkurve vorbereitet. Da manche Proteine die Methylenblausynthese zur Bildung des Sulfid-Farbstoff-Komplexes stören könnten, wurden zusätzlich drei Kontroll-Lösungen mit jeweils 3 nmol Protein und 3 nmol Sulfid in ddH<sub>2</sub>O ( $\Sigma$  200  $\mu$ L) angesetzt. Für die Proteinmessungen wurden je drei Ansätze mit 3 nmol SP-Lyase in ddH<sub>2</sub>O ( $\Sigma$  100  $\mu$ L beziehungsweise  $\Sigma$  200  $\mu$ L) vorbereitet. Alle Proben wurden im Folgenden gleich behandelt.

Für die Bestimmung des Eisen-Gehalts in der SP-Lyase wurden die Proben zur Proteindenaturierung mit 100  $\mu$ L 1% HCl (v/v in ddH<sub>2</sub>O) versetzt und 10 min bei 80 °C und 200 rpm geschüttelt. Nach Abkühlung der Reaktionsgefäße wurden nacheinander 500  $\mu$ L Ammoniumacetat (7,5% w/v in ddH<sub>2</sub>O), 100  $\mu$ L Ascorbinsäure (4% w/v in ddH<sub>2</sub>O), 100  $\mu$ L SDS (2,5% w/v in ddH<sub>2</sub>O) und 100  $\mu$ L Ferene (0,75% w/v in ddH<sub>2</sub>O) zugegeben und nach jeder Zugabe leicht gevortexet. Die Proben wurden 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, in Plastik-Küvetten (Schichtdicke 1 cm) umgefüllt und anschließend die Absorption bei 593 nm mit Hilfe des UV-Vis-Spektrophotometers bestimmt. Dabei wurde je eine Messreihe (0–30 nmol Fe(II) und 3 nmol SPL) nacheinander pipettiert und gemessen. In einer Office-Excel-2007-Tabelle wurden die Werte der 0-nmol-Standards von den Werten der anderen Proben einer Messreihe abgezogen. Die Standard-Werte wurden schließlich gegen den nmol-Gehalt aufgetragen, eine Ausgleichsgerade erstellt und über die Geradengleichung der entsprechende Fe(II)-Gehalt der SPL-Lösung berechnet. Durch Einbeziehen der SPL-Konzentration erhielt man den Eisen-Gehalt pro SPL-Molekül. Aus den drei einzeln bestimmten Werten der drei Messreihen wurde letztendlich der Mittelwert mit Standardabweichung berechnet.

Die Bestimmung des Sulfid-Gehalts erfolgte auf ähnliche Weise. Zur Proteindenaturierung und Bildung eines Zinksulfid-Präzipitats wurden 600  $\mu$ L Zinkacetat (1% w/v in ddH<sub>2</sub>O) und 50  $\mu$ L NaOH (7% w/v in ddH<sub>2</sub>O) zugegeben, die Reaktionsgefäße verschlossen, einmal vorsichtig invertiert und anschließend 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zu jeder Probe wurde dann einzeln 150  $\mu$ L DMPD (0,1% v/v in 5 M HCl) pipettiert, durch Auf- und Abpipettieren das Zinksulfid gelöst, weitere 150  $\mu$ L Eisen-(III)-Chlorid (10 mM in 1 M HCl) dazu pipettiert und 30 sec gevortexet. Nach 30-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur unter gelegentlichem Schütteln wurde die Absorption bei 670 nm gemessen. Dabei wurde ebenfalls je eine Messreihe (0–30 nmol

Sulfid, 3 nmol SPL und je 3 nmol SPL & Sulfid) nacheinander pipettiert und gemessen. Die Auswertung erfolgte wie zuvor für die Bestimmung des Eisen-Gehalts beschrieben.

Stimmten die berechneten Sulfid-Gehalte der SPL & Sulfid-Proben mit denen der Sulfid-Werte des Standards und des SPL-Proteins überein, konnten die gemessenen Sulfid-Gehalte als zuverlässig betrachtet werden. Wichen die Werte jedoch voneinander ab, war damit zu rechnen, dass das Protein die Methylenblausynthese störte. Die berechneten Werte wären in diesem Fall nicht glaubwürdig.

### **UV-Vis-Spektroskopie**

Analysen des FeS-Clusters in der SP-Lyase wurden unter anderem mit der UV-Vis-Spektroskopie durchgeführt. Dabei wurde die Absorption der Protein-Lösung nach Anregung mit unterschiedlichen Wellenlängen bestimmt. FeS-Cluster weisen Absorptionsmaxima bei einer spezifischen Wellenlänge auf, anhand derer man den Cluster-Typ erkennen kann.<sup>[342]</sup>

Die Reaktionsbedingungen der einzelnen Ansätze sind in den entsprechenden Abbildungen vermerkt. Um das Enzym während der Messung im Spektroskop weiter unter anaerober Atmosphäre zu halten, wurden die Quartzküvetten nach Präparation der Proben mit einem passenden Gummi-Septum in der Glove-Box abgedichtet. Sollte während der Messung außerhalb der Glove-Box etwas zugegeben werden, erfolgte dies mit Hilfe einer Hamilton-Spritze, die durch das Septum gestochen wurde. So konnten  $\mu\text{L}$ -genaue Zusätze zugegeben werden, ohne die Probe einer unnötigen Sauerstoffbelastung auszusetzen.

Die Küvetten hatten eine Schichtdicke von 1 cm, waren jedoch konstruiert für die Messung von mindestens 100  $\mu\text{L}$ . Um sicherzustellen, dass die 100- $\mu\text{L}$ -Kammer vollständig gefüllt war, wurden mindestens 130  $\mu\text{L}$  Probe hinein pipettiert. Um das Gerät für die Proben-Messung zu eichen, wurde vorab eine Referenz-Messung mit dem Puffer der jeweiligen SPL-Probe durchgeführt. Die Messungen erfolgten bei Raumtemperatur (Standard-Messungen) beziehungsweise bei 35 °C (Reaktions-Messungen) mit nur einer Akkumulation. Folgende Einstellung wurden gewählt: 100 nm min<sup>-1</sup> Scangeschwindigkeit; 0,1 nm Datenabstand; 2 nm Bandweite; 300–550/600 nm Wellenlängenbereich.

Die erhaltenen Spektren wurden mit der Software Origin 6.0 weiter ausgewertet. Die Kurven wurden mit der Funktion „Gleitender Durchschnitt“ mit 60–100 Datenpunkten geglättet und nochmals Basislinien-korrigiert. Differenzspektren wurden durch manuelle Subtraktion der Datensammlungen voneinander erstellt.

## ***Circular-Dichroismus-(CD)-Spektroskopie***

In der CD-Spektroskopie wird linear polarisiertes Licht in eine Probe eingestrahlt. Dieses Licht ist aus zwei zirkulär polarisierten Komponenten aufgebaut, die gegen den Uhrzeigersinn (L) oder mit dem Uhrzeigersinn (R) ausgerichtet sind.<sup>[343]</sup> Besitzt die Probe einen chiralen Charakter, dann werden die beiden zirkulären Komponenten unterschiedlich stark absorbiert, wodurch sich die lineare Polarität des emittierten Lichts ändert. Dieser Effekt wird als elliptische Polarisation bezeichnet und im CD-Spektroskop als sogenannte Elliptizität  $\theta$  gemessen.<sup>[343]</sup> In Proteinen geben vor allem die Peptidbindung ( $< 240$  nm) und aromatische Aminosäure-Reste (260–320 nm) ein Signal wieder, aber auch Signale gebundener Cofaktoren können bei Wellenlängen  $> 300$  nm identifiziert werden. Besonders geläufig ist diese Methode zur einfachen Detektion von Konformationsänderungen in Proteinen.<sup>[343]</sup>

Etliche Hintergrundsignale könnten das CD-Signal jedoch stören.<sup>[343]</sup> Darum ist es wichtig potentielle Störfaktoren so gering wie möglich zu halten. Dazu gehört unter anderem die Qualität der Proteinlösung. Um Störsignale zu vermeiden, sollte die Lösung möglichst homogen und gut gelöst sein.<sup>[343]</sup> Dies ist ein Problem bei der SP-Lyase, da die Lösung bei zu niedriger Temperatur durchaus trübe wurde. Der Einfluss dieses Problems wurde über den HT-Wert (in Volt) überprüft. Außerdem können HEPES und NaCl besonders im fernen UV ( $< 200$  nm) Hintergrundsignale liefern.<sup>[343]</sup> Dies konnte jedoch umgangen werden, indem der Puffer für die Messungen im fernen UV zu geringen HEPES- und NaCl-Konzentrationen angepasst wurde. Da das Protein ebenfalls in sehr geringer Konzentration bei solchen Messungen vorliegt, hatte die Anpassung keinen signifikanten Einfluss auf die Protein-Stabilität. Die gewählten Pufferbedingungen wurden vor den Messungen auf Hintergrundsignale getestet. Da kaum Störsignale zu erkennen waren, wurde die SP-Lyase im teils angepassten, HEPES/NaCl-System belassen. Die Reaktionsbedingungen der einzelnen Ansätze sind in den entsprechenden Abbildungen vermerkt.

Für Messungen im nahen UV (250–500 nm) wurden dieselben Quartzküvetten wie für die UV-Vis-Spektroskopie verwendet. Für Messungen im fernen UV (195–250 nm) wurde eine dünnere Küvette mit 0,1 cm Schichtdicke verwendet, da die Signale im fernen UV stärker sind<sup>[343]</sup> und dadurch eine geringere Konzentration und dünnere Schichtdicke ausreichen. Damit wurde sichergestellt, dass die Gesamt-Absorption der Proben  $\leq 1,0$  war.<sup>[343]</sup> Anstatt mit 130  $\mu\text{L}$  wie für die großen Küvetten waren für die dünne Küvette 200–300  $\mu\text{L}$  notwendig. Beide Küvetten wurden wie im vorherigen Kapitel beschrieben mit Hilfe von Gummi-Septen in der Glove-Box abgedichtet, um Sauerstoff auch während der Messung auszuschließen. Der Puffer wurde vor den Proben gemessen und erst im Anschluss wurden die Daten der Proteinproben damit manuell korrigiert.

Die Messungen erfolgten bei Raumtemperatur mit fünf Akkumulationen im nahen UV (da die Zeit der Messungen ansonsten zu lange wurde) und mit zehn Akkumulationen im fernen UV. Weitere Einstellungen waren: 1 nm Bandweite; 20 nm min<sup>-1</sup> Scangeschwindigkeit; 1 sec Antwortzeit; 0,1 nm Datenabstand.

Die gemessenen CD-Signale aus der Peptidbindung (fernes UV) werden üblicherweise normalisiert durch Skalierung auf die molare Konzentration.<sup>[343]</sup> Dazu wurde die gemessene Elliptizität  $\theta_\lambda$  (angegeben in deg für engl.: *degree*), bei einer bestimmten Wellenlänge  $\lambda$ , in die Elliptizität  $\theta_{MRW}$  bezogen auf das mittlere Gewicht der Aminosäure-Reste (engl.: *mean residue weight, MRW*) umgewandelt:<sup>[343]</sup>

$$MRW = M / (N - 1)$$

Das mittlere Gewicht der Aminosäure-Reste ist abhängig von der Molekülmasse  $M$  (in Da) und der Anzahl der Aminosäuren in der Proteinkette  $N$ . Für alle verwendeten SP-Lyasen (Wildtyp und Mutanten) betrug dieser Wert 116 Da. Die Elliptizität  $\theta_{MRW}$  ist jedoch nicht nur abhängig vom MRW-Wert, sondern auch von der Schichtdicke der Küvette  $d$  (in cm) und der Konzentration  $c$  (in g mL<sup>-1</sup>) der Proteinlösung:<sup>[343]</sup>

$$\theta_{MRW} = (MRW \times \theta_\lambda) / (10 \times d \times c)$$

Die Einheit von  $\theta_{MRW}$  ist deg cm<sup>2</sup> dmol<sup>-1</sup>, indem die mL in cm<sup>3</sup> umgerechnet werden und der Faktor 10 hinzugefügt wurde, um mol in dmol umzurechnen.

Dadurch dass auch die Konzentration in die Signalgröße mit eingerechnet wird, wirken sich bereits relativ kleine Konzentrationsschwankungen der Proteinlösung enorm auf das Endergebnis aus. Deshalb wurden nach der Messung die Abweichungen in der Konzentration in der oben gezeigten Formel nachkorrigiert. Der Fehlerbereich der Konzentrationen schwankte dabei nicht mehr als 0,5 g L<sup>-1</sup>.

Die Kurven wurden mit der Glättfunktion "Gleitender Durchschnitt" mit 60–100 Datenpunkten in Origin 6.0 abschließend geglättet.

### **Aktivitäts-Messungen der SP-Lyase**

Ansätze der SPL-Reparatur-Reaktion wurden mit unterschiedlichen Messmethoden (UV-Vis-Spektroskopie, EPR-Spektroskopie, HPLC) ausgewertet. UV-Vis und EPR wurden allerdings nur verwendet, um mögliche intermediäre, organische Radikale während der Reaktion zu identifizieren. Die Vorbereitung und Handhabung des Aktivitäts-Assays war in allen drei Methoden gleich. Die einzelnen Reaktionsbedingungen konnten aber voneinander abweichen und wurden in

den entsprechenden Abbildungen ausgeführt. Im Folgenden wird neben der allgemeinen Handhabung der Aktivitäts-Assays auch die Auswertung der HPLC-Analysen beschrieben, da diese Art der Messmethode zur tatsächlichen Bestimmung der Enzym-Aktivität verwendet wurde.

Die Ansätze wurden bei Raumtemperatur pipettiert, da das Protein auf Eis ausfällt. Der Puffer wurde vorgelegt, dann das Enzym und schließlich der SAM-Cofaktor und das DNA-Substrat. Die Reaktion wurde durch Zugabe von (Na-)Dithionit gestartet und bei 35 °C inkubiert.

Unter Umständen war es empfehlenswert das Protein für eine gewisse Zeit (circa eine Stunde) mit (Na-)Dithionit zu inkubieren, um den FeS-Cluster zu vorreduzieren, und die Reaktion mit SAM und DNA zu starten (beispielsweise in EPR-Experimenten). Da beispielsweise für die Messung von  $K_M$ -Werten bis zu 20 Proben gleichzeitig pipettiert wurden, war diese Strategie für solche Messungen schwierig umzusetzen. Deswegen wurden alle Proben vorbereitet und im 30-sec-Abstand mit (Na-)Dithionit aktiviert. Dies wurde als Standardprozedur zum Zweck der Vergleichbarkeit beibehalten.

Die Reaktionen wurden letztendlich durch Sauerstoff-Exposition gestoppt. Die Enzym-Inaktivierung war umso effizienter, wenn die Reaktionslösung zunächst in flüssigem Stickstoff schockgefroren wurde und dann an Luft wieder aufgetaut wurde. Dies ist vor allem vorteilhaft, wenn mehrere Ansätze gleichzeitig abzustoppen waren. Diese konnten dann wie beim Reaktionsstart im 30-sec-Abstand erfolgen.

Die Proben wurden außerhalb der Glove-Box schließlich für die HPLC vorbereitet, indem sie mit ddH<sub>2</sub>O auf 100 µL aufgefüllt wurden und durch einen 0,2 µm HPLC-Filter gespritzt wurden. Damit das Enzym nicht auf die HPLC-Säule gelangt und diese verstopft oder anderweitig beschädigt, wurde ein zur Säule passender Vorfilter eingesetzt. Dieser filtert das Protein effizient aus der Lösung heraus, was durch die starke Braunfärbung nach etlichen HPLC-Läufen zu erkennen war. Aus diesem Grund war es wichtig, dass der Vorfilter regelmäßig überprüft und gewechselt wurde. Durch den Einsatz des Vorfilters wurde die Lebenszeit der verwendeten HPLC-Säule deutlich erhöht.

Die Auswertung der Aktivitäts-Assays hing von den jeweiligen Substraten und den zu quantifizierenden Produkten ab. Im einfachsten Ansatz wurden fluoreszenzmarkierte SP-DNA-Stränge verwendet. In solchen Versuchen konnte nur die Reparatur des SP quantifiziert werden, da in der HPLC nur die Fluoreszenz des Substrat-Stranges und des 5'-Produkt-Stranges detektiert wurde. Die Zuweisung der beiden Stränge erfolgte zuvor mit entsprechenden Kontrollsträngen. Mit Hilfe der HPLC-Software wurden schließlich die Flächen *A* unter den Peaks bestimmt und in



einer Excel-2007-Tabelle aufgetragen. Die Produktkonzentrationen wurden über folgende Formel berechnet:

$$c(\text{Produkt}) = A(\text{Produkt}) / ( A(\text{Substrat}) + A(\text{Produkt}) ) \times c(\text{Substrat})$$

$c(\text{Substrat})$  ist dabei die Ausgangskonzentration des DNA-Substrats.

Wurden in der SPL-Reaktion keine fluoreszenzmarkierten SP-DNA-Substrate eingesetzt und sollte neben der Auswertung der Reparatur-Reaktion auch die AdoH-Produktion verfolgt werden, so erfolgte die Detektion an der HPLC mit einem UV-Vis-Detektor über einen großen Wellenlängen-Bereich (PDA-Detektor). Das Ergebnis waren 3D-Spektren. Zur Auswertung wurde ein 2D-Spektrum bei 260 nm extrahiert. Die einzelnen Peaks des Substrat-Stranges beziehungsweise des SP-Dinukleosids, der Produkt-Stränge beziehungsweise des Thymins und des AdoH sowie des Gegenstranges wurden durch Injektion entsprechender Kontrollstränge zugewiesen. Die Zuteilung wurde nochmals anhand der Absorptionsmaxima der einzelnen Peaks in den 3D-Spektren überprüft. Die ungefähren Absorptionsmaxima der Nukleobasen sind vergleichsweise: Adenin 260 nm, Thymin 264 nm, Guanin 273 nm, Cytosin 266 nm.

Wiederum wurden zur Berechnung der Produktkonzentrationen die Flächen unter den zugewiesenen Peaks bestimmt. Da die unterschiedlichen Substanzen jedoch auch unterschiedliche Extinktionskoeffizienten bei 260 nm besitzen, mussten die Flächen zunächst relativiert werden. Dazu wurden die Extinktionskoeffizienten  $\epsilon$  der einzelnen DNA-Stränge über die Summe der Extinktionskoeffizienten mal der Anzahl  $N$  der einzelnen Nukleobasen bestimmt:

$$\epsilon(\text{DNA}) = N(\text{dA}) \times 0,015 + N(\text{dT}) \times 0,0084 + N(\text{dG}) \times 0,012 + N(\text{dC}) \times 0,0071$$

Für das Sporenphotoprodukt wurde derselbe Extinktionskoeffizient wie für eine TT-Sequenz verwendet. Mit den ermittelten Extinktionskoeffizienten konnten nun die Flächen normalisiert werden zu  $A_{\text{norm}}$ :

$$A_{\text{norm}} = A_{\text{gemessen}} / \epsilon_{260}$$

Die Berechnung der Produktkonzentration wird dadurch erschwert, dass aufgrund des fehlenden Phosphats im Rückgrat anstelle eines Produktes (-TT-) zwei Produkte (-T und T-) entstehen. Der Umsatz der SP-Reparatur bezieht sich jedoch nur auf ein Produkt. Daher wurde für die Flächen der Produkt-Stränge der Mittelwert  $MWA$  verwendet und mit folgender Formel der Umsatz der Reparatur von DNA-Strängen aus den normalisierten Flächen bestimmt:

$$c(\text{Produkte}) = MWA(\text{Produkte}) / ( A(\text{Substrat}) + MWA(\text{Produkte}) ) \times c(\text{Substrat})$$

Für die Bestimmung des SP-Dinukleosid-Umsatzes musste dagegen das Ergebnis halbiert werden, da nach Reparatur des SPs zwei Thymine anstatt einem TT entstanden:

$$c(\text{Produkt}) = A(\text{Produkt}) / 2 ( A(\text{Substrat}) + A(\text{Produkt}) ) \times c(\text{Substrat})$$

Wurden die Aktivitäts-Analysen mit nicht-rekonstituiertem Enzym durchgeführt, so wurden die Werte noch mit der Cluster-Beladung (37,5%) korrigiert.

Um als letztes die AdoH-Konzentration zu berechnen, benötigt man eine Vergleichsfläche. In dsDNA-Assays wurde dazu der Gegenstrang verwendet, dessen Konzentration sich während der Reaktion nicht ändert. Wurde ssDNA oder SP-Dinukleosid als Substrat verwendet, so wurde während der Vorbereitung der Probe eine feste Konzentration eines weiteren Stranges hinzu pipettiert, meist wiederum der Gegenstrang. Die AdoH-Konzentration wurde schließlich aus den normalisierten Flächen des AdoH-Peaks und des Gegenstrang-Peaks bestimmt:

$$c(\text{AdoH}) = A(\text{AdoH}) / A(\text{Gegenstrang}) \times c(\text{Gegenstrang})$$

Die Datenpunkte wurden abschließend in Origin 6.0 aufgetragen und mit der *Hill*-Funktion ( $n = 1$ , entspricht *Michaelis-Menten*-Gleichung) zur Auswertung von Kurven-Daten oder mit einer linearen Regression zur Auswertung der Anfangsgeschwindigkeit gefittet. Im Fall der Aktivitätsmutanten musste zur Auswertung des  $K_M$ -Wertes wegen dem Effekt der Substrat-Inhibition jedoch die Software Sigma-Plot (Enzyme Kinetics) 11.0 verwendet werden. Diese ist unter anderem spezialisiert zur Berechnung der Substrat-Inhibitions-Werte. Die davon berechnete Fitkurve wurde erneut in Origin 6.0 aufgetragen.

### **Umkehrphasen-Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie (RP-HPLC)**

Die Umsätze der SPL-Reaktion wurden mittels der Umkehrphasen-HPLC verfolgt. In dieser Methode werden die einzelnen Substanzen der Reaktionslösung durch ihre unterschiedlich ausgerichteten Interaktionen mit der hydrophoben Oberfläche der stationären Phase getrennt.<sup>[350]</sup>

Je unpolarer ein Stoff ist, umso mehr wird er von der stationären Phase zurück gehalten. Dieser Effekt wird vor allem durch den Kohlenstoffgehalt pro Volumeneinheit der stationären Phase beeinträchtigt.<sup>[350]</sup> Für DNA wird üblicherweise eine  $C_{18}$ -Säule verwendet. Die gebundenen Substanzen werden schließlich mit Acetonitril eluiert, welches mit dem Analyten um die hydrophobe Oberfläche konkurriert. Durch reihengeschaltete Detektionsgeräte werden die eluierten Substanzen als *Gauss-Lorentz*-Signalpeak in einer Signal-Zeit-Funktion visualisiert.<sup>[350]</sup>

In dieser Arbeit wurde ein HPLC-System von Waters verwendet mit entsprechendem UV-Vis- und Fluoreszenz-Detektor. Da dsDNA aus entsprechenden Reparatur-Reaktionen in Einzelsträngen detektiert werden sollte, wurde das System während dem Lauf auf 60 °C erhitzt. Nur wenige

Säulen sind für solch hohe Temperaturen ausgerichtet. Daher wurde für alle Messungen eine EC250/3 Nucleodur C18 Gravity-Säule (3  $\mu\text{m}$ ) mit entsprechendem Vorfilter von Macherey-Nagel verwendet. Es wurde eine Flussrate von  $0,3 \text{ mL min}^{-1}$  eingestellt. Die Säule wurde bei  $60^\circ\text{C}$  mit einem Gradienten von  $0 \rightarrow 7 \text{ min}$  80% Acetonitril zu 100% PufferB;  $7 \rightarrow 15 \text{ min}$  100% PufferB;  $15 \rightarrow 16 \text{ min}$  100% zu 80% PufferB (in PufferA);  $16 \rightarrow 24 \text{ min}$  20% zu 100% PufferA;  $24 \rightarrow 28 \text{ min}$  100% PufferA konditioniert. Für die Messung der Fluoreszenzstränge wurde der Elutions-Gradient optimiert auf  $0 \rightarrow 3 \text{ min}$  0% zu 30% PufferB (in PufferA);  $3 \rightarrow 25 \text{ min}$  30% PufferB (in PufferA);  $25 \rightarrow 30 \text{ min}$  30% zu 100% PufferB;  $30 \rightarrow 40 \text{ min}$  100% PufferB;  $40 \rightarrow 46 \text{ min}$  0% zu 100% Puffer A;  $46 \rightarrow 50 \text{ min}$  100% PufferA. Für die UV-Vis-Detektion der Reaktions-Komponenten wurde folgender Elutions-Gradient verwendet:  $0 \rightarrow 45 \text{ min}$  0% zu 15% PufferB (in PufferA);  $45 \rightarrow 51 \text{ min}$  15% zu 100% PufferB (in PufferA);  $51 \rightarrow 65 \text{ min}$  100% PufferB;  $65 \rightarrow 71 \text{ min}$  0% zu 100% Puffer A;  $71 \rightarrow 75 \text{ min}$  100% PufferA. Je nach Größe der zu detektierenden Stränge wurde der 15%-Gradient auf einen 20–25%-Gradienten angepasst. Für die Analyse der SPL-Reaktionen mit 39mer-Substraten wurde ein spezieller Gradient optimiert:  $0 \rightarrow 3 \text{ min}$  0% zu 9% PufferB (in PufferA);  $3 \rightarrow 45 \text{ min}$  9% PufferB (in PufferA);  $45 \rightarrow 51 \text{ min}$  9% zu 100% PufferB (in PufferA);  $51 \rightarrow 65 \text{ min}$  100% PufferB;  $65 \rightarrow 71 \text{ min}$  0% zu 100% PufferA;  $71 \rightarrow 75 \text{ min}$  100% PufferA. Abschließend wurde die Säule im Spül-Lauf auf Raumtemperatur abgekühlt:  $0 \rightarrow 3 \text{ min}$  0% zu 50% PufferB (in PufferA);  $3 \rightarrow 8 \text{ min}$  50% zu 100% PufferB (in PufferA);  $8 \rightarrow 16 \text{ min}$  100% PufferB zu 100% Acetonitril;  $16 \rightarrow 19 \text{ min}$  100% Acetonitril;  $19 \rightarrow 23 \text{ min}$  100% zu 80% Acetonitril;  $23 \rightarrow 29 \text{ min}$  80% Acetonitril; 30 min Stopp.

Beispiel-Spektren der drei Elutions-Gradienten sind in *Appendix 2* gezeigt. Um die Detektionsgrenzen nicht zu unterschreiten, wurde von Reaktionsansätzen mit fluoreszenzmarkierter DNA ein Volumen entsprechend 2–60 pmol Gesamt-DNA-Gehalt und mit nicht-markierter DNA ein Volumen entsprechend 250–1.000 pmol Gesamt-DNA-Gehalt aufgespritzt.

### **Elektronen-Paramagnetische-Resonanz-(EPR)-Spektroskopie**

Mittels der EPR-Spektroskopie werden Substanzen mit ungepaarten Elektronen in einem magnetischen Feld durch Mikrowellen-Strahlung angeregt.<sup>[369]</sup> Dadurch können unter anderem organische Radikale, wie proteingebundene Aminosäure-Radikale oder anorganische Substanzen, wie 4Fe4S-Cluster, detektiert und analysiert werden.

Die EPR-Messungen wurden in einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe von *Prof. Dr. Stefan Weber* an der Universität Freiburg von *Lorenz Heidinger* durchgeführt und zusammen mit *Dr. Erik Schleicher* evaluiert. Für Details der Mess- und Simulationsparameter sollte man sich

daher vertrauensvoll an *Lorenz Heidinger* wenden. Die Optimierung der Reaktionskonditionen der SP-Lyase bis hin zum Transport der Proben wird eingehend in den Ergebnissen diskutiert.

2-Puls-Hahn-Echo-Spektren wurden mit einem Bruker-Elexsys-E680-Spektrometer aufgenommen. Alle Zusatz-Geräte sind im Material-Teil (*Kapitel 4.1*) aufgelistet. Als Mikrowellenleistung wurden 0–3 dB, entsprechend 1000–100 W, eingestellt und die Mikrowellenfrequenz um 9,72 GHz variiert.

*Continuous-Wave*-EPR-Spektren wurden mit einem Bruker-EMX-048T-Spektrometer aufgenommen. Alle Zusatz-Geräte sind im Material-Teil (*Kapitel 4.1*) aufgelistet. Die Mikrowellenleistung und Mikrowellenfrequenz sind in den Abbildungen der jeweiligen Messungen angegeben.

Die Simulationen der EPR-Spektren wurde mit der EasySpin Software durchgeführt.<sup>[410]</sup> Als Algorithmus wurde „pepper“ gewählt.

### **Kristallisationsansätze**

Kristallisationsplatten wurden in der Glove-Box pipettiert. Für ein Screening neuer Kristallisationsbedingungen wurden verschiedene *Suites* von Qiagen (z.B. *The Nucleix*) verwendet. Diese wurden in 96-Well-Platten pipettiert mit *Sitting-Drop- Wells* für 1–2- $\mu$ L-Tropfen. Wurden vielversprechende Bedingungen gefunden so wurde versucht sie in größerem Maßstab (24-Well-Platte, *Sitting-* oder *Hanging-Drop*) zu reproduzieren und zu optimieren, indem die einzelnen Konzentrationen der Präzipitationsmittel variiert wurden. Die SP-Lyase wurde in unterschiedlichen Konzentrationen (6–10 g L<sup>-1</sup>) mit dsDNA im Verhältnis 1:1;1–1,3; SAM oder AdoH und Methionin im acht-fachen Überschuss in 50 mM HEPES, 300 mM NaCl und 5% Glycerol (pH7,5) inkubiert und anschließend per Hand pipettiert. Die Platten wurden versiegelt und entweder in die Glove-Box oder unter 18 °C in einen Kühlschrank außerhalb der Glove-Box zur Kristallanzucht gestellt.

Kristall-Objekte wurden an der Beamline PXIII (*Swiss Light Source (SLS)*, Villigen, Schweiz) gemessen.

### **Fluoreszenz-Polarisation (FP)**

Die Methode der Fluoreszenz-Polarisation kann sehr gut zur Messung von Protein-DNA-Dissoziationskonstanten verwendet werden. Das Prinzip beruht auf einem fluoreszenzmarkierten Liganden, hier DNA, und steigenden Konzentrationen an Protein, welches die Bewegungsfreiheit der DNA einschränkt und damit auch seine Fluoreszenz-Eigenschaften verändert.<sup>[350,381]</sup> Zur An-

regung der Chromophore des Fluoreszenz-Farbstoffs wird vertikal polarisiertes Licht der entsprechenden Wellenlänge verwendet. Trifft das Licht auf das Chromophor, so kann dieses nur entlang einer Achse angeregt werden (= Transitions-Dipolmoment).<sup>[350,381]</sup> Freie DNA bewegt sich allerdings in Lösung und dadurch ist die Wahrscheinlichkeit gering, dass die DNA-Moleküle richtig ausgerichtet sind. Nur wenig polarisiertes Licht wird emittiert und es erfolgt eine Depolarisation. Bindet die DNA an Protein, so wird die *Brown'sche* Bewegung verlangsamt und die Wahrscheinlichkeit steigt, dass die DNA-Moleküle richtig zur Absorption ausgerichtet sind. Das emittierte Licht ist stärker polarisiert als zuvor. Die DNA-Protein-Komplex-Bildung wird somit durch die Polarisation nach Bindung gemessen und der Polarisationsgrad ist proportional zur Konzentration des DNA-Protein-Komplexes.<sup>[350,381]</sup>

Die Polarisation  $P$  des emittierten Lichts wird anhand seiner Intensitäten  $I$  in zwei senkrecht zueinander liegenden Ebenen, z.B. vertikal und horizontal, gemessen:<sup>[350,381]</sup>

$$P = (I_{\text{vertikal}} - I_{\text{horizontal}}) / (I_{\text{vertikal}} + I_{\text{horizontal}})$$

Die in dieser Arbeit durchgeführten FP-Messungen wurden unter gleichen Bedingungen angesetzt. Aus Vorversuchen wurde eine DNA-Konzentration von 50 nM in 60–100 µL gewählt. Die Bindungsreaktionen erfolgten mit dsDNA mit fluoreszenzmarkiertem Gegenstrang (in jeweiligen Versuchen angegeben), 500 µM Cofaktoren (SAM oder Spaltprodukte AdoH und Methionin) und variierenden SPL-Konzentrationen in 50 mM HEPES, 30 mM NaCl und 5% Glycerol (pH 7,5). Die Konzentrationen deckten einen Bereich von mindestens zwei Größenordnungen ab (0 nM; 5/25 nM; 50 nM; 100 nM; 200 nM; 400 nM; 600 nM; 800 nM; 1 µM; 1,5 µM; 2 µM; 2,5 µM und für Messungen mit Zufallssequenz-dsDNA 0 nM; 50 nM; 100 nM; 250 nM; 500 nM; 1 µM; 2 µM; 3 µM; 4 µM; 5 µM; 6 µM und 8 µM). Die Ansätze wurden in einer schwarzen 96-Well-Platte (ausgelegt für Fluoreszenz-Assays) als Einzel- bis Dreifachmessung (abhängig von der verfügbaren Proteinmenge) angesetzt. Nach circa 90 min Inkubation im Dunkeln und bei Raumtemperatur, zur Einstellung des Bindungsgleichgewichts, wurde die Fluoreszenz-Polarisation im Tecan-Reader bestimmt. Dazu wurden die Proben jeweils mit einer Wellenlänge von 485 nm angeregt und die Polarisation bei einer Emissionswellenlänge von 535 nm detektiert (Einstellungen für Fluoreszenz). Für alle Messungen einer Platte wurde derselbe, optimale *Gain* verwendet und die Polarisation vor der Messung mit einem 0-nM-Ansatz kalibriert. Die Messungen erfolgten bei Raumtemperatur als Dreifachmessung. Um die Platte während der Messung anaerob zu halten, wurde sie nach dem Pipettieren in der Glove-Box mit einer nicht-polarisierenden Klebefolie (*ClearSealFilm*, Hampton Research) abgedichtet.

Die Software des Tecan-Readers gibt die Polarisation als mP in einem Excel-2007-Sheet wieder. Wie von dem Invitrogen-Manual für FP-Messungen vorgeschlagen wurden die Werte zunächst in ihre Anisotropie-Werte umgewandelt (in mA), da diese mathematische Vorteile bieten (leichter zu dekonvolvieren).<sup>[381]</sup>

$$A = (2 \times P) / (3 - P)$$

Zur besseren Veranschaulichung der gemessenen Anisotropie-Werte  $A$  wurden diese schließlich in den B-Wert, welcher der Konzentration der gebundenen DNA in nM entspricht, umgewandelt.<sup>[381]</sup>

$$B = c(\text{DNA}_{\text{total}}) \times (A - A_{\text{frei}}) / (A_{\text{gebunden}} - A_{\text{frei}})$$

Für die Werte von  $A_{\text{frei}}$  wurde die gemessene Anisotropie der 0-nM-Probe und für  $A_{\text{gebunden}}$  der größte gemessene Anisotropie-Wert verwendet.  $c(\text{DNA}_{\text{total}})$  entspricht der eingesetzten DNA-Konzentration.

In Origin 6.0 wurden nun die Mittelwerte der B-Werte mit ihrer Standardabweichung gegen die Proteinkonzentration geplottet und mit dem *Langmuir*-Isotherm gefittet. Da die Kurven jedoch nicht hyperbol, sondern sigmoidal verliefen, musste der Kooperativitäts-Faktor hinzugefügt werden. Dieser wird nach seinem Entdecker *Archibald Hill*<sup>[384]</sup> auch als *Hill*-Koeffizient  $n$  bezeichnet.<sup>[355]</sup>

$$B = c(\text{SPL})^n / (K_d^n + c(\text{SPL})^n) \times c(\text{DNA}_{\text{total}})$$

Als  $c(\text{DNA}_{\text{total}})$  wurden die eingesetzten 50 nM eingegeben. Aus der Fitkurve erhält man letztendlich den  $K_d$ -Wert und den *Hill*-Koeffizienten.

Zusätzlich kann *Gibbs* freie Energie der Bindung aus folgender Formel berechnet werden:<sup>[350]</sup>

$$\Delta G = RT \ln(K_d)$$

### **Kurze Anmerkung zur Fehlerrechnung**

In den meisten Analysen wurden drei Reaktionsansätze angesetzt und vermessen; teilweise nochmals als Dreifachmessung (FP-Messungen). Es wurden somit drei bis neun Werte für einen Datenpunkt erhalten. Von diesen Werten wurden wie üblich die Mittelwerte  $\bar{a}$  bestimmt. Die in Excel 2007 gegebene Formel zur Standardabweichung ist aber nur die Standardabweichung der Einzelmesswerte  $s$  von dem wahren Wert. Der Mittelwert ist natürlich näher am wahren Wert als die Einzelmesswerte (Anzahl  $n$ ) und besitzt deswegen eine eigene Standardabweichung  $m$ .<sup>[411]</sup>

$$m = s / \sqrt{n}$$

Das Ergebnis der Datenpunkte wurde daher als  $\bar{a} \pm m$  angegeben.

Als solche wurden die Datenpunkte gegen die variierende Messgröße aufgetragen. Um eine bestimmte, charakteristische Größe zu erhalten (wie z.B.  $K_d$ ) wurden die einzelnen Datenpunkte mit einer passenden Funktion gefittet. Origin 6.0 rechnet dabei die Fehler der einzelnen Datenpunkte mit ein. Als Wert der Güte des Fits wird von Origin das Bestimmtheitsmaß  $R^2$  für Fitkurven und die Signifikanz  $p$  für lineare Regression angegeben. Das Bestimmtheitsmaß spricht für eine gute Qualität des Fits wenn der Wert nahe an 1,0 liegt, der p-Wert wenn die Werte in etwa  $< 0,05$  sind (entspricht 5% signifikant).

Unter bestimmten Bedingungen konnten nur Messungen eines einzelnen Ansatzes durchgeführt werden. Dies war beispielsweise der Fall bei der Bestimmung von  $k_{cat}$ -Werten, da hier die Substratmenge ein limitierender Faktor war. Die Datenpunkte wurden also ohne Fehlerbalken aufgetragen und gefittet. Der angegebene Fehler wurde somit alleine aus der Fitfunktion bestimmt.

Wurde das Verhältnis von zwei oder mehreren Datenpunkten berechnet so mussten auch die Fehler entsprechend verrechnet werden. In diesem Fall stellt man eine Funktion  $R$  der Datenpunkte auf, z.B.  $R(a,b,c,...)$ .<sup>[411]</sup> Jeder Datenpunkt hat seinen eigenen Fehler  $\Delta a$ ,  $\Delta b$ ,  $\Delta c$ , ... Der Fehler der gesamten Funktion kann mittels folgender Formel bestimmt werden:<sup>[411]</sup>

$$\Delta R = \sqrt{\left(\frac{\partial R}{\partial a} \times \Delta a\right)^2 + \left(\frac{\partial R}{\partial b} \times \Delta b\right)^2 + \left(\frac{\partial R}{\partial c} \times \Delta c\right)^2 + \dots}$$

$\partial R/\partial a$ ,  $\partial R/\partial b$ , ... sind dabei die partiellen Ableitungen der Funktion  $R$  nach den jeweiligen Variablen  $a, b, \dots$

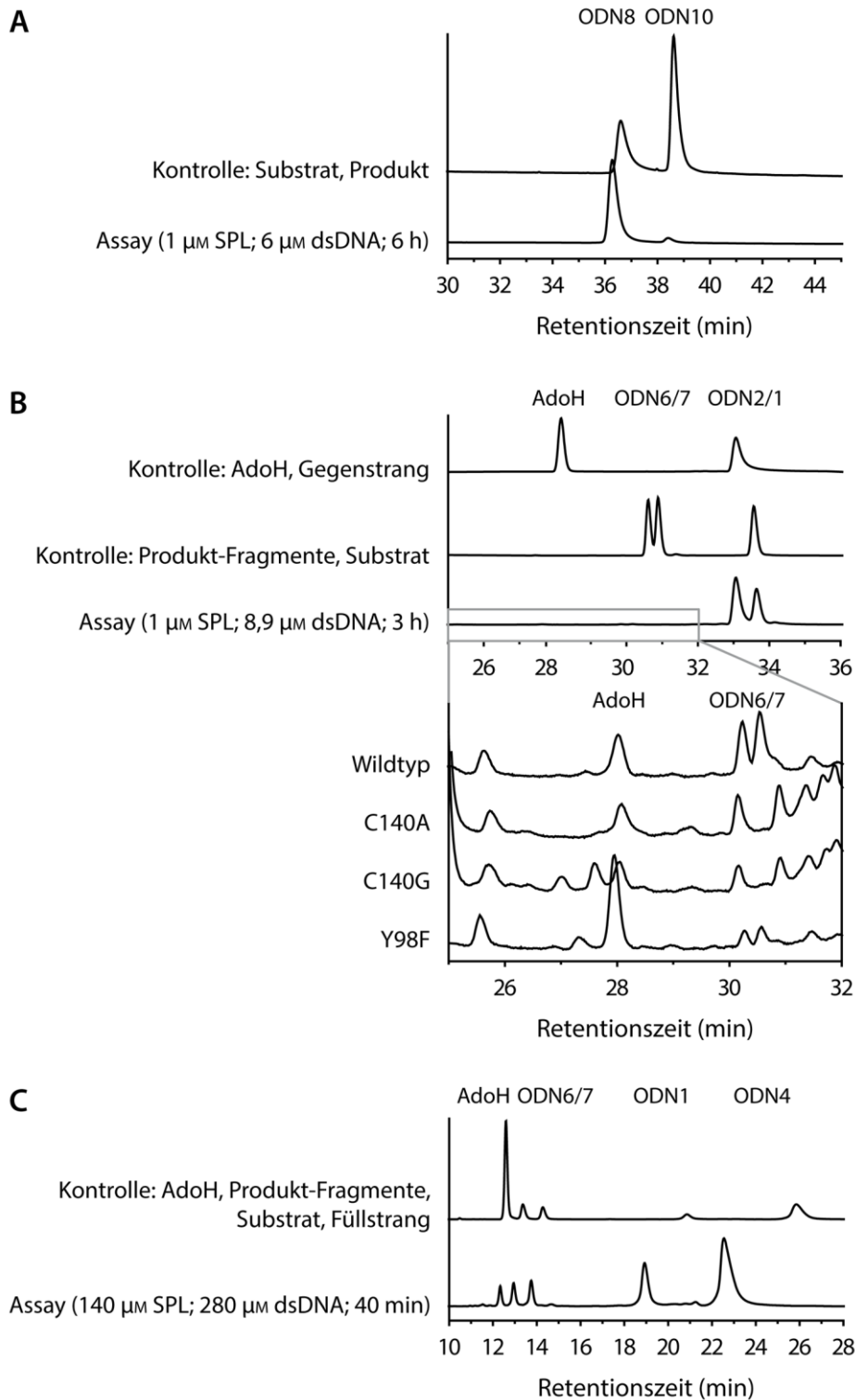




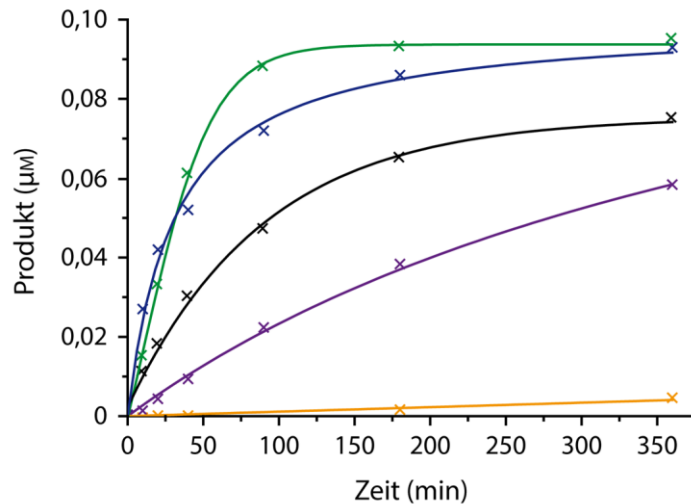
## Appendix

		SP-Bindestelle (o)				Cluster-Bindestelle (*)					
		oooo				* * *					
Geobacillus stearothermophilus	55	<b>RYRNAKST</b>	<b>LVV--GVRRT</b>	<b>LKFDSSKPSA</b>	<b>EYAIP-LATG</b>	<b>CMGHCH--YC</b>	<b>YLQTTLGSKP</b>	<b>YIRVYVNLDD</b>	117		
Geobacillus thermodenitrificans	55	<b>RYRNAKST</b>	<b>LVV--GVRRT</b>	<b>LKFDSSKPSA</b>	<b>EYAIP-LATG</b>	<b>CMGHCH--YC</b>	<b>YLQTTLGSKP</b>	<b>YIRVYVNLDD</b>	117		
Bacillus thuringiensis	55	<b>KYRNAKAT</b>	<b>LVV--GVRKT</b>	<b>LKFDTSKPSA</b>	<b>EYAIP-LATG</b>	<b>CMGHCH--YC</b>	<b>YLQTTLGSKP</b>	<b>YVRVYVNLDE</b>	117		
Bacillus anthracis	55	<b>KYRNAKAT</b>	<b>LVV--GVRKT</b>	<b>LKFDTSKPSA</b>	<b>EYAIP-LATG</b>	<b>CMGHCH--YC</b>	<b>YLQTTLGSKP</b>	<b>YVRVYVNLDE</b>	117		
Bacillus cereus	55	<b>KYRNAKAT</b>	<b>LVV--GVRKT</b>	<b>LKFDTSKPSA</b>	<b>EYAIP-LATG</b>	<b>CMGHCH--YC</b>	<b>YLQTTLGSKP</b>	<b>YVRVYVNLDE</b>	117		
Bacillus subtilis	56	<b>QYRNAKST</b>	<b>LVI--GVRKT</b>	<b>LKFDSSKPSA</b>	<b>EYAIP-FATG</b>	<b>CMGHCH--YC</b>	<b>YLQTTMGSKP</b>	<b>YIRTYVNVVEE</b>	118		
Clostridium acetobutylicum	53	<b>SFFEGKNT</b>	<b>LVV--GVRRE</b>	<b>LDFQTCCKPSA</b>	<b>NYQLP-IVSG</b>	<b>CAAMCE--YC</b>	<b>YLNTHGKKKP</b>	<b>YVKINVNLLDD</b>	115		
Clostridium perfringens	56	<b>FYKEGKST</b>	<b>IVV--GVKRV</b>	<b>GKFQSKCPSA</b>	<b>HWQLP-LLSG</b>	<b>CVGNCC--YC</b>	<b>YLNTHLGDKP</b>	<b>YVKINVNVED</b>	118		
Clostridium botulinum	54	<b>FYKEGKNT</b>	<b>LIV--GVKKG</b>	<b>GKFQSKCPSA</b>	<b>HYQLP-LLSG</b>	<b>CIHCHQ--YC</b>	<b>YLNTHLGDKP</b>	<b>YIKVNANIED</b>	116		
Clostridium difficile	54	<b>QYRSGKQT</b>	<b>MVV--GIRKS</b>	<b>LKFDTCCKPSA</b>	<b>NYQLP-LVSG</b>	<b>CMGRCE--YC</b>	<b>YLNTHLGDKP</b>	<b>FIRVFVNVD</b>	116		
Clostridium tetani	54	<b>FYRQKGKT</b>	<b>LVV--GIKKG</b>	<b>GKFQSKCPSA</b>	<b>HYQLP-LISG</b>	<b>CIQCCQ--YC</b>	<b>YLNTHLGDRP</b>	<b>YIKVNANIDD</b>	116		
Rickettsia rickettsii	12	-----	-----KT	<b>LHVRPNGRSA</b>	<b>DYITPNFMYG</b>	<b>CAGGCRNSYC</b>	<b>YVMHH--NYE</b>	<b>TLCINENIDQ</b>	59		
Cyanothece sp.	71	<b>IYRQAKTT</b>	<b>LAVVTAPSSS</b>	<b>LKLNVPVPSA</b>	<b>DWQFH-IAQG</b>	<b>CPAHCQ--YC</b>	<b>YLAGSLTGAP</b>	<b>LIRVYANLPE</b>	135		
		C140				Y96 Y98 L103					
Geobacillus stearothermophilus		<b>IFAAQKYID</b>	<b>ERAPEIT---</b>	-----RFEAA	<b>CTSDIVGIDH</b>	<b>LTHSLKKAIE</b>	<b>FIGATDYGRL</b>	<b>RFVTKYEHVD</b>	179		
Geobacillus thermodenitrificans		<b>IFAAQKYIN</b>	<b>ERAPEIT---</b>	-----RFEAA	<b>CTSDIVGIDH</b>	<b>LTHSLKKAIE</b>	<b>FIGATDYGRL</b>	<b>RFVTKYEHVD</b>	179		
Bacillus thuringiensis		<b>IFEKAQYMD</b>	<b>ERAPEIT---</b>	-----RFEAA	<b>CTSDIVGIDH</b>	<b>LTHALKRAIE</b>	<b>FIGESEYGR</b>	<b>RFVTKYSHVD</b>	179		
Bacillus anthracis		<b>IFEKAQYMD</b>	<b>ERAPEIT---</b>	-----RFEAA	<b>CTSDIVGIDH</b>	<b>LTHALKRAIE</b>	<b>FIGESEYGR</b>	<b>RFVTKYSHVD</b>	179		
Bacillus cereus		<b>IFEKAQYMD</b>	<b>ERAPEIT---</b>	-----RFEAA	<b>CTSDIVGIDH</b>	<b>LTHALKRAIE</b>	<b>FIGESEYGR</b>	<b>RFVTKYSHVD</b>	179		
Bacillus subtilis		<b>ILDQADKYM</b>	<b>ERAPEIT---</b>	-----RFEAS	<b>CTSDIVGIDH</b>	<b>LTHALKRAIE</b>	<b>HFGQSLGK</b>	<b>RFVTKYSHVD</b>	180		
Clostridium acetobutylicum		<b>ILSKAGEYIE</b>	<b>KRKPDI---</b>	-----VFEGA	<b>ATSDPVPVPER</b>	<b>YSGALKKAIE</b>	<b>YFGKNEYSRF</b>	<b>RFVTKYADIS</b>	177		
Clostridium perfringens		<b>ILNKAQYID</b>	<b>ERKPNIT---</b>	-----IFEGA	<b>ATSDPVPVPER</b>	<b>YNSLKKRAIE</b>	<b>FFANNDFAF</b>	<b>RFVTKYTDV</b>	180		
Clostridium botulinum		<b>ILNKAQYID</b>	<b>ERKPNIT---</b>	-----IFEGA	<b>ATSDPVPVPER</b>	<b>YNSLKKRAIE</b>	<b>FFGKSEHGR</b>	<b>RFVTKYNDID</b>	178		
Clostridium difficile		<b>ILEQTKKYE</b>	<b>DRKPQVT---</b>	-----IFEGA	<b>ATSDPVPVPER</b>	<b>YNSLKKRAIE</b>	<b>FFGKSEHGR</b>	<b>RFVTKYSDVD</b>	178		
Clostridium tetani		<b>ILCQAEKYIN</b>	<b>ERLPET---</b>	-----IFEGA	<b>ATSDPVPVPER</b>	<b>YVHSLARAIE</b>	<b>FFSKYDNGRF</b>	<b>RFVTKYNDVD</b>	178		
Rickettsia rickettsii		<b>ILDVLDKHIA</b>	<b>NLPTKISNQT</b>	<b>DSKYWTYDIG</b>	<b>CSTDVSLHWK</b>	<b>HTNWLK-IFN</b>	<b>FFKEDPRAKA</b>	<b>TFATKYVN-P</b>	127		
Cyanothece sp.		<b>ILNNLSSYCY</b>	<b>PNSD--T---</b>	-----SFEVS	<b>CYTDLPALEH</b>	<b>LTGSLSECI</b>	<b>YFGTMPAANL</b>	<b>RVVTKFDEIS</b>	195		
		potentielle Reduktionsmittel-Bindestelle (Δ)									
		o				Δ					
Geobacillus stearothermophilus		<b>HLLDAKHNGK</b>	<b>TRFRFSVNSR</b>	<b>YVINHFEPGT</b>	<b>SSFDARLQAA</b>	<b>RKVA-----</b>	<b>GAGYKLGFFV</b>	<b>APIYRHDGWE</b>	243		
Geobacillus thermodenitrificans		<b>HLLDARHNGK</b>	<b>TRFRFSINSR</b>	<b>YVINHFEPGT</b>	<b>SSFDGRLAAA</b>	<b>RKVA-----</b>	<b>GAGYKLGFFV</b>	<b>APIYRHGWE</b>	243		
Bacillus thuringiensis		<b>HLLDAKHNGK</b>	<b>TRFRFSINSR</b>	<b>SVIKNFEPGT</b>	<b>SPFEERIEAA</b>	<b>RKVA-----</b>	<b>GAGYPLGFIV</b>	<b>APLYMHGWE</b>	243		
Bacillus anthracis		<b>HLLDAKHNGK</b>	<b>TRFRFSINSR</b>	<b>SVIKNFEPGT</b>	<b>SPFEERIEAA</b>	<b>RKVA-----</b>	<b>GAGYPLGFIV</b>	<b>APLYMHGWE</b>	243		
Bacillus cereus		<b>HLLDAKHNGK</b>	<b>TRFRFSINSR</b>	<b>SVIKNFEPGT</b>	<b>SPFEERIEAA</b>	<b>RKVA-----</b>	<b>GAGYPLGFIV</b>	<b>APLYMHGWE</b>	243		
Bacillus subtilis		<b>HLLDAKHNGK</b>	<b>TRFRFSINAD</b>	<b>YVINHFEPGT</b>	<b>SPLDKRIEAA</b>	<b>VKVA-----</b>	<b>KAGYPLGFIV</b>	<b>APIYIHGWE</b>	244		
Clostridium acetobutylicum		<b>ELLAVQHNNH</b>	<b>TTIRFSINTP</b>	<b>RVIKNFEHRT</b>	<b>SLDEKRIEAA</b>	<b>YNIL-----</b>	<b>NSGYKTGFIV</b>	<b>GPVFLYENWK</b>	241		
Clostridium perfringens		<b>SLLGLDHNGK</b>	<b>TEVRFITNTD</b>	<b>FVINNYERRT</b>	<b>ASLCERIKAS</b>	<b>VKIA-----</b>	<b>KANYPLGFII</b>	<b>APVFIYEGWK</b>	244		
Clostridium botulinum		<b>ELLDIDHNEK</b>	<b>TEIRFTINTN</b>	<b>KVITDYEKRT</b>	<b>ASIKSRIDAS</b>	<b>AKIA-----</b>	<b>KAGYPVGFI</b>	<b>APVFIYDGWK</b>	242		
Clostridium difficile		<b>SLLDAKHNNH</b>	<b>TEIRFSINTP</b>	<b>RIINEHEHYT</b>	<b>ASANKRIEAA</b>	<b>VKLA-----</b>	<b>RAGYQIGFII</b>	<b>APVFLYEGWK</b>	242		
Clostridium tetani		<b>GLLNLVHNGN</b>	<b>TEIRFTLTND</b>	<b>KVINNEYEKT</b>	<b>ASMAKRIKAS</b>	<b>IKVA-----</b>	<b>KAGYPVGFI</b>	<b>APIFLYDNWK</b>	242		
Rickettsia rickettsii		<b>KLLNFPENK</b>	<b>IRIRFSLIPT</b>	<b>RMSEILAPKT</b>	<b>SPIIERIKAV</b>	<b>-----NIFI</b>	<b>EAGYEVHLNF</b>	<b>APIIAYEGWL</b>	191		
Cyanothece sp.		<b>PLISLPHNGQ</b>	<b>TRIRVSINAA</b>	<b>PVSRSEFAGT</b>	<b>ASVEARLKAL</b>	<b>RKHALPQSEG</b>	<b>GGGYRVGVVI</b>	<b>APIIMLIDNWQ</b>	265		
		o				R273 R280					
Geobacillus stearothermophilus		<b>QGYFELFQEL</b>	<b>ARQLEGVDLS</b>	<b>DLTFELI--Q</b>	<b>HRFTKPAKRV</b>	<b>IEQRYPKTKL</b>	<b>DLDESKRKYK</b>	<b>WGRYGIGKYV</b>	311		
Geobacillus thermodenitrificans		<b>RGYFELFQEL</b>	<b>ARQLEGMDLS</b>	<b>DLTFELI--Q</b>	<b>HRFTKPAKRV</b>	<b>IEQRYPKTKL</b>	<b>DLDETKRKYK</b>	<b>WGRYGIGKYV</b>	311		
Bacillus thuringiensis		<b>EGYRELFERL</b>	<b>YNALKDLSIP</b>	<b>NLTFELI--Q</b>	<b>HRFTKPAKRV</b>	<b>IEQRYPKTKL</b>	<b>EMDEEKRKYK</b>	<b>WGRYGIGKYV</b>	311		
Bacillus anthracis		<b>EGYRELFERL</b>	<b>YNALKDLSIP</b>	<b>NLTFELI--Q</b>	<b>HRFTKPAKRV</b>	<b>IEQRYPKTKL</b>	<b>EMDEEKRKYK</b>	<b>WGRYGIGKYV</b>	311		
Bacillus cereus		<b>EGYRELFERL</b>	<b>YNALKDLSIP</b>	<b>NLTFELI--Q</b>	<b>HRFTKPAKRV</b>	<b>IEQRYPKTKL</b>	<b>EMDEEKRKYK</b>	<b>WGRYGIGKYV</b>	311		
Bacillus subtilis		<b>EGYRHLFEKL</b>	<b>DAALPQDVHR</b>	<b>DITFELI--Q</b>	<b>HRFTKPAKRV</b>	<b>IEKNYPKTKL</b>	<b>ELDEEKRRYK</b>	<b>WGRYGIGKYI</b>	312		
Clostridium acetobutylicum		<b>KEYEELKKKA</b>	<b>SDKLG--DK</b>	<b>ELEFEI--S</b>	<b>HRFTTSKAKN</b>	<b>ILKVFPNTKL</b>	<b>PMDDEARKFK</b>	<b>FGQFGYGYKV</b>	306		
Clostridium perfringens		<b>EDYENLLKDL</b>	<b>KEKLPQDLKH</b>	<b>KLTFEVI--S</b>	<b>HRFTTRAKNI</b>	<b>IMDIFPDNKL</b>	<b>PMDDEKRTFK</b>	<b>YGQFGYGYKV</b>	312		
Clostridium botulinum		<b>KDYENLLIDL</b>	<b>KSNLPSDQKH</b>	<b>PFTFEVI--S</b>	<b>HRFTTRAKNI</b>	<b>ISEVFPDNTL</b>	<b>PMNDEDRTYK</b>	<b>YGQFGYGYKV</b>	310		
Clostridium difficile		<b>EYKKNLIRS</b>	<b>KEALPKDFDK</b>	<b>KIIFEVI--S</b>	<b>HRFTTRAKNR</b>	<b>ILEIYPTDLL</b>	<b>PMNEDERKFK</b>	<b>YGQFGYGYKV</b>	310		
Clostridium tetani		<b>EDYRELLKLL</b>	<b>HEEIPKDLKY</b>	<b>PLIFEVI--S</b>	<b>HRFTTRAKNI</b>	<b>ILEVFPQTTL</b>	<b>PMNDEERKFK</b>	<b>YGQFGYGYKV</b>	310		
Rickettsia rickettsii		<b>TEYAKLFEDL</b>	<b>AQYINNQYKP</b>	<b>FIIKAECIFLT</b>	<b>HNDKQHERNI</b>	<b>ALNRLSEAL</b>	-----	-----	242		
Cyanothece sp.		<b>LHYRRLFEQI</b>	<b>EKAL--DFEC</b>	<b>DLTFELI--T</b>	<b>HRFTAKSKEV</b>	<b>ILQWYPKTKL</b>	<b>DLDEKGRSVK</b>	<b>YNKFGGTYKV</b>	331		
		5. Cys (B.st.)				Y339					
Geobacillus stearothermophilus		<b>YRDKAEARELE</b>	<b>ETMCSYIARF</b>	<b>FPSAQVQYFT</b>	*	342					
Geobacillus thermodenitrificans		<b>YRDEEAKLELE</b>	<b>DTMRRYIEQF</b>	<b>FPGAYVQYFT</b>	*	342					
Bacillus thuringiensis		<b>YKKDEAAVLE</b>	<b>ETIRGYINEF</b>	<b>FPNAEIQYFT</b>	-	341					
Bacillus anthracis		<b>YKKDDAEVLE</b>	<b>ETIRGYIYEF</b>	<b>FPDAEIQYFT</b>	-	341					
Bacillus cereus		<b>YKKDEAAVLE</b>	<b>ETIRGYINEF</b>	<b>FPNAEIQYFT</b>	-	341					
Bacillus subtilis		<b>YQKDEEHALR</b>	<b>EALSYIDTF</b>	<b>FPNAKIEYFT</b>	-	342					
Clostridium acetobutylicum		<b>YDKDDMQEIK</b>	<b>EFFINNINLY</b>	<b>FNKATIKYII</b>	-	336					
Clostridium perfringens		<b>YKKEDIHEIK</b>	<b>EFFMEIDKY</b>	<b>FPMSIKYII</b>	-	342					
Clostridium botulinum		<b>YKKQELTDIK</b>	<b>EFFTKTINMH</b>	<b>FPKSDIMYII</b>	-	340					
Clostridium difficile		<b>YDKQELDDMK</b>	<b>EFFHKEINGV</b>	<b>FNKSLIKYII</b>	-	340					
Clostridium tetani		<b>YTKEQLHDIK</b>	<b>YFFTEIESI</b>	<b>FENKI IKYII</b>	-	340					
Rickettsia rickettsii		<b>WQPN-----</b>	<b>YFFTEIESI</b>	<b>-----YTG</b>	k	250					
Cyanothece sp.		<b>YLAEQMKMMK</b>	<b>QFFTEEIAQR</b>	<b>FPSSQLLWYT</b>	-	361					

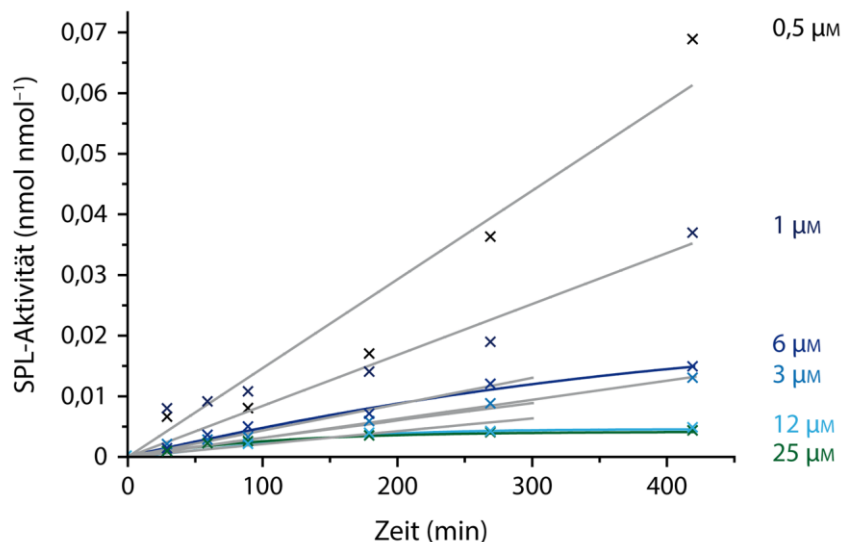
**Appendix 1:** Aminosäure-Sequenz-Vergleich von bereits isolierten und potentiellen SP-Lyasen. Die Sequenzen beginnen nach dem N-Terminus. Die Konservierung ist als Übergang von Blau (gering konserviert) zu Rot (hoch konserviert) dargestellt. Das Alignment wurde mit dem CLC Sequence Viewer 6 erstellt.



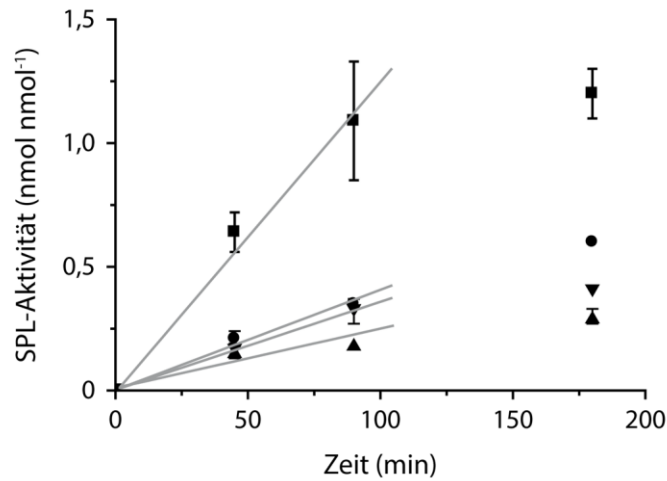
**Appendix 2:** Repräsentative HPL-Chromatogramme der Reparatur-Assays mit fluoreszenzmarkierten DNA-Substraten **(A)** und nicht-markierten DNA-Substraten **(B, C)**. **(C)** unterscheidet sich von **(B)** in dem Elutions-Gradienten des HPLC-Laufs, welcher für die Detektion des 39mer-Ansatzes optimiert wurde. Teilweise verschoben sich die Retentionszeiten in den Kontroll-Läufen zu den Assay-Läufen um wenige Sekunden bis Minuten. Je mehr Läufe zwischen den beiden Gezeigten lagen, desto weiter die Verschiebung. Vor allem in **(C)** erfolgte eine drastische Verschiebung von bis zu 4 min. Vermutlich ist der hier verwendete isokratische Gradient anfälliger für derartige Verschiebungen. Die Identität der Peaks wurde anhand ihrer PDA-Spektren überprüft. In **(B)** mussten die Spektren zur Auswertung stark gezoomt werden. In den Assays wurde ein Volumen entsprechend 2–60 pmol **(A)** beziehungsweise 250–1.000 pmol **(B, C)** Gesamt-DNA-Gehalt in die HPLC injiziert. Gradienten der HPLC-Läufe sind in *Kapitel 4.6* beschrieben.



**Appendix 3:** Zeitaufgelöste Reaktionen mit 0,1  $\mu\text{M}$  dsDNA von *B.st.* –SPL Wildtyp (**Schwarz**), C140A (**Grün**), Y98F (**Violett**), C140G (**Orange**) und *G.tn.* –SPL Wildtyp (**Blau**). Die Zeiträume der linearen Anfangsgeschwindigkeiten lag zwischen 60 min und 3 h für *B.st.* –SPL und bis zu 50 min für *G.tn.* –SPL. Reaktionsbedingungen: 1  $\mu\text{M}$  SPL; 0,1  $\mu\text{M}$  dsDNA (SP-15mer-Fluo ODN8/9); 1 mM SAM; 1 mM Dithionit in 50 mM HEPES; 50 mM NaCl und 5% Glycerol (pH 7,5) bei 35 °C. Aliquots wurden nach 10 min; 20 min; 40 min; 1,5 h; 3 h und 6 h entnommen zur Messungen an der HPLC. Zur Veranschaulichung wurden die Datenpunkte mit der *Hill*-Funktion ( $n = 1$ ) gefittet, weil diese die Daten am besten anglich.



**Appendix 4:** Zeitaufgelöste Reaktionen der *B.st.* –SPL C140G zur Bestimmung des  $K_m$ -Wertes. Der Zeiträume der linearen Anfangsgeschwindigkeiten lag zwischen 100 min und 400 min. Die linearen Bereiche wurden mit einer linearen Regression gefittet (**Grau**) und nicht lineare Kurven wurden zur Veranschaulichung mit der *Hill*-Funktion gefittet (farbig), da diese die Daten am besten anglich. Die p-Werte der linearen Regressionen lagen bei  $< 0,0003$  außer beim 12- $\mu\text{M}$ -Wert, bei dem er 0,0035 betrug. Die Geschwindigkeiten der einzelnen Reaktionen wurden bestimmt zu 0,00015  $\text{nmol nmol}^{-1}$  (0,5  $\mu\text{M}$ ); 0,000084  $\text{nmol nmol}^{-1}$  (1  $\mu\text{M}$ ); 0,000032  $\text{nmol nmol}^{-1}$  (3  $\mu\text{M}$ ); 0,000044  $\text{nmol nmol}^{-1}$  (6  $\mu\text{M}$ ); 0,000029  $\text{nmol nmol}^{-1}$  (12  $\mu\text{M}$ ) und 0,000021  $\text{nmol nmol}^{-1}$ . Reaktionsbedingungen: 1  $\mu\text{M}$  SPL, dsDNA (SP-15mer-Fluo ODN8/9), 1 mM SAM, 1 mM Dithionit in 50 mM HEPES, 50 mM NaCl und 5% Glycerol (pH 7,5) bei 35 °C für 30 min; 1 h; 1,5 h; 3 h; 4,5 h und 7 h.



**Appendix 5:** Bestimmung der  $k_{cat,app}$ -Werte bei  $10 \times wtK_m$  von *B.st.* –SPL Wildtyp (■), C140A(●), Y98F(▲) und C140G (▼). Reaktionsbedingungen: 1  $\mu$ M SPL; 8,9  $\mu$ M dsDNA (SP-13mer ODN1/2); 1 mM SAM; 1 mM Dithionit in 50 mM HEPES; 50 mM NaCl und 5% Glycerol (pH 7,5) bei 35 °C. Aliquots wurden bei 45 min, 90 min, 3 h und nach über-Nacht-Reaktion entnommen und auf der HPLC analysiert. p-Werte der linearen Regression durch die ersten beiden Datenpunkte lagen bei 0,0002 (C140G); 0,004 (C140A); 0,0046 (Wildtyp) und 0,085 (Y98F). Aus den Werten der über-Nacht-Reaktion wurden die SP/AdoH-Verhältnisse bestimmt: Wildtyp:  $7,3 \pm 0,3$  nmol nmol<sup>-1</sup> SP und  $0,96 \pm 0,03$  nmol nmol<sup>-1</sup> AdoH; C140A:  $2,8 \pm 0,4$  nmol nmol<sup>-1</sup> SP und  $4,5 \pm 0,5$  nmol nmol<sup>-1</sup> AdoH; Y98F:  $2,6 \pm 0,1$  nmol nmol<sup>-1</sup> SP und  $8,4 \pm 0,5$  nmol nmol<sup>-1</sup> AdoH; C140G:  $5,0 \pm 0,8$  nmol nmol<sup>-1</sup> und  $0,4 \pm 0,1$  nmol nmol<sup>-1</sup> AdoH.

Protein	SAM		AdoH & Met		AdoH		Met		kein Cofaktor	
	+	–	+	–	+	–	+	–	+	–
<i>B.st.</i> –Wildtyp	1,7 ± 0,1	2,1 ± 0,3	2,7 ± 0,4	1,9 ± 0,2	2,5 ± 0,1	2,3 ± 0,1	2,3 ± 0,1	2,1 ± 0,1	2,0 ± 0,1	2,2 ± 0,2
<i>B.st.</i> –C140A	2,0 ± 0,1	2,1 ± 0,1	2,9 ± 0,2	1,9 ± 0,1	–	–	–	–	–	–
<i>B.st.</i> –Y98F	2,9 ± 0,2	3,3 ± 0,2	2,9 ± 0,1	4,5 ± 0,4	–	–	–	–	–	–
<i>G.tn.</i> –Wildtyp	2,9 ± 0,3	2,1 ± 0,1	5,2 ± 0,6	4,1 ± 0,3	–	–	–	–	–	–
<i>G.tn.</i> –Wildtyp SP-39mer	2,4 ± 0,3	2,1 ± 0,3	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>G.tn.</i> –Y98F	2,3 ± 0,3	3,4 ± 0,4	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>G.tn.</i> –L103G	3,2 ± 0,3	4,3 ± 0,6	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>G.tn.</i> –R273A	8,2 ± 0,6	3,0 ± 0,2	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>G.tn.</i> –R280A	7,5 ± 0,1	20,5 ± 3,6	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>G.tn.</i> –K301A	2,2 ± 0,1	2,2 ± 0,1	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>G.tn.</i> –R304A	1,6 ± 0,1	1,4 ± 0,1	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>G.tn.</i> –Y305F	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>G.tn.</i> –K309A	1,3 ± 0,2	1,1 ± 0,2	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>G.tn.</i> –Y339F	1,8 ± 0,1	3,3 ± 0,3	–	–	–	–	–	–	–	–

**Appendix 6:** Hill-Koeffizienten der gemessenen Dissoziationskonstanten. Die Messungen erfolgten mit oder ohne SAM beziehungsweise seinen Spaltprodukten AdoH und Methionin (Met), mit SP-13mer-dsDNA (ODN1/12) oder TT-13mer-dsDNA (ODN13/12) oder SP-39mer-dsDNA (ODN1/4/5).

Protein	$V_{\max}/2$ ( $10^{-4} \text{ min}^{-1}$ ) SP-dsDNA	$V_{\max}/2$ ( $10^{-4} \text{ min}^{-1}$ ) SP-ssDNA	Aktivitätsvergleich (ssDNA/dsDNA)
<i>G.tn.</i> –Wildtyp	$3,7 \pm 0,5$	$144 \pm 4,1$	$1,0 \pm 0,2$
<i>G.tn.</i> –Y98F	$2,6 \pm 0,4$	$0,5 \pm 0,1$	$0,0048 \pm 0,0014$
<i>G.tn.</i> –L103G	$1,3 \pm 0,2$	$0,5 \pm 0,3$	$0,010 \pm 0,006$
<i>G.tn.</i> –R273A	$23,7 \pm 2,0$	$2790 \pm 227$	$3,0 \pm 0,6$
<i>G.tn.</i> –R280A	$4,4 \pm 0,3$	$46,2 \pm 2,2$	$0,27 \pm 0,04$
<i>G.tn.</i> –K301A	$1,9 \pm 0,6$	$63,6 \pm 2,1$	$0,9 \pm 0,3$
<i>G.tn.</i> –R304A	$2,9 \pm 0,2$	$32,2 \pm 0,5$	$0,28 \pm 0,04$
<i>G.tn.</i> –Y305F	$1,8 \pm 1,2$	$2,9 \pm 0,9$	$0,04 \pm 0,03$
<i>G.tn.</i> –K309A	$26,2 \pm 1,7$	$601,0 \pm 12,0$	$0,6 \pm 0,1$
<i>G.tn.</i> –Y339F	$0,6 \pm 0,2$	$1,0 \pm 0,4$	$0,04 \pm 0,02$

**Appendix 7:** Aktivitäts-Messungen der SPL-Flipp-Mutanten mit Wildtyp und Y98F als Kontrolle. Es wurde die relative Aktivität als Aktivitätsvergleich zwischen ssDNA und dsDNA bestimmt. Reaktionsbedingungen: 1  $\mu\text{M}$  SPL, 1 mM SAM, 2  $\mu\text{M}$  dsDNA (ODN8/9) oder ssDNA (ODN8) (entspricht  $K_m$ -Wert), 1 mM Dithionit in 50 mM HEPES, 200 mM NaCl und 5% Glycerol (pH 7,5) bei 35 °C. Das Protein wurde jeweils 40 min mit Dithionit reduziert und die Reaktion schließlich durch Zugabe von SAM und DNA initiiert. Aliquots wurden nach 20 min, 40 min und 60 min entnommen und auf der HPLC analysiert. Die Datenpunkte wurden anschließend geplottet und der lineare Bereich (meist über die gesamten 60 min) mit einer linearen Regression gefittet. Nur bei zwei Mutanten (R273A, K309A) lag der lineare Bereich für SP-DNA in den ersten 30 min. Die Daten wurden folglich mit der *Hill*-Funktion gefittet und die linearen Bereiche der Kurven mit der linearen Regression angepasst. Die p-Werte der linearen Regressionen lagen für dsDNA in den Bereichen 0,002–0,008 (R273A, R280A, K309A, R304A, Y305F); 0,022–0,026 (Wildtyp, Y98F, L103G) und 0,18–0,23 (K301A, Y339F). Die p-Werte für ssDNA lagen in den Bereichen < 0,0001–0,0003 (Wildtyp, K301A, R304A); 0,0013–0,0027 (R280A, R273A); 0,02 (K309A) und 0,28–0,91 (Y98F, L103G, Y305F, Y339F, K309A).



## Abkürzungsverzeichnis

### *Einheiten*

%	Prozent; $10^{-2}$ , „ein Hundertstel“
°	Grad
°C	Grad <i>Celsius</i>
Å	Ångström
a.u.	Absorptions-Einheit (engl.: <i>absorption unit</i> )
bp	Basenpaare
Da	Dalton = $\text{g mol}^{-1}$
dB	Dezibel
deg	Grad (engl.: <i>degree</i> )
g	Gramm
h	Stunde(n)
Hz	1 Hertz = $\text{s}^{-1}$
J	Joule
K	Kelvin
kb	<u>Kilob</u> asen
L	Liter
M	Molar = $\text{mol L}^{-1}$
m	Meter
min	Minute(n)
mol	Mol
ppm	$10^{-6}$ , „Teile von einer Million“ (engl.: <i>parts per million</i> )
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl.: <i>revolutions per minute</i> )
s oder sec	Sekunde(n)
T	Tesla
U	Enzymeinheiten (engl.: <i>units</i> )
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen

### ***Vorsätze von Einheiten***

$\mu$	Mikro; $10^{-6}$
c	Centi; $10^{-2}$
d	Dezi; $10^{-1}$
G	Giga; $10^9$
k	Kilo; $10^3$
m	Milli; $10^{-3}$
n	Nano; $10^{-9}$

### ***Größen***

$\mu_B$	Bohr'sches Magneton
$\infty$	Unendlich
$B$	magnetische Feldstärke in EPR-Messungen
$B$	DNA-Protein-Komplex-Konzentration in Fluoreszenz-Polarisations-Messungen
$c$	Konzentration
$h$	Planck-Konstante $6,6261 \times 10^{-34}$ J s
$HT$	Hochspannung (engl.: <i>high tension</i> )
$k_{cat}$	Wechselzahl des Enzym-Umsatzes
$k_{cat,app}$	apparente Wechselzahl
$k_{cat}/K_m$	katalytische Effizienz
$K_d$	Dissoziationskonstante
$K_m$	<i>Michaelis-Menten</i> -Konstante als Maß der Substrataffinität eines Enzyms
$n$	Hill-Koeffizient
$OD_{600}$	Optische Dichte bei der Wellenlänge $\lambda = 600$ nm
$pK_s$	Säurekonstante
$R$	Gaskonstante $8,3145$ J K $^{-1}$ mol $^{-1}$
$R^2$	Maß der Güte eines Fits; je näher an 1,0 desto besser der Fit
$T$	Temperatur
$T_M$	Schmelztemperatur
$V_{max}$	Maximal-Geschwindigkeit
$V_{max,kal}$	berechnete Maximal-Geschwindigkeit
$\lambda$	Wellenlänge
$\lambda_{Abs}$	Absorptionswellenlänge
$\lambda_{Em}$	Emmisionswellenlänge
$\nu$	Mikrowellen-Frequenz



### **Organismen**

A.	<i>Anacystis</i>
B.	<i>Bacillus</i>
B.s.	<i>Bacillus subtilis</i>
B.st.	<i>Geobacillus stearothermophilus</i> aufgrund der früheren Bezeichnung als <u><i>Bacillus stearothermophilus</i></u>
C.	<i>Clostridium</i>
E.	<i>Escherichia</i>
G.	<i>Geobacillus</i>
G.tn.	<u><i>Geobacillus thermodenitrificans</i></u>
M.	<i>Methanosacina</i>
wt	Wildtyp

### **Aminosäuren**

A, Ala	Alanin
C, Cys	Cystein
F, Phe	Phenylalanin
G, Gly	Glycin
H, His	Histidin
K, Lys	Lysin
L, Leu	Leucin
M, Met	Methionin
R, Arg	Arginin
W, Trp	Tryptophan
x	beliebige Aminosäure
Y, Tyr	Tyrosin
φ	aromatische Aminosäure

### **Nukleoside**

dA	2'-Desoxyadenosin
dC	2'-Desoxycytidin
dG	2'-Desoxyguanosin
dT	2'-Desoxythymidin

## Sonstige Abkürzungen

1D/2D/3D	ein-, zwei- und dreidimensional
8-HDF	<u>8</u> -Hydroxy-5-Desazariboflavin
AC	<u>A</u> ffinitäts-Chromatographie
ACP	3- <u>A</u> mino-3- <u>C</u> arboxypropin
AdoH/Ado <sup>•</sup>	5'-Desoxyadenosin / -Radikal
AE	<u>A</u> ktivierungsenzym
AGT	<u>A</u> lkyguanin-DNA-Alkyltransferasen
AlbA	Radikal-SAM-Enzym, welches an der Biosynthese von Subtilosin A beteiligt ist
Apo-SPL	SP-Lyase ohne Cofaktor oder Substrat
APS	<u>A</u> mmoniumpersulfat
<i>B.st.</i> –SPL	SP-Lyase aus <i>Geobacillus stearothermophilus</i>
BER	<u>B</u> asen- <u>E</u> xzisions- <u>R</u> eparatur
BioB	Biotin Synthase
BLAST	Algorithmen zur Analyse von Sequenzdaten (engl.: <i>basic local alignment search tool</i> )
BSA	<u>B</u> ovines <u>S</u> erum <u>a</u> lbumin
C	in C-Terminus: <u>C</u> arboxy (-COOH)
CD	<u>C</u> ircular <u>D</u> ichroismus
CoA	<u>C</u> oenzym <u>A</u>
CPD	<u>C</u> yclobutan- <u>P</u> yrimidin- <u>D</u> imer
cwEPR	<u>C</u> ontinuous- <u>W</u> ave-EPR
ddH <sub>2</sub> O	<u>d</u> oppel- <u>d</u> estilliertes Wasser
DFT	<u>D</u> ichtefunktionaltheorie
DMPD	<i>N,N</i> - <u>D</u> imethyl- <i>p</i> - <u>P</u> henylend <u>a</u> min
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl.: <i>deoxyribonucleic acid</i> )
DNase	<u>D</u> esoxyribonuklease
dNTP	<u>D</u> esoxy- <u>N</u> ukleosidtriphosphate
DPA	Dipicolinsäure (engl.: <i>dipicolinic acid</i> )
dsDNA	<u>d</u> oppelsträngige DNA
DTT	<u>D</u> ithiothreitol
EDTA	<u>E</u> thylendiamintetraacetat
EM	<u>E</u> lektronenmikroskopie
ENDOR	Methode verwendet in der EPR-Spektroskopie (engl.: <i>electron nuclear double resonance</i> )

engl.	<u>E</u> nglisch
EPR	<u>E</u> lektronen- <u>P</u> aramagnetische- <u>R</u> esonanz; auch bekannt als <u>E</u> lektronen- <u>S</u> pin- <u>R</u> esonanz (ESR)
ES	<u>E</u> nzym- <u>S</u> ubstrat(-Komplex)
FAD	<u>F</u> lavin- <u>A</u> denin- <u>D</u> inukleotid
Ferene	3-(2-Pyridyl)-5,6-Di(2-Furyl)-1,2,4-Triazin-5',5''-Disulfonsäure-Dinatrium-Salz
FP	<u>F</u> luoreszenz- <u>P</u> olarisation
Fpg	<u>F</u> ormamidopyrimidin-DNA- <u>G</u> lykosylase
<i>G.tn.</i> –SPL	SP-Lyase aus <i>Geobacillus thermodenitrificans</i>
HEPES	Puffersubstanz: 2-(4-(2- <u>H</u> ydroxylethyl)-1- <u>P</u> iperazinyl)- <u>E</u> thansulfonsäure
His <sub>6</sub>	Affinitäts- <i>Tag</i> bestehend aus sechs Histidinen
HyDE	[FeFe]-Hydrogenase Maturase Protein
IC <sub>50</sub>	mittlere inhibitorische Konzentration
<i>in vitro</i>	lateinisch: „im Glas“
<i>in vivo</i>	Lateinisch: „im Lebendigen“
IPTG	<u>I</u> sopropyl-β-D- <u>T</u> hiogalaktopyranosid
IR	<u>I</u> nfrarot
LAM	<u>L</u> ysin-2,3- <u>A</u> minomutase
LB	Wachstumsmedium für Bakterien: <i><u>L</u>uria-<u>B</u>ertani</i>
LipA	Lipoyl Synthase
LIST	Modell zur Erklärung des kinetischen Kooperativitäts-Effekts beruhend auf langsamen strukturellen Änderungen im Enzym (engl.: <i><u>l</u>igand induced <u>s</u>low <u>t</u>ransition</i> )
-mer	von griechisch <i><u>m</u>eros</i> = Teil
MRW	Mittleres Molekulargewicht der Aminosäure-Reste eines Proteins (engl.: <i><u>m</u>ean <u>r</u>esidue <u>w</u>eight</i> )
MTA	5'- <u>M</u> ethylthioadenosin
MTAN	5'- <u>M</u> ethylthioadenosin / <i>S</i> - <u>A</u> denosylhomocystein <u>N</u> ukleosidase
MTHF	<u>M</u> ethenyltetrahydrofolat
N	in N-Terminus: Amino (-NH <sub>2</sub> )
NCBI	Nationales Zentrum für Biotechnologieinformation in Bethesda, USA (engl.: <i><u>N</u>ational <u>C</u>enter for <u>B</u>io<u>t</u>echnology <u>I</u>nformation</i> )
NER	<u>N</u> ukleotid- <u>E</u> xzisions- <u>R</u> eparatur
NMR	Kernspinresonanz (engl.: <i><u>n</u>uclear <u>m</u>agnetic <u>r</u>esonance</i> )
ODN	<u>O</u> ligo-2'- <u>D</u> esoxynukleotide
PAGE	<u>P</u> olyacrylamid- <u>G</u> el- <u>E</u> lektrophorese

PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion (engl.: <i>polymerase chain reaction</i> )
PDA	<u>Photo</u> dioden- <u>A</u> rray; Detektor der HPLC
PDB	<u>P</u> rotein- <u>D</u> aten <u>b</u> ank-Code für Proteinstrukturen
PFL	<u>P</u> yruvat- <u>F</u> ormat- <u>L</u> yase
QM/MM	<u>Q</u> uantum- <u>M</u> echanische / <u>M</u> olekular- <u>M</u> echanische Rechnungen
RBS	<u>R</u> ibosomen- <u>B</u> indungs <u>s</u> telle
RECQ1	Enzym-Familie von Helikase
RNA	Ribonukleinsäure (engl.: <i>ribonucleic acid</i> )
ROS1	Ein Mitglied der 5'-Methylcytosin-Glykosylasen; der Name stammt von seiner Funktion als Proto-Onkogen (engl.: <i>repressor of silencing 1</i> )
RP-HPLC	Umkehrphasen-Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie (engl.: <i>reversed phase high performance liquid chromatography</i> )
SAM	<u>S</u> - <u>A</u> denosyl <u>m</u> ethionin
SASP	kleine säurelösliche Proteine in bakteriellen Sporen (engl.: <i>small acid soluble proteins</i> )
SDS	Natrium-Dodecyl-Sulfat (engl.: <i>sodium dodecyl sulfate</i> )
SOC	Nährstoffreiches Wachstumsmedium für Bakterien (engl.: <i>super optimal broth with catabolite repression</i> )
SP	<u>S</u> poren- <u>P</u> hotoprodukt; 5-( $\alpha$ -ThyminyI)-5,6-dihydrothymine
SPL	<u>S</u> poren- <u>P</u> hotoprodukt- <u>L</u> yase
ssDNA	einzelsträngige DNA (engl.: <i>single stranded DNA</i> )
SspC	Säurelösliches Sporenprotein C (engl.: <i>acid-soluble spore protein C</i> )
TAE	Puffer: <u>T</u> ris- <u>A</u> cetate- <u>E</u> DTA
TCEP	<u>T</u> ris(2- <u>C</u> hloro <u>e</u> thyl) <u>P</u> hosphat
TEMED	<u>T</u> etra <u>m</u> ethylethylendi <u>a</u> min
TEV	gemeint ist die TEV-Protease aus dem <i>Tobacco Etch Virus</i>
ThiC	Thiamin-Biosynthese Protein
TIM	Strukturmotiv aus der <u>T</u> riosephosphat- <u>I</u> somerase
TpT	Dithymin-Monophosphat
TT	reparierte Sequenz des Sporen-Photoprodukts; ungeschädigte Stränge mit derselben Sequenz eines SP-Stranges werden als TT-Stränge bezeichnet
UV	<u>U</u> ltraviolett; meist in Zusammenhang mit –Licht oder –Strahlung
UV-Vis	Spektroskopie im <u>u</u> ltraviolett und sichtbaren (engl.: <i>visible</i> ) Bereich
VE	<u>v</u> oll <u>e</u> ntsalzt
YwjD	UV-Schadens-Endonuklease

## Literaturverzeichnis

- [1] M. W. Thompson, *The killer strain, anthrax and a government exposed*, HarperCollins, New York, **2003**.
- [2] M. Mock, A. Fouet, *Annu. Rev. Microbiol.* **2001**, 55, 647–671. *Anthrax*.
- [3] P. Setlow, *Curr. Opin. Microbiol.* **2003**, 6, 550–556. *Spore germination*.
- [4] C. Desnous, D. Guillaume, P. Clivio, *Chem. Rev.* **2010**, 110, 1213–1232. *Spore photoproduct: A key to bacterial eternal life*.
- [5] J. E. Donnellan, Jr., R. B. Setlow, *Science* **1965**, 149, 308–310. *Thymine photoproducts but not thymine dimers found in ultraviolet-irradiated bacterial spores*.
- [6] N. Munakata, C. S. Rupert, *Mol. Gen. Genet.* **1974**, 130, 239–250. *Dark repair of DNA containing "spore photoproduct" in Bacillus subtilis*.
- [7] J. Cheek, J. B. Broderick, *J. Biol. Inorg. Chem.* **2001**, 6, 209–226. *Adenosylmethionine-dependent iron-sulfur enzymes: Versatile clusters in a radical new role*.
- [8] A. Benjdia, K. Heil, T. R. Barends, T. Carell, I. Schlichting, *Nucleic Acids Res.* **2012**, 40, 9308–9318. *Structural insights into recognition and repair of UV-DNA damage by spore photoproduct lyase, a radical SAM enzyme*.
- [9] R. Rebeil, W. L. Nicholson, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2001**, 98, 9038–9043. *The subunit structure and catalytic mechanism of the Bacillus subtilis DNA repair enzyme spore photoproduct lyase*.
- [10] J. Cheek, J. B. Broderick, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 2860–2861. *Direct H atom abstraction from spore photoproduct C-6 initiates DNA repair in the reaction catalyzed by spore photoproduct lyase: Evidence for a reversibly generated adenosyl radical intermediate*.
- [11] L. Yang, G. Lin, D. Liu, K. J. Dria, J. Telser, L. Li, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133, 10434–10447. *Probing the reaction mechanism of spore photoproduct lyase (SPL) via diastereoselectively labeled dinucleotide SP-TpT substrates*.
- [12] J. C. Pieck, U. Hennecke, A. J. Pierik, M. G. Friedel, T. Carell, *J. Biol. Chem.* **2006**, 281, 36317–36326. *Characterization of a new thermophilic spore photoproduct lyase from Geobacillus stearothermophilus (SplG) with defined lesion containing DNA substrates*.
- [13] A. Chandor, O. Berteau, T. Douki, D. Gasparutto, Y. Sanakis, S. Ollagnier-de-Choudens, M. Atta, M. Fontecave, *J. Biol. Chem.* **2006**, 281, 26922–26931. *Dinucleotide spore photoproduct, a minimal substrate of the DNA repair spore photoproduct lyase enzyme from Bacillus subtilis*.
- [14] L. Yang, L. Li, *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, 14, 13137–13153. *The enzyme-mediated direct reversal of a dithymine photoproduct in germinating endospores*.
- [15] J.-D. Guo, Y. Luo, F. Himo, *J. Phys. Chem. B* **2003**, 107, 11188–11192. *DNA repair by spore photoproduct lyase: A density functional theory study*.
- [16] J. Hioe, H. Zipse, *Chem. Eur. J.* **2012**, 18, 16463–16472. *Hydrogen transfer in SAM-mediated enzymatic radical reactions*.
- [17] K. S. Lee, D. Bumbaca, J. Kosman, P. Setlow, M. J. Jedrzejas, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2008**, 105, 2806–2811. *Structure of a protein-DNA complex essential for DNA protection in spores of Bacillus species*.
- [18] R. E. Franklin, R. G. Gosling, *Nature* **1953**, 171, 740–741. *Molecular configuration in sodium thymonucleate*.
- [19] J. D. Watson, F. H. Crick, *Nature* **1953**, 171, 737–738. *Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid*.
- [20] J. D. Watson, F. H. Crick, *Nature* **1953**, 171, 964–967. *Genetical implications of the structure of deoxyribonucleic acid*.

- [21] M. H. Wilkins, A. R. Stokes, H. R. Wilson, *Nature* **1953**, 171, 738–740. *Molecular structure of deoxypentose nucleic acids*.
- [22] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter, *DNA-binding motifs in gene regulatory proteins*, in *Mol. Biol. Cell*, 4th ed., Garland Science, New York, **2002**.
- [23] R. Wing, H. Drew, T. Takano, C. Broka, S. Tanaka, K. Itakura, R. E. Dickerson, *Nature* **1980**, 287, 755–758. *Crystal structure analysis of a complete turn of B-DNA*.
- [24] O. T. Avery, C. M. Macleod, M. McCarty, *J. Exp. Med.* **1944**, 79, 137–158. *Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types: Induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type III*.
- [25] A. D. Hershey, M. Chase, *J. Gen. Physiol.* **1952**, 36, 39–56. *Independent functions of viral protein and nucleic acid in growth of bacteriophage*.
- [26] M. McCarty, *Nature* **2003**, 421, 406. *Discovering genes are made of DNA*.
- [27] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter, *DNA replication, repair, and recombination*, in *Mol. Biol. Cell*, 4th ed., Garland Science, New York, **2002**.
- [28] Y. Matsumura, H. N. Ananthaswamy, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2004**, 195, 298–308. *Toxic effects of ultraviolet radiation on the skin*.
- [29] E. C. Friedberg, G. C. Walker, W. Siede, *DNA repair and mutagenesis*, ASM Press, Washington D.C., **1995**.
- [30] J.-S. Taylor, *Pure Appl. Chem.* **1995**, 67, 183–190. *DNA, sunlight and skin cancer*.
- [31] T. Schultz, E. Samoylova, W. Radloff, I. V. Hertel, A. L. Sobolewski, W. Domcke, *Science* **2004**, 306, 1765–1768. *Efficient deactivation of a model base pair via excited-state hydrogen transfer*.
- [32] C. E. Crespo-Hernandez, B. Cohen, P. M. Hare, B. Kohler, *Chem. Rev.* **2004**, 104, 1977–2019. *Ultrafast excited-state dynamics in nucleic acids*.
- [33] A. L. Sobolewski, W. Domcke, C. Dedonder-Lardeux, C. Jouvet, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2002**, 4, 1093–1100. *Excited-state hydrogen detachment and hydrogen transfer driven by repulsive  $1\pi\sigma^*$  states: A new paradigm for nonradiative decay in aromatic biomolecules*.
- [34] J. M. Pecourt, J. Peon, B. Kohler, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 10370–10378. *DNA excited-state dynamics: Ultrafast internal conversion and vibrational cooling in a series of nucleosides*.
- [35] J.-M. L. Pecourt, J. Peon, B. Kohler, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 9348–9349. *Ultrafast internal conversion of electronically excited RNA and DNA nucleosides in water*.
- [36] J. Barbera, E. Cavero, M. Lehmann, J. L. Serrano, T. Sierra, J. T. Vazquez, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 4527–4533. *Supramolecular helical stacking of metallomesogens derived from enantiopure and racemic polycatenar oxazolines*.
- [37] N. Ismail, L. Blancafort, M. Olivucci, B. Kohler, M. A. Robb, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 6818–6819. *Ultrafast decay of electronically excited singlet cytosine via a  $\pi,\pi^*$  to  $n,\pi^*$  state switch*.
- [38] J. H. Yoon, C. S. Lee, T. R. O'Connor, A. Yasui, G. P. Pfeifer, *J. Mol. Biol.* **2000**, 299, 681–693. *The DNA damage spectrum produced by simulated sunlight*.
- [39] K. Heil, D. Pearson, T. Carell, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, 40, 4271–4278. *Chemical investigation of light induced DNA bipyrimidine damage and repair*.
- [40] A. C. Kneutinger, G. Kashiwazaki, S. Prill, K. Heil, M. Müller, T. Carell, *Photochem. Photobiol.* **2014**, 90, 1–14. *Formation and direct repair of UV-induced dimeric DNA pyrimidine lesions*.
- [41] J. Cadet, E. Sage, T. Douki, *Mutat. Res.* **2005**, 571, 3–17. *Ultraviolet radiation-mediated damage to cellular DNA*.
- [42] P. F. Heelis, R. F. Hartman, S. D. Rose, *Chem. Soc. Rev.* **1995**, 24, 289–297. *Photoenzymic repair of UV-damaged DNA: A chemist's perspective*.

- [43] H. S. Black, F. R. deGruijl, P. D. Forbes, J. E. Cleaver, H. N. Ananthaswamy, E. C. deFabo, S. E. Ullrich, R. M. Tyrrell, *J. Photochem. Photobiol. B-Biol* **1997**, *40*, 29–47. *Photocarcinogenesis: An overview.*
- [44] R. P. Sinha, D. P. Hader, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2002**, *1*, 225–236. *UV-induced DNA damage and repair: A review.*
- [45] S. Weber, *Biochim. Biophys. Acta* **2005**, *1707*, 1–23. *Light-driven enzymatic catalysis of DNA repair: A review of recent biophysical studies on photolyase.*
- [46] A. Benjdia, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2012**, *22*, 711–720. *DNA photolyases and SP lyase: Structure and mechanism of light-dependent and independent DNA lyases.*
- [47] A. P. Eker, C. Quayle, I. Chaves, G. T. van der Horst, *Cell. Mol. Life Sci.* **2009**, *66*, 968–980. *DNA repair in mammalian cells: Direct DNA damage reversal: Elegant solutions for nasty problems.*
- [48] T. Douki, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2013**, *12*, 1286–1302. *The variety of UV-induced pyrimidine dimeric photoproducts in DNA as shown by chromatographic quantification methods.*
- [49] T. Douki, G. Laporte, J. Cadet, *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, 3134–3142. *Inter-strand photoproducts are produced in high yield within A-DNA exposed to UVC radiation.*
- [50] J. A. Lippke, L. K. Gordon, D. E. Brash, W. A. Haseltine, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1981**, *78*, 3388–3392. *Distribution of UV light-induced damage in a defined sequence of human DNA: Detection of alkaline-sensitive lesions at pyrimidine nucleoside-cytidine sequences.*
- [51] D. E. Brash, W. A. Haseltine, *Nature* **1982**, *298*, 189–192. *UV-induced mutation hotspots occur at DNA damage hotspots.*
- [52] V. I. Lyamichev, M. D. Frank-Kamenetskii, V. N. Soyfer, *Nature* **1990**, *344*, 568–570. *Protection against UV-induced pyrimidine dimerization in DNA by triplex formation.*
- [53] V. Lyamichev, *Nucleic Acids Res.* **1991**, *19*, 4491–4496. *Unusual conformation of (dA)n.(dT)n-tracts as revealed by cyclobutane thymine-thymine dimer formation.*
- [54] J. R. Pehrson, L. H. Cohen, *Nucleic Acids Res.* **1992**, *20*, 1321–1324. *Effects of DNA looping on pyrimidine dimer formation.*
- [55] T. Douki, J. Cadet, *Biochemistry* **2001**, *40*, 2495–2501. *Individual determination of the yield of the main UV-induced dimeric pyrimidine photoproducts in DNA suggests a high mutagenicity of CC photolesions.*
- [56] S. Mouret, C. Baudouin, M. Charveron, A. Favier, J. Cadet, T. Douki, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, *103*, 13765–13770. *Cyclobutane pyrimidine dimers are predominant DNA lesions in whole human skin exposed to UVA radiation.*
- [57] Y. C. Taylor, J. W. Evans, J. M. Brown, *Radiat. Res.* **1987**, *109*, 364–373. *Radiosensitization by hypoxic pretreatment with misonidazole: An interaction of damage at the DNA level.*
- [58] J. S. Taylor, H. F. Lu, J. J. Kotyk, *Photochem. Photobiol.* **1990**, *51*, 161–167. *Quantitative conversion of the (6–4) photoproduct of TpdC to its dewar valence isomer upon exposure to simulated sunlight.*
- [59] S. Courdavault, C. Baudouin, M. Charveron, B. Canguilhem, A. Favier, J. Cadet, T. Douki, *DNA Repair* **2005**, *4*, 836–844. *Repair of the three main types of bipyrimidine DNA photoproducts in human keratinocytes exposed to UVB and UVA radiations.*
- [60] K. Haiser, B. P. Fingerhut, K. Heil, A. Glas, T. T. Herzog, B. M. Pilles, W. J. Schreier, W. Zinth, R. de Vivie-Riedle, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 408–411. *Mechanism of UV-induced formation of dewar lesions in DNA.*
- [61] P. H. Clingen, C. F. Arlett, L. Roza, T. Mori, O. Nikaido, M. H. Green, *Cancer Res.* **1995**, *55*, 2245–2248. *Induction of cyclobutane pyrimidine dimers, pyrimidine(6–4)pyrimidone photoproducts, and dewar valence isomers by natural sunlight in normal human mononuclear cells.*

- [62] Y. Jing, J. F. Kao, J. S. Taylor, *Nucleic Acids Res.* **1998**, 26, 3845–3853. *Thermodynamic and base-pairing studies of matched and mismatched DNA dodecamer duplexes containing cis-syn, (6–4) and dewar photoproducts of TT.*
- [63] M. Lukin, C. de Los Santos, *Chem. Rev.* **2006**, 106, 607–686. *NMR structures of damaged DNA.*
- [64] P. C. Hanawalt, *Science* **1994**, 266, 1957–1958. *Transcription-coupled repair and human disease.*
- [65] B. A. Donahue, S. Yin, J. S. Taylor, D. Reines, P. C. Hanawalt, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1994**, 91, 8502–8506. *Transcript cleavage by RNA polymerase II arrested by a cyclobutane pyrimidine dimer in the DNA template.*
- [66] E. Otoshi, T. Yagi, T. Mori, T. Matsunaga, O. Nikaido, S. T. Kim, K. Hitomi, M. Ikenaga, T. Todo, *Cancer Res.* **2000**, 60, 1729–1735. *Respective roles of cyclobutane pyrimidine dimers, (6–4)photoproducts, and minor photoproducts in ultraviolet mutagenesis of repair-deficient xeroderma pigmentosum a cells.*
- [67] Y. H. You, D. H. Lee, J. H. Yoon, S. Nakajima, A. Yasui, G. P. Pfeifer, *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 44688–44694. *Cyclobutane pyrimidine dimers are responsible for the vast majority of mutations induced by UVB irradiation in mammalian cells.*
- [68] I. Tessman, M. A. Kennedy, S.-K. Liu, *J. Mol. Biol.* **1994**, 235, 807–812. *Unusual kinetics of uracil formation in single and double-stranded DNA by deamination of cytosine in cyclobutane pyrimidine dimers.*
- [69] Y. Barak, O. Cohen-Fix, Z. Livneh, *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, 24174–24179. *Deamination of cytosine-containing pyrimidine photodimers in UV-irradiated DNA: Significance for UV light mutagenesis.*
- [70] W. Peng, B. R. Shaw, *Biochemistry* **1996**, 35, 10172–10181. *Accelerated deamination of cytosine residues in UV-induced cyclobutane pyrimidine dimers leads to CC→TT transitions.*
- [71] L. A. Frederico, T. A. Kunkel, B. R. Shaw, *Biochemistry* **1990**, 29, 2532–2537. *A sensitive genetic assay for the detection of cytosine deamination: Determination of rate constants and the activation energy.*
- [72] I. Tessman, S. K. Liu, M. A. Kennedy, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1992**, 89, 1159–1163. *Mechanism of SOS mutagenesis of UV-irradiated DNA: Mostly error-free processing of deaminated cytosine.*
- [73] B. A. Gilchrest, M. S. Eller, A. C. Geller, M. Yaar, *N. Engl. J. Med.* **1999**, 340, 1341–1348. *The pathogenesis of melanoma induced by ultraviolet radiation.*
- [74] E. Guzman, J. L. Langowski, L. Owen-Schaub, *Apoptosis* **2003**, 8, 315–325. *Mad dogs, englishmen and apoptosis: The role of cell death in UV-induced skin cancer.*
- [75] J. E. Cleaver, E. Crowley, *Front Biosci.* **2002**, 7, d1024–1043. *UV damage, DNA repair and skin carcinogenesis.*
- [76] C. Jhappan, F. P. Noonan, G. Merlino, *Oncogene* **2003**, 22, 3099–3112. *Ultraviolet radiation and cutaneous malignant melanoma.*
- [77] Y. H. You, P. E. Szabo, G. P. Pfeifer, *Carcinogenesis* **2000**, 21, 2113–2117. *Cyclobutane pyrimidine dimers form preferentially at the major p53 mutational hotspot in UVB-induced mouse skin tumors.*
- [78] S. Adimoolam, J. M. Ford, *DNA Repair* **2003**, 2, 947–954. *P53 and regulation of DNA damage recognition during nucleotide excision repair.*
- [79] A. A. Vink, L. Roza, *J. Photochem. Photobiol. B-Biol* **2001**, 65, 101–104. *Biological consequences of cyclobutane pyrimidine dimers.*
- [80] V. O. Melnikova, H. N. Ananthaswamy, *Mutat. Res.* **2005**, 571, 91–106. *Cellular and molecular events leading to the development of skin cancer.*
- [81] M. M. Marshall, S. Hayes, J. Moffett, C. R. Sterling, W. L. Nicholson, *Appl. Environ. Microbiol.* **2003**, 69, 683–685. *Comparison of UV inactivation of spores of three*



- encephalitozoon species with that of spores of two DNA repair-deficient Bacillus subtilis biosimetry strains.*
- [82] R. T. Eijlander, T. Abee, O. P. Kuipers, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2011**, 22, 180–186. *Bacterial spores in food: How phenotypic variability complicates prediction of spore properties and bacterial behavior.*
  - [83] J. C. Augustin, *Food Microbiol.* **2011**, 28, 209–213. *Challenges in risk assessment and predictive microbiology of foodborne spore-forming bacteria.*
  - [84] P. Stragier, R. Losick, *Annu. Rev. Genet.* **1996**, 30, 297–241. *Molecular genetics of sporulation in Bacillus subtilis.*
  - [85] D. W. Hilbert, P. J. Piggot, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2004**, 68, 234–262. *Compartmentalization of gene expression during Bacillus subtilis spore formation.*
  - [86] P. J. Piggot, D. W. Hilbert, *Curr. Opin. Microbiol.* **2004**, 7, 579–586. *Sporulation of Bacillus subtilis.*
  - [87] P. Setlow, *Trends Microbiol.* **2007**, 15, 172–180. *I will survive: DNA protection in bacterial spores.*
  - [88] S. T. Wang, B. Setlow, E. M. Conlon, J. L. Lyon, D. Imamura, T. Sato, P. Setlow, R. Losick, P. Eichenberger, *J. Mol. Biol.* **2006**, 358, 16–37. *The forespore line of gene expression in Bacillus subtilis.*
  - [89] A. Driks, *Cell. Mol. Life Sci.* **2002**, 59, 389–391. *Overview: Development in bacteria: Spore formation in Bacillus subtilis.*
  - [90] R. T. Eijlander, A. de Jong, A. O. Krawczyk, S. Holsappel, O. P. Kuipers, *Nucleic Acids Res.* **2014**, 42, D685–691. *Sporeweb: An interactive journey through the complete sporulation cycle of Bacillus subtilis.*
  - [91] M. J. Kennedy, S. L. Reader, L. M. Swierczynski, *Microbiology* **1994**, 140, 2513–2529. *Preservation records of micro-organisms: Evidence of the tenacity of life.*
  - [92] R. J. Cano, M. K. Borucki, *Science* **1995**, 268, 1060–1064. *Revival and identification of bacterial spores in 25- to 40-million-year-old dominican amber.*
  - [93] P. Setlow, *Annu. Rev. Microbiol.* **1995**, 49, 29–54. *Mechanisms for the prevention of damage to DNA in spores of Bacillus species.*
  - [94] K. Pogliano, E. Harry, R. Losick, *Mol. Microbiol.* **1995**, 18, 459–470. *Visualization of the subcellular location of sporulation proteins in Bacillus subtilis using immunofluorescence microscopy.*
  - [95] K. Ragkousi, A. E. Cowan, M. A. Ross, P. Setlow, *J. Bacteriol.* **2000**, 182, 5556–5562. *Analysis of nucleoid morphology during germination and outgrowth of spores of Bacillus species.*
  - [96] D. Frenkiel-Krispin, R. Sack, J. Englander, E. Shimoni, M. Eisenstein, E. Bullitt, R. Horowitz-Scherer, C. S. Hayes, P. Setlow, A. Minsky, S. G. Wolf, *J. Bacteriol.* **2004**, 186, 3525–3530. *Structure of the DNA-SspC complex: Implications for DNA packaging, protection, and repair in bacterial spores.*
  - [97] S. C. Francesconi, T. J. MacAlister, B. Setlow, P. Setlow, *J. Bacteriol.* **1988**, 170, 5963–5967. *Immunoelectron microscopic localization of small, acid-soluble spore proteins in sporulating cells of Bacillus subtilis.*
  - [98] B. Setlow, D. Sun, P. Setlow, *J. Bacteriol.* **1992**, 174, 2312–2322. *Interaction between DNA and alpha/beta-type small, acid-soluble spore proteins: A new class of DNA-binding protein.*
  - [99] P. Setlow, *J. Appl. Microbiol.* **2006**, 101, 514–525. *Spores of Bacillus subtilis: Their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals.*
  - [100] B. Setlow, K. A. McGinnis, K. Ragkousi, P. Setlow, *J. Bacteriol.* **2000**, 182, 6906–6912. *Effects of major spore-specific DNA binding proteins on Bacillus subtilis sporulation and spore properties.*

- [101] R. S. Stafford, J. E. Donnellan, Jr., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1968**, 59, 822–828. *Photochemical evidence for conformation changes in DNA during germination of bacterial spores.*
- [102] S. C. Mohr, N. V. Sokolov, C. M. He, P. Setlow, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1991**, 88, 77–81. *Binding of small acid-soluble spore proteins from Bacillus subtilis changes the conformation of DNA from B to A.*
- [103] P. Setlow, *Mol. Microbiol.* **1992**, 6, 563–567. *DNA in dormant spores of Bacillus species is in an A-like conformation.*
- [104] J. Griffith, A. Makhov, L. Santiago-Lara, P. Setlow, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1994**, 91, 8224–8228. *Electron microscopic studies of the interaction between a Bacillus subtilis alpha/beta-type small, acid-soluble spore protein with DNA: Protein binding is cooperative, stiffens the DNA, and induces negative supercoiling.*
- [105] L. M. Kundu, U. Linne, M. Marahiel, T. Carell, *Chem. Eur. J.* **2004**, 10, 5697–5705. *RNA is more UV resistant than DNA: The formation of UV-induced DNA lesions is strongly sequence and conformation dependent.*
- [106] H. Fairhead, B. Setlow, P. Setlow, *J. Bacteriol.* **1993**, 175, 1367–1374. *Prevention of DNA damage in spores and in vitro by small, acid-soluble proteins from Bacillus species.*
- [107] B. Setlow, P. Setlow, *Appl. Environ. Microbiol.* **1995**, 61, 2787–2790. *Small, acid-soluble proteins bound to DNA protect Bacillus subtilis spores from killing by dry heat.*
- [108] B. Setlow, P. Setlow, *Appl. Environ. Microbiol.* **1993**, 59, 640–643. *Dipicolinic acid greatly enhances production of spore photoproduct in bacterial spores upon UV irradiation.*
- [109] G. R. Germaine, W. G. Murrell, *Photochem. Photobiol.* **1973**, 17, 145–153. *Effect of dipicolinic acid on the ultraviolet radiation resistance of Bacillus cereus spores.*
- [110] J. Lindsay, W. Murrell, *Curr. Microbiol.* **1986**, 13, 255–259. *Solution spectroscopy of dipicolinic acid interaction with nucleic acids: Role in spore heat resistance.*
- [111] M. Paidhungat, B. Setlow, A. Driks, P. Setlow, *J. Bacteriol.* **2000**, 182, 5505–5512. *Characterization of spores of Bacillus subtilis which lack dipicolinic acid.*
- [112] T. A. Slieman, W. L. Nicholson, *Appl. Environ. Microbiol.* **2000**, 66, 199–205. *Artificial and solar UV radiation induces strand breaks and cyclobutane pyrimidine dimers in Bacillus subtilis spore DNA.*
- [113] P. Setlow, *Environ. Mol. Mutagen.* **2001**, 38, 97–104. *Resistance of spores of Bacillus species to ultraviolet light.*
- [114] W. L. Nicholson, A. C. Schuerger, P. Setlow, *Mutat. Res.* **2005**, 571, 249–264. *The solar UV environment and bacterial spore UV resistance: Considerations for earth-to-mars transport by natural processes and human spaceflight.*
- [115] R. Moeller, T. Douki, J. Cadet, E. Stackebrandt, W. L. Nicholson, P. Rettberg, G. Reitz, G. Horneck, *Int. Microbiol.* **2007**, 10, 39–46. *UV-radiation-induced formation of DNA bipyrimidine photoproducts in Bacillus subtilis endospores and their repair during germination.*
- [116] W. L. Nicholson, B. Setlow, P. Setlow, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1991**, 88, 8288–8292. *Ultraviolet irradiation of DNA complexed with alpha/beta-type small, acid-soluble proteins from spores of Bacillus or Clostridium species makes spore photoproduct but not thymine dimers.*
- [117] R. M. Tyrrell, *Photochem. Photobiol.* **1978**, 27, 571–579. *Solar dosimetry with repair deficient bacterial spores: Action spectra, photoproduct measurements and a comparison with other biological systems.*
- [118] B. Setlow, P. Setlow, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1987**, 84, 421–423. *Thymine-containing dimers as well as spore photoproducts are found in ultraviolet-irradiated Bacillus subtilis spores that lack small acid-soluble proteins.*

- [119] T. Douki, B. Setlow, P. Setlow, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2005**, 4, 591–597. *Photosensitization of DNA by dipicolinic acid, a major component of spores of Bacillus species.*
- [120] R. Nudelman, B. V. Bronk, S. Efrima, *Appl. Spectrosc.* **2000**, 54, 445–449. *Fluorescence emission derived from dipicolinic acid, its sodium, and its calcium salts.*
- [121] T. Douki, B. Setlow, P. Setlow, *Photochem. Photobiol.* **2005**, 81, 163–169. *Effects of the binding of alpha/beta-type small, acid-soluble spore proteins on the photochemistry of DNA in spores of Bacillus subtilis and in vitro.*
- [122] C. Lindberg, G. Horneck, *J. Photochem. Photobiol. B-Biol* **1991**, 11, 69–80. *Action spectra for survival and spore photoproduct formation of Bacillus subtilis irradiated with short-wavelength (200–300 nm) UV at atmospheric pressure and in vacuo.*
- [123] J. E. Donnellan, Jr., J. L. Hosszu, R. O. Rahn, R. S. Stafford, *Nature* **1968**, 219, 964–965. *Effect of temperature on the photobiology and photochemistry of bacterial spores.*
- [124] K. C. Smith, H. Yoshikawa, *Photochem. Photobiol.* **1966**, 5, 777–786. *Variation in the photochemical reactivity of thymine in the DNA of B. subtilis spores, vegetative cells and spores germinated in chloramphenicol.*
- [125] J. Peccia, M. Hernandez, *Appl. Environ. Microbiol.* **2001**, 67, 4225–4232. *Photoreactivation in airborne Mycobacterium parafortuitum.*
- [126] G. Lin, L. Li, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, 49, 9926–9929. *Elucidation of spore-photoproduct formation by isotope labeling.*
- [127] Q. Du, H. Zhao, D. Song, K. Liu, H. Su, *J. Phys. Chem. B* **2012**, 116, 11117–11123. *Consecutive reaction mechanism for the formation of spore photoproduct in DNA photolysis.*
- [128] A. J. Varghese, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1970**, 38, 484–490. *5-thyminy-5,6-dihydrothymine from DNA irradiated with ultraviolet light.*
- [129] S. Y. Wang, *Pyrimidine bimolecular photoproducts*, in *Photochemistry and photobiology of nucleic acids* (Ed.: S. Y. Wang), Academic Press, New York, **1976**, pp. 295–356.
- [130] J. Cadet, P. Vigny, *The photochemistry of nucleic acids*, in *Bioorganic photochemistry: Photochemistry and the nucleic acids* (Ed.: H. Morrison), Wiley-VCH, New York, **1990**.
- [131] J. Eisinger, R. G. Shulman, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1963**, 50, 694–696. *UV-induced electron spin resonances in DNA and thymine.*
- [132] P. S. Pershan, R. G. Shulman, B. J. Wyluda, J. Eisinger, *Science* **1965**, 148, 378–380. *Electron spin resonance of irradiated DNA.*
- [133] R. Alcántara, S. Y. Wang, *Photochem. Photobiol.* **1965**, 4, 473–476. *Photochemistry of thymine in aqueous solution.*
- [134] T. Douki, J. Cadet, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2003**, 2, 433–436. *Formation of the spore photoproduct and other dimeric lesions between adjacent pyrimidines in UVC-irradiated dry DNA.*
- [135] S. J. Kim, C. Lester, T. P. Begley, *J. Org. Chem.* **1995**, 60, 6256–6257. *Synthesis of the dinucleotide spore photoproduct.*
- [136] C. Mantel, A. Chandor, D. Gasparutto, T. Douki, M. Atta, M. Fontecave, P. A. Bayle, J. M. Mouesca, M. Bardet, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 16978–16984. *Combined NMR and DFT studies for the absolute configuration elucidation of the spore photoproduct, a UV-induced DNA lesion.*
- [137] M. G. Friedel, J. C. Pieck, J. Klages, C. Dauth, H. Kessler, T. Carell, *Chem. Eur. J.* **2006**, 12, 6081–6094. *Synthesis and stereochemical assignment of DNA spore photoproduct analogues.*
- [138] M. G. Friedel, O. Berteau, J. C. Pieck, M. Atta, S. Ollagnier-de-Choudens, M. Fontecave, T. Carell, *Chem. Commun.* **2006**, doi 10.1039/b514103f, 445–447. *The spore photoproduct lyase repairs the 5S- and not the 5R-configured spore photoproduct DNA lesion.*

- [139] T. Chandra, S. C. Silver, E. Zilinskas, E. M. Shepard, W. E. Broderick, J. B. Broderick, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 2420–2421. *Spore photoproduct lyase catalyzes specific repair of the 5R but not the 5S spore photoproduct.*
- [140] K. Heil, A. C. Kneuttinger, S. Schneider, U. Lischke, T. Carell, *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 9651–9657. *Crystal structures and repair studies reveal the identity and the base-pairing properties of the UV-induced spore photoproduct DNA lesion.*
- [141] G. Lin, C. H. Chen, M. Pink, J. Pu, L. Li, *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 9658–9668. *Chemical synthesis, crystal structure and enzymatic evaluation of a dinucleotide spore photoproduct analogue containing a formacetal linker.*
- [142] C. Biertümpfel, Y. Zhao, Y. Kondo, S. Ramón-Maiques, M. Gregory, J. Y. Lee, C. Masutani, A. R. Lehmann, F. Hanaoka, W. Yang, *Nature* **2010**, *465*, 1044–1048. *Structure and mechanism of human DNA polymerase  $\eta$ .*
- [143] A. F. Glas, E. Kaya, S. Schneider, K. Heil, D. Fazio, M. J. Maul, T. Carell, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 3254–3255. *DNA (6–4) photolyases reduce dewar isomers for isomerization into (6–4) lesions.*
- [144] M. J. Maul, T. R. Barends, A. F. Glas, M. J. Cryle, T. Domratcheva, S. Schneider, I. Schlichting, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 10076–10080. *Crystal structure and mechanism of a DNA (6–4) photolyase.*
- [145] E. Burckstummer, T. Carell, *Chem. Commun.* **2008**, doi 10.1039/b810008j, 4037–4039. *Synthesis and properties of DNA containing a spore photoproduct analog.*
- [146] Y. Jian, L. Li, *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 3021–3029. *Chemical syntheses of oligodeoxyribonucleotides containing spore photoproduct.*
- [147] K. McAteer, Y. Jing, J. Kao, J. S. Taylor, M. A. Kennedy, *J. Mol. Biol.* **1998**, *282*, 1013–1032. *Solution-state structure of a DNA dodecamer duplex containing a cis-syn thymine cyclobutane dimer, the major UV photoproduct of DNA.*
- [148] B. Setlow, P. Setlow, *Appl. Environ. Microbiol.* **1988**, *54*, 1275–1276. *Decreased UV light resistance of spores of Bacillus subtilis strains deficient in pyrimidine dimer repair and small, acid-soluble spore proteins.*
- [149] J. C. Pieck, *Dissertation*, T. Carell, Ludwig-Maximilians Universität München (München), **2007**. *Reparatur und Replikation des Sporen-Photoproduktes sowie ortsspezifische Generierung eines CPD- bzw. Sporen-Photoproduktes in DNA.*
- [150] S. Tornaletti, G. P. Pfeifer, *Bioessays* **1996**, *18*, 221–228. *UV damage and repair mechanisms in mammalian cells.*
- [151] J. Fei, N. Kaczmarek, A. Luch, A. Glas, T. Carell, H. Naegeli, *PLoS. Biol.* **2011**, *9*, e1001183. *Regulation of nucleotide excision repair by UV-DDB: Prioritization of damage recognition to internucleosomal DNA.*
- [152] J. T. Reardon, A. Sancar, *Prog. Nucl. Res. Molec. Biol.* **2005**, *79*, 183–235. *Nucleotide excision repair.*
- [153] L. C. Gillet, O. D. Scharer, *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 253–276. *Molecular mechanisms of mammalian global genome nucleotide excision repair.*
- [154] P. J. Berti, J. A. McCann, *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 506–555. *Toward a detailed understanding of base excision repair enzymes: Transition state and mechanistic analyses of N-glycoside hydrolysis and N-glycoside transfer.*
- [155] K. Hitomi, S. Iwai, J. A. Tainer, *DNA Repair* **2007**, *6*, 410–428. *The intricate structural chemistry of base excision repair machinery: Implications for DNA damage recognition, removal, and repair.*
- [156] D. G. Vassilyev, T. Kashiwagi, Y. Mikami, M. Ariyoshi, S. Iwai, E. Ohtsuka, K. Morikawa, *Cell* **1995**, *83*, 773–782. *Atomic model of a pyrimidine dimer excision repair enzyme complexed with a DNA substrate: Structural basis for damaged DNA recognition.*
- [157] M. Christmann, M. T. Tomicic, W. P. Roos, B. Kaina, *Toxicology* **2003**, *193*, 3–34. *Mechanisms of human DNA repair: An update.*

- [158] S. Kimura, K. Sakaguchi, *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 753–766. *DNA repair in plants.*
- [159] A. Sancar, *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 2203–2237. *Structure and function of DNA photolyase and cryptochrome blue-light photoreceptors.*
- [160] L. O. Essen, T. Klar, *Cell. Mol. Life Sci.* **2006**, *63*, 1266–1277. *Light-driven DNA repair by photolyases.*
- [161] M. Muller, T. Carell, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2009**, *19*, 277–285. *Structural biology of DNA photolyases and cryptochromes.*
- [162] G. B. Sancar, *Mutat. Res.* **1990**, *236*, 147–160. *DNA photolyases: Physical properties, action mechanism, and roles in dark repair.*
- [163] A. Sancar, *Photolyase: DNA repair by photoinduced electron transfer*, in *Advances in electron transfer chemistry* (Ed.: P. E. Mariano), JAI Press, London, **1992**, pp. 215–272.
- [164] P. F. Heelis, S. T. Kim, T. Okamura, A. Sancar, *J. Photochem. Photobiol. B-Biol* **1993**, *17*, 219–228. *The photo repair of pyrimidine dimers by DNA photolyase and model systems.*
- [165] S. T. Kim, A. Sancar, *Photochem. Photobiol.* **1993**, *57*, 895–904. *Photochemistry, photophysics, and mechanism of pyrimidine dimer repair by DNA photolyase.*
- [166] A. Sancar, *Biochemistry* **1994**, *33*, 2–9. *Structure and function of DNA photolyase.*
- [167] T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1995**, *34*, 2491–2494. *Sunlight-damaged DNA repaired with sunlight.*
- [168] P. F. Heelis, R. F. Hartman, S. D. Rose, *J. Photochem. Photobiol. A-Chem.* **1996**, *95*, 89–98. *Energy and electron transfer processes in flavoprotein-mediated DNA repair.*
- [169] A. Sancar, *Science* **1996**, *272*, 48–49. *No "end of history" for photolyases.*
- [170] X. Zhao, D. Mu, *Histol. Histopath.* **1998**, *13*, 1179–1182. *(6–4) photolyase: Light-dependent repair of DNA damage.*
- [171] F. Thoma, *Embo J.* **1999**, *18*, 6585–6598. *Light and dark in chromatin repair: Repair of UV-induced DNA lesions by photolyase and nucleotide excision repair.*
- [172] T. Todo, *Mutat. Res.* **1999**, *434*, 89–97. *Functional diversity of the DNA photolyase/blue light receptor family.*
- [173] G. B. Sancar, *Mutat. Res.* **2000**, *451*, 25–37. *Enzymatic photoreactivation: 50 years and counting.*
- [174] J. Deisenhofer, *Mutat. Res.* **2000**, *460*, 143–149. *DNA photolyases and cryptochromes.*
- [175] T. Carell, L. T. Burgdorf, L. M. Kundu, M. Cichon, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2001**, *5*, 491–498. *The mechanism of action of DNA photolyases.*
- [176] C. L. Thompson, A. Sancar, *Oncogene* **2002**, *21*, 9043–9056. *Photolyase/cryptochrome blue-light photoreceptors use photon energy to repair DNA and reset the circadian clock.*
- [177] N. Ozturk, Y. T. Kao, C. P. Selby, I. H. Kavakli, C. L. Partch, D. Zhong, A. Sancar, *Biochemistry* **2008**, *47*, 10255–10261. *Purification and characterization of a type III photolyase from *Caulobacter crescentus*.*
- [178] S. Kiontke, Y. Geisselbrecht, R. Pokorny, T. Carell, A. Batschauer, L. O. Essen, *Embo J.* **2011**, *30*, 4437–4449. *Crystal structures of an archaeal class II DNA photolyase and its complex with UV-damaged duplex DNA.*
- [179] K. Hitomi, A. S. Arvai, J. Yamamoto, C. Hitomi, M. Teranishi, T. Hirouchi, K. Yamamoto, S. Iwai, J. A. Tainer, J. Hidema, E. D. Getzoff, *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 12060–12069. *Eukaryotic class II cyclobutane pyrimidine dimer photolyase structure reveals basis for improved ultraviolet tolerance in plants.*
- [180] H. W. Park, S. T. Kim, A. Sancar, J. Deisenhofer, *Science* **1995**, *268*, 1866–1872. *Crystal structure of DNA photolyase from *Escherichia coli*.*
- [181] T. Tamada, K. Kitadokoro, Y. Higuchi, K. Inaka, A. Yasui, P. E. de Ruiter, A. P. Eker, K. Miki, *Nat. Struct. Biol.* **1997**, *4*, 887–891. *Crystal structure of DNA photolyase from *Anacystis nidulans*.*

- [182] R. F. Hartman, S. D. Rose, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 3559–3560. *Efficient photosensitized pyrimidine dimer splitting by a reduced flavin requires the deprotonated flavin.*
- [183] T. Carell, R. Epple, V. Gramlich, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1996**, *35*, 620–623. *Synthesis of flavin-containing model compounds for DNA photolyase mediated DNA repair.*
- [184] A. F. Glas, M. J. Maul, M. Cryle, T. R. Barends, S. Schneider, E. Kaya, I. Schlichting, T. Carell, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2009**, *106*, 11540–11545. *The archaeal cofactor F0 is a light-harvesting antenna chromophore in eukaryotes.*
- [185] G. Payne, M. Wills, C. Walsh, A. Sancar, *Biochemistry* **1990**, *29*, 5706–5711. *Reconstitution of Escherichia coli photolyase with flavins and flavin analogues.*
- [186] M. E. Baer, G. B. Sancar, *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 16717–16724. *The role of conserved amino acids in substrate binding and discrimination by photolyase.*
- [187] I. Husain, A. Sancar, *Nucleic Acids Res.* **1987**, *15*, 1109–1120. *Binding of E. coli DNA photolyase to a defined substrate containing a single T mean value of T dimer.*
- [188] K. S. Christine, A. W. t. MacFarlane, K. Yang, R. J. Stanley, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 38339–38344. *Cyclobutylpyrimidine dimer base flipping by DNA photolyase.*
- [189] A. Mees, T. Klar, P. Gnau, U. Hennecke, A. P. Eker, T. Carell, L. O. Essen, *Science* **2004**, *306*, 1789–1793. *Crystal structure of a photolyase bound to a CPD-like DNA lesion after in situ repair.*
- [190] J. Butenandt, R. Epple, E. U. Wallenborn, A. P. Eker, V. Gramlich, T. Carell, *Chem. Eur. J.* **2000**, *6*, 62–72. *A comparative repair study of thymine- and uracil-photodimers with model compounds and a photolyase repair enzyme.*
- [191] S. T. Kim, P. F. Heelis, A. Sancar, *Methods Enzymol.* **1995**, *258*, 319–343. *Role of tryptophans in substrate binding and catalysis by DNA photolyase.*
- [192] P. F. Heelis, T. Okamura, A. Sancar, *Biochemistry* **1990**, *29*, 5694–5698. *Excited-state properties of Escherichia coli DNA photolyase in the picosecond to millisecond time scale.*
- [193] Y. F. Li, P. F. Heelis, A. Sancar, *Biochemistry* **1991**, *30*, 6322–6329. *Active site of DNA photolyase: Tryptophan-306 is the intrinsic hydrogen atom donor essential for flavin radical photoreduction and DNA repair in vitro.*
- [194] C. Aubert, M. H. Vos, P. Mathis, A. P. Eker, K. Brettel, *Nature* **2000**, *405*, 586–590. *Intraprotein radical transfer during photoactivation of DNA photolyase.*
- [195] C. Aubert, P. Mathis, A. P. Eker, K. Brettel, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1999**, *96*, 5423–5427. *Intraprotein electron transfer between tyrosine and tryptophan in DNA photolyase from Anacystis nidulans.*
- [196] T. Carell, R. Epple, *Eur. J. Org. Chem.* **1998**, *1998*, 1245–1258. *Repair of UV light induced DNA lesions: A comparative study with model compounds.*
- [197] S. R. Yeh, D. E. Falvey, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 7313–7314. *Model studies of DNA photorepair: Energetic requirements for the radical anion mechanism determined by fluorescence quenching.*
- [198] S. E. Rokita, C. T. Walsh, *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 4589–4595. *Flavin and 5-deazaflavin photosensitized cleavage of thymine dimer: A model of in vivo light-requiring DNA repair.*
- [199] J. L. Johnson, S. Hamm-Alvarez, G. Payne, G. B. Sancar, K. V. Rajagopalan, A. Sancar, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1988**, *85*, 2046–2050. *Identification of the second chromophore of Escherichia coli and yeast DNA photolyases as 5,10-methenyltetrahydrofolate.*
- [200] S. T. Kim, K. Malhotra, H. Ryo, A. Sancar, T. Todo, *Mutat. Res.* **1996**, *363*, 97–104. *Purification and characterization of Drosophila melanogaster photolyase.*

- [201] A. Yasui, M. Takao, A. Oikawa, A. Kiener, C. T. Walsh, A. P. Eker, *Nucleic Acids Res.* **1988**, *16*, 4447–4463. *Cloning and characterization of a photolyase gene from the cyanobacterium Anacystis nidulans.*
- [202] A. Kiener, I. Husain, A. Sancar, C. Walsh, *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 13880–13887. *Purification and properties of Methanobacterium thermoautotrophicum DNA photolyase.*
- [203] R. B. Woodward, L. S. Weiler, P. C. Dutta, *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, *87*, 4662–4663. *The structure of magnamycin.*
- [204] V. Thiagarajan, M. Byrdin, A. P. Eker, P. Muller, K. Brettel, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2011**, *108*, 9402–9407. *Kinetics of cyclobutane thymine dimer splitting by DNA photolyase directly monitored in the UV.*
- [205] Z. Liu, X. Guo, C. Tan, J. Li, Y. T. Kao, L. Wang, A. Sancar, D. Zhong, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 8104–8114. *Electron tunneling pathways and role of adenine in repair of cyclobutane pyrimidine dimer by DNA photolyase.*
- [206] Z. Liu, C. Tan, X. Guo, Y. T. Kao, J. Li, L. Wang, A. Sancar, D. Zhong, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2011**, *108*, 14831–14836. *Dynamics and mechanism of cyclobutane pyrimidine dimer repair by DNA photolyase.*
- [207] Z. Liu, M. Zhang, X. Guo, C. Tan, J. Li, L. Wang, A. Sancar, D. Zhong, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2013**, *110*, 12972–12977. *Dynamic determination of the functional state in photolyase and the implication for cryptochrome.*
- [208] V. Thiagarajan, S. Villette, A. Espagne, A. P. Eker, K. Brettel, M. Byrdin, *Biochemistry* **2010**, *49*, 297–303. *DNA repair by photolyase: A novel substrate with low background absorption around 265 nm for transient absorption studies in the UV.*
- [209] K. Brettel, M. Byrdin, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2012**, *109*, E1462. *DNA photolyase: Is the nonproductive back electron transfer really much slower than forward transfer?*
- [210] D. Zhong, A. Sancar, A. Stuchebrukhov, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2012**, *109*, E1463–E1463. *Reply to Brettel and Byrdin: On the efficiency of DNA repair by photolyase.*
- [211] T. Todo, H. Takemori, H. Ryo, M. Ihara, T. Matsunaga, O. Nikaido, K. Sato, T. Nomura, *Nature* **1993**, *361*, 371–374. *A new photoreactivating enzyme that specifically repairs ultraviolet light-induced (6–4)photoproducts.*
- [212] T. Mizukoshi, K. Hitomi, T. Todo, S. Iwai, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 10634–10642. *Studies on the chemical synthesis of oligonucleotides containing the (6–4) photoproduct of thymine–cytosine and its repair by (6–4) photolyase.*
- [213] A. F. Glas, S. Schneider, M. J. Maul, U. Hennecke, T. Carell, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 10387–10396. *Crystal structure of the T(6–4)C lesion in complex with a (6–4) DNA photolyase and repair of UV-induced (6–4) and dewar photolesions.*
- [214] M. K. Cichon, S. Arnold, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 767–770. *A (6–4) photolyase model: Repair of DNA (6–4) lesions requires a reduced and deprotonated flavin.*
- [215] M. G. Friedel, M. K. Cichon, T. Carell, *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 1937–1941. *Model compounds for (6–4) photolyases: A comparative flavin induced cleavage study of oxetanes and thietanes.*
- [216] X. Zhao, J. Liu, D. S. Hsu, S. Zhao, J. S. Taylor, A. Sancar, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 32580–32590. *Reaction mechanism of (6–4) photolyase.*
- [217] S. T. Kim, K. Malhotra, C. A. Smith, J. S. Taylor, A. Sancar, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 8535–8540. *Characterization of (6–4) photoproduct DNA photolyase.*
- [218] K. Hitomi, H. Nakamura, S. T. Kim, T. Mizukoshi, T. Ishikawa, S. Iwai, T. Todo, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 10103–10109. *Role of two histidines in the (6–4) photolyase reaction.*
- [219] M. A. Miranda, M. A. Izquierdo, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 6532–6533. *Stepwise cycloreversion of oxetane radical cations with initial C–O bond cleavage.*

- [220] M. A. Miranda, M. A. Izquierdo, *Chem. Commun.* **2003**, doi 10.1039/b209500a, 364–365. *Chemical and transient spectroscopic evidence for C2-C3 cleavage of 2,3-diaryloxetane radical cations.*
- [221] Y. Wang, P. P. Gaspar, J.-S. Taylor, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 5510–5519. *Quantum chemical study of the electron-transfer-catalyzed splitting of oxetane and azetidine intermediates proposed in the photoenzymatic repair of (6–4) photoproducts of DNA.*
- [222] E. Schleicher, K. Hitomi, C. W. Kay, E. D. Getzoff, T. Todo, S. Weber, *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 4738–4747. *Electron nuclear double resonance differentiates complementary roles for active site histidines in (6–4) photolyase.*
- [223] J. Li, Z. Liu, C. Tan, X. Guo, L. Wang, A. Sancar, D. Zhong, *Nature* **2010**, *466*, 887–890. *Dynamics and mechanism of repair of ultraviolet-induced (6–4) photoproduct by photolyase.*
- [224] T. Domratcheva, I. Schlichting, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 17793–17799. *Electronic structure of (6–4) DNA photoproduct repair involving a non-oxetane pathway.*
- [225] K. Sadeghian, M. Bocola, T. Merz, M. Schütz, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 16285–16295. *Theoretical study on the repair mechanism of the (6–4) photolesion by the (6–4) photolyase.*
- [226] J. Yamamoto, R. Martin, S. Iwai, P. Plaza, K. Brettel, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 7432–7436. *Repair of the (6–4) photoproduct by DNA photolyase requires two photons.*
- [227] R. D. Wood, M. Mitchell, J. Sgouros, T. Lindahl, *Science* **2001**, *291*, 1284–1289. *Human DNA repair genes.*
- [228] C. C. Chao, *FEBS Lett.* **1993**, *336*, 411–416. *Lack of DNA enzymatic photoreactivation in HeLa cell-free extracts.*
- [229] Y. F. Li, S. T. Kim, A. Sancar, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1993**, *90*, 4389–4393. *Evidence for lack of DNA photoreactivating enzyme in humans.*
- [230] R. D. Ley, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1993**, *90*, 4337. *Photoreactivation in humans.*
- [231] L. O. Essen, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2006**, *16*, 51–59. *Photolyases and cryptochromes: Common mechanisms of DNA repair and light-driven signaling?*
- [232] I. Chaves, R. Pokorny, M. Byrdin, N. Hoang, T. Ritz, K. Brettel, L. O. Essen, G. T. van der Horst, A. Batschauer, M. Ahmad, *Annu. Rev. Plant Biol.* **2011**, *62*, 335–364. *The cryptochromes: Blue light photoreceptors in plants and animals.*
- [233] C. Lin, *Trends Plant Sci.* **2000**, *5*, 337–342. *Plant blue-light receptors.*
- [234] D. P. King, J. S. Takahashi, *Annu. Rev. Neurosci.* **2000**, *23*, 713–742. *Molecular genetics of circadian rhythms in mammals.*
- [235] K. B. Henbest, K. Maeda, P. J. Hore, M. Joshi, A. Bacher, R. Bittl, S. Weber, C. R. Timmel, E. Schleicher, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2008**, *105*, 14395–14399. *Magnetic-field effect on the photoactivation reaction of Escherichia coli DNA photolyase.*
- [236] T. Ritz, S. Adem, K. Schulten, *Biophys. J.* **2000**, *78*, 707–718. *A model for photoreceptor-based magnetoreception in birds.*
- [237] R. Pokorny, T. Klar, U. Hennecke, T. Carell, A. Batschauer, L. O. Essen, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2008**, *105*, 21023–21027. *Recognition and repair of UV lesions in loop structures of duplex DNA by DASH-type cryptochrome.*
- [238] C. P. Selby, A. Sancar, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, *103*, 17696–17700. *A cryptochrome/photolyase class of enzymes with single-stranded DNA-specific photolyase activity.*
- [239] S. Burney, R. Wenzel, T. Kottke, T. Roussel, N. Hoang, J. P. Bouly, R. Bittl, J. Heberle, M. Ahmad, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 9356–9360. *Single amino acid substitution reveals latent photolyase activity in Arabidopsis cry1.*
- [240] R. Brudler, K. Hitomi, H. Daiyasu, H. Toh, K. Kucho, M. Ishiura, M. Kanehisa, V. A. Roberts, T. Todo, J. A. Tainer, E. D. Getzoff, *Mol. Cell* **2003**, *11*, 59–67. *Identification of a new cryptochrome class. Structure, function, and evolution.*



- [241] T. Klar, R. Pokorny, J. Moldt, A. Batschauer, L. O. Essen, *J. Mol. Biol.* **2007**, 366, 954–964. *Cryptochrome 3 from Arabidopsis thaliana: Structural and functional analysis of its complex with a folate light antenna.*
- [242] N. J. Baxter, L. F. Olguin, M. Golick, G. Feng, A. M. Hounslow, W. Bermel, G. M. Blackburn, F. Hollfelder, J. P. Waltho, N. H. Williams, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, 103, 14732–14737. *A trojan horse transition state analogue generated by MgF<sub>3</sub>-formation in an enzyme active site.*
- [243] C. A. Brautigam, B. S. Smith, Z. Ma, M. Palnitkar, D. R. Tomchick, M. Machius, J. Deisenhofer, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, 101, 12142–12147. *Structure of the photolyase-like domain of cryptochrome 1 from Arabidopsis thaliana.*
- [244] R. Banerjee, E. Schleicher, S. Meier, R. M. Viana, R. Pokorny, M. Ahmad, R. Bittl, A. Batschauer, *J. Biol. Chem.* **2007**, 282, 14916–14922. *The signaling state of Arabidopsis cryptochrome 2 contains flavin semiquinone.*
- [245] V. Balland, M. Byrdin, A. P. Eker, M. Ahmad, K. Brettel, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 426–427. *What makes the difference between a cryptochrome and DNA photolyase? A spectroelectrochemical comparison of the flavin redox transitions.*
- [246] F. Zhang, P. Scheerer, I. Oberpichler, T. Lamparter, N. Krauss, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2013**, 110, 7217–7222. *Crystal structure of a prokaryotic (6–4) photolyase with an Fe-S cluster and a 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine antenna chromophore.*
- [247] Y. Geisselbrecht, S. Fruhwirth, C. Schroeder, A. J. Pierik, G. Klug, L. O. Essen, *EMBO Rep.* **2012**, 13, 223–229. *CryB from Rhodobacter sphaeroides: A unique class of cryptochromes with new cofactors.*
- [248] A.-W. Struck, M. L. Thompson, L. S. Wong, J. Micklefield, *ChemBioChem* **2012**, 13, 2642–2655. *S-adenosyl-methionine-dependent methyltransferases: Highly versatile enzymes in biocatalysis, biosynthesis and other biotechnological applications.*
- [249] P. A. Frey, *Faseb J.* **1993**, 7, 662–670. *Lysine-2,3-aminomutase: Is adenosylmethionine a poor man's adenosylcobalamin?*
- [250] P. A. Frey, *Annu. Rev. Biochem.* **2001**, 70, 121–148. *Radical mechanisms of enzymatic catalysis.*
- [251] J. T. Jarrett, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2003**, 7, 174–182. *The generation of 5'-deoxyadenosyl radicals by adenosylmethionine-dependent radical enzymes.*
- [252] P. A. Frey, O. T. Magnusson, *Chem. Rev.* **2003**, 103, 2129–2148. *S-adenosylmethionine: A wolf in sheep's clothing, or a rich man's adenosylcobalamin?*
- [253] P. A. Frey, A. D. Hegeman, G. H. Reed, *Chem. Rev.* **2006**, 106, 3302–3316. *Free radical mechanisms in enzymology.*
- [254] A. Marquet, B. T. Bui, A. G. Smith, M. J. Warren, *Nat. Prod. Rep.* **2007**, 24, 1027–1040. *Iron-sulfur proteins as initiators of radical chemistry.*
- [255] S. C. Wang, P. A. Frey, *Trends Biochem. Sci.* **2007**, 32, 101–110. *S-adenosylmethionine as an oxidant: The radical SAM superfamily.*
- [256] S. J. Booker, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2009**, 13, 58–73. *Anaerobic functionalization of unactivated C-H bonds.*
- [257] S. J. Booker, T. L. Grove, *F1000 Biol. Rep.* **2010**, 2, 52. *Mechanistic and functional versatility of radical SAM enzymes.*
- [258] E. N. Marsh, D. P. Patterson, L. Li, *ChemBioChem* **2010**, 11, 604–621. *Adenosyl radical: Reagent and catalyst in enzyme reactions.*
- [259] M. Atta, E. Mulliez, S. Arragain, F. Forouhar, J. F. Hunt, M. Fontecave, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2010**, 20, 684–692. *S-adenosylmethionine-dependent radical-based modification of biological macromolecules.*
- [260] M. R. Challand, R. C. Driesener, P. L. Roach, *Nat. Prod. Rep.* **2011**, 28, 1696–1721. *Radical S-adenosylmethionine enzymes: Mechanism, control and function.*

- [261] P. L. Roach, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2011**, *15*, 267–275. *Radicals from S-adenosylmethionine and their application to biosynthesis.*
- [262] J. L. Vey, C. L. Drennan, *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 2487–2506. *Structural insights into radical generation by the radical SAM superfamily.*
- [263] M. J. Hiscox, R. C. Driesener, P. L. Roach, *Biochim. Biophys. Acta* **2012**, *1824*, 1165–1177. *Enzyme catalyzed formation of radicals from S-adenosylmethionine and inhibition of enzyme activity by the cleavage products.*
- [264] K. A. Shisler, J. B. Broderick, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2012**, *22*, 701–710. *Emerging themes in radical SAM chemistry.*
- [265] D. P. Dowling, J. L. Vey, A. K. Croft, C. L. Drennan, *Biochim. Biophys. Acta* **2012**, *1824*, 1178–1195. *Structural diversity in the AdoMet radical enzyme superfamily.*
- [266] H. J. Sofia, G. Chen, B. G. Hetzler, J. F. Reyes-Spindola, N. E. Miller, *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29*, 1097–1106. *Radical SAM, a novel protein superfamily linking unresolved steps in familiar biosynthetic pathways with radical mechanisms: Functional characterization using new analysis and information visualization methods.*
- [267] O. H. Warburg, *Heavy metal prosthetic groups and enzyme action*, Clarendon Press, Oxford, **1949**.
- [268] T. P. Chirpich, V. Zappia, R. N. Costilow, H. A. Barker, *J. Biol. Chem.* **1970**, *245*, 1778–1789. *Lysine-2,3-aminomutase. Purification and properties of a pyridoxal phosphate and S-adenosylmethionine-activated enzyme.*
- [269] B. W. Lepore, F. J. Ruzicka, P. A. Frey, D. Ringe, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2005**, *102*, 13819–13824. *The X-ray crystal structure of lysine-2,3-aminomutase from Clostridium subterminale.*
- [270] A. F. Wagner, M. Frey, F. A. Neugebauer, W. Schafer, J. Knappe, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1992**, *89*, 996–1000. *The free radical in pyruvate formate-lyase is located on glycine-734.*
- [271] J. Knappe, A. F. Wagner, *Adv. Protein Chem.* **2001**, *58*, 277–315. *Stable glycyl radical from pyruvate formate-lyase and ribonucleotide reductase (III).*
- [272] I. Sanyal, G. Cohen, D. H. Flint, *Biochemistry* **1994**, *33*, 3625–3631. *Biotin synthase: Purification, characterization as a [2Fe-2S]cluster protein, and in vitro activity of the Escherichia coli BioB gene product.*
- [273] F. Berkovitch, Y. Nicolet, J. T. Wan, J. T. Jarrett, C. L. Drennan, *Science* **2004**, *303*, 76–79. *Crystal structure of biotin synthase, an S-adenosylmethionine-dependent radical enzyme.*
- [274] P. A. Frey, A. D. Hegeman, F. J. Ruzicka, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **2008**, *43*, 63–88. *The radical SAM superfamily.*
- [275] A. Chatterjee, Y. Li, Y. Zhang, T. L. Grove, M. Lee, C. Krebs, S. J. Booker, T. P. Begley, S. E. Ealick, *Nat. Chem. Biol.* **2008**, *4*, 758–765. *Reconstitution of ThiC in thiamine pyrimidine biosynthesis expands the radical SAM superfamily.*
- [276] N. C. Martinez-Gomez, D. M. Downs, *Biochemistry* **2008**, *47*, 9054–9056. *ThiC is an [Fe-S] cluster protein that requires AdoMet to generate the 4-amino-5-hydroxymethyl-2-methylpyrimidine moiety in thiamin synthesis.*
- [277] R. M. Cicchillo, K. H. Lee, C. Baleanu-Gogonea, N. M. Nesbitt, C. Krebs, S. J. Booker, *Biochemistry* **2004**, *43*, 11770–11781. *Escherichia coli lipoyl synthase binds two distinct [4Fe-4S] clusters per polypeptide.*
- [278] F. Pierrel, T. Douki, M. Fontecave, M. Atta, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 47555–47563. *MiaB protein is a bifunctional radical-S-adenosylmethionine enzyme involved in thiolation and methylation of tRNA.*
- [279] K. H. Lee, L. Saleh, B. P. Anton, C. L. Madinger, J. S. Benner, D. F. Iwig, R. J. Roberts, C. Krebs, S. J. Booker, *Biochemistry* **2009**, *48*, 10162–10174. *Characterization of RimO, a new member of the methylthiotransferase subclass of the radical SAM superfamily.*

- [280] B. P. Anton, S. P. Russell, J. Vertrees, S. Kasif, E. A. Raleigh, P. A. Limbach, R. J. Roberts, *Nucleic Acids Res.* **2010**, 38, 6195–6205. *Functional characterization of the YmcB and YqeV tRNA methylthiotransferases of Bacillus subtilis.*
- [281] L. Fluhe, T. A. Knappe, M. J. Gattner, A. Schafer, O. Burghaus, U. Linne, M. A. Marahiel, *Nat. Chem. Biol.* **2012**, 8, 350–357. *The radical SAM enzyme Alba catalyzes thioether bond formation in subtilisin A.*
- [282] N. J. Cospér, S. J. Booker, F. Ruzicka, P. A. Frey, R. A. Scott, *Biochemistry* **2000**, 39, 15668–15673. *Direct FeS cluster involvement in generation of a radical in lysine-2,3-aminomutase.*
- [283] M. M. Cospér, G. N. Jameson, R. Davydov, M. K. Eidsness, B. M. Hoffman, B. H. Huynh, M. K. Johnson, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 14006–14007. *The [4Fe-4S](2+) cluster in reconstituted biotin synthase binds S-adenosyl-L-methionine.*
- [284] C. Krebs, W. E. Broderick, T. F. Henshaw, J. B. Broderick, B. H. Huynh, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 912–913. *Coordination of adenosylmethionine to a unique iron site of the [4Fe-4S] of pyruvate formate-lyase activating enzyme: A Mössbauer spectroscopic study.*
- [285] C. J. Walsby, D. Ortillo, W. E. Broderick, J. B. Broderick, B. M. Hoffman, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 11270–11271. *An anchoring role for FeS clusters: Chelation of the amino acid moiety of S-adenosylmethionine to the unique iron site of the [4Fe-4S] cluster of pyruvate formate-lyase activating enzyme.*
- [286] C. J. Walsby, W. Hong, W. E. Broderick, J. Cheek, D. Ortillo, J. B. Broderick, B. M. Hoffman, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 3143–3151. *Electron-nuclear double resonance spectroscopic evidence that S-adenosylmethionine binds in contact with the catalytically active [4Fe-4S](+) cluster of pyruvate formate-lyase activating enzyme.*
- [287] D. Chen, C. Walsby, B. M. Hoffman, P. A. Frey, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 11788–11789. *Coordination and mechanism of reversible cleavage of S-adenosylmethionine by the [4Fe-4S] center in lysine-2,3-aminomutase.*
- [288] P. A. Frey, G. H. Reed, *Arch. Biochem. Biophys.* **2000**, 382, 6–14. *Radical mechanisms in adenosylmethionine- and adenosylcobalamin-dependent enzymatic reactions.*
- [289] J. M. Demick, W. N. Lanzilotta, *Biochemistry* **2011**, 50, 440–442. *Radical SAM activation of the B12-independent glycerol dehydratase results in formation of 5'-deoxy-5'-(methylthio)adenosine and not 5'-deoxyadenosine.*
- [290] J. R. O'Brien, C. Raynaud, C. Croux, L. Girbal, P. Soucaille, W. N. Lanzilotta, *Biochemistry* **2004**, 43, 4635–4645. *Insight into the mechanism of the B12-independent glycerol dehydratase from Clostridium butyricum: Preliminary biochemical and structural characterization.*
- [291] E. L. Colichman, D. L. Love, *J. Org. Chem.* **1953**, 18, 40–46. *Polarography of sulfonium salts.*
- [292] G. T. Hinckley, P. A. Frey, *Anal. Biochem.* **2006**, 349, 103–111. *An adaptable spectroelectrochemical titrator: The midpoint reduction potential of the iron-sulfur center in lysine-2,3-aminomutase.*
- [293] S. C. Wang, P. A. Frey, *Biochemistry* **2007**, 46, 12889–12895. *Binding energy in the one-electron reductive cleavage of S-adenosylmethionine in lysine-2,3-aminomutase, a radical SAM enzyme.*
- [294] Y. Nicolet, J. K. Rubach, M. C. Posewitz, P. Amara, C. Mathevon, M. Atta, M. Fontecave, J. C. Fontecilla-Camps, *J. Biol. Chem.* **2008**, 283, 18861–18872. *X-ray structure of the [FeFe]-hydrogenase maturase HydE from Thermotoga maritima.*
- [295] Y. Nicolet, P. Amara, J. M. Mouesca, J. C. Fontecilla-Camps, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2009**, 106, 14867–14871. *Unexpected electron transfer mechanism upon AdoMet cleavage in radical SAM proteins.*

- [296] T. Kamachi, T. Kouno, K. Doitomi, K. Yoshizawa, *J. Inorg. Biochem.* **2011**, *105*, 850–857. *Generation of adenosyl radical from S-adenosylmethionine (SAM) in biotin synthase.*
- [297] M. M. Cosper, N. J. Cosper, W. Hong, J. E. Shokes, W. E. Broderick, J. B. Broderick, M. K. Johnson, R. A. Scott, *Protein Sci.* **2003**, *12*, 1573–1577. *Structural studies of the interaction of S-adenosylmethionine with the [4Fe-4S] clusters in biotin synthase and pyruvate formate-lyase activating enzyme.*
- [298] J. Hioe, H. Zipse, *Faraday Discuss.* **2010**, *145*, 301–313. *Radicals in enzymatic catalysis—a thermodynamic perspective.*
- [299] R. A. Kwiecien, I. V. Khavrutskii, D. G. Musaev, K. Morokuma, R. Banerjee, P. Paneth, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 1287–1292. *Computational insights into the mechanism of radical generation in B12-dependent methylmalonyl-CoA mutase.*
- [300] H. G. Viehe, R. Merényi, L. Stella, Z. Janousek, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1979**, *18*, 917–932. *Capto-dative substituent effects in syntheses with radicals and radicophiles [new synthetic methods (32)].*
- [301] H. G. Viehe, Z. Janousek, R. Merényi, L. Stella, *Accounts Chem. Res.* **1985**, *18*, 148–154. *The captodative effect.*
- [302] M. R. Challand, T. Ziegert, P. Douglas, R. J. Wood, M. Kriek, N. M. Shaw, P. L. Roach, *FEBS Lett.* **2009**, *583*, 1358–1362. *Product inhibition in the radical S-adenosylmethionine family.*
- [303] K. K. Siu, K. Asmus, A. N. Zhang, C. Horvatin, S. Li, T. Liu, B. Moffatt, V. L. Woods, Jr., P. L. Howell, *J. Struct. Biol.* **2011**, *173*, 86–98. *Mechanism of substrate specificity in 5'-methylthioadenosine/S-adenosylhomocysteine nucleosidases.*
- [304] C. E. Farrar, K. K. Siu, P. L. Howell, J. T. Jarrett, *Biochemistry* **2010**, *49*, 9985–9996. *Biotin synthase exhibits burst kinetics and multiple turnovers in the absence of inhibition by products and product-related biomolecules.*
- [305] Y. Nicolet, C. L. Drennan, *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, 4015–4025. *AdoMet radical proteins - from structure to evolution - alignment of divergent protein sequences reveals strong secondary structure element conservation.*
- [306] R. K. Wierenga, *FEBS Lett.* **2001**, *492*, 193–198. *The TIM-barrel fold: A versatile framework for efficient enzymes.*
- [307] A. K. Boal, T. L. Grove, M. I. McLaughlin, N. H. Yennawar, S. J. Booker, A. C. Rosenzweig, *Science* **2011**, *332*, 1089–1092. *Structural basis for methyl transfer by a radical SAM enzyme.*
- [308] S. Arragain, R. Garcia-Serres, G. Blondin, T. Douki, M. Clemancey, J. M. Latour, F. Forouhar, H. Neely, G. T. Montelione, J. F. Hunt, E. Mulliez, M. Fontecave, M. Atta, *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 5792–5801. *Post-translational modification of ribosomal proteins: Structural and functional characterization of RimO from Thermotoga maritima, a radical S-adenosylmethionine methylthiotransferase.*
- [309] P. Hanzelmann, H. Schindelin, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, *103*, 6829–6834. *Binding of 5'-GTP to the C-terminal FeS cluster of the radical S-adenosylmethionine enzyme MoaA provides insights into its mechanism.*
- [310] J. L. Vey, J. Yang, M. Li, W. E. Broderick, J. B. Broderick, C. L. Drennan, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2008**, *105*, 16137–16141. *Structural basis for glycyl radical formation by pyruvate formate-lyase activating enzyme.*
- [311] K. S. Duschene, S. E. Veneziano, S. C. Silver, J. B. Broderick, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2009**, *13*, 74–83. *Control of radical chemistry in the AdoMet radical enzymes.*
- [312] G. Layer, J. Moser, D. W. Heinz, D. Jahn, W. D. Schubert, *Embo J.* **2003**, *22*, 6214–6224. *Crystal structure of coproporphyrinogen III oxidase reveals cofactor geometry of radical SAM enzymes.*

- [313] W. L. Nicholson, N. Munakata, G. Horneck, H. J. Melosh, P. Setlow, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2000**, 64, 548–572. *Resistance of Bacillus endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments.*
- [314] Y. Xue, W. L. Nicholson, *Appl. Environ. Microbiol.* **1996**, 62, 2221–2227. *The two major spore DNA repair pathways, nucleotide excision repair and spore photoproduct lyase, are sufficient for the resistance of Bacillus subtilis spores to artificial UV-C and UV-B but not to solar radiation.*
- [315] P. Fajardo-Cavazos, C. Salazar, W. L. Nicholson, *J. Bacteriol.* **1993**, 175, 1735–1744. *Molecular cloning and characterization of the Bacillus subtilis spore photoproduct lyase (spl) gene, which is involved in repair of UV radiation-induced DNA damage during spore germination.*
- [316] N. Munakata, C. S. Rupert, *J. Bacteriol.* **1972**, 111, 192–198. *Genetically controlled removal of "spore photoproduct" from deoxyribonucleic acid of ultraviolet-irradiated Bacillus subtilis spores.*
- [317] T. C. Van Wang, C. S. Rupert, *Photochem. Photobiol.* **1977**, 25, 123–127. *Evidence for the monomerization of spore photoproduct to two thymines by the light-independent "spore repair" process in Bacillus subtilis.*
- [318] F. H. Ramirez-Guadiana, M. Barraza-Salas, N. Ramirez-Ramirez, M. Ortiz-Cortes, P. Setlow, M. Pedraza-Reyes, *J. Bacteriol.* **2012**, 194, 6096–6104. *Alternative excision repair of ultraviolet B- and C-induced DNA damage in dormant and developing spores of Bacillus subtilis.*
- [319] N. Munakata, *Mol. Gen. Genet.* **1969**, 104, 258–263. *Genetic analysis of a mutant of Bacillus subtilis producing ultraviolet-sensitive spores.*
- [320] N. Munakata, K. Hieda, K. Kobayashi, A. Ito, T. Ito, *Photochem. Photobiol.* **1986**, 44, 385–390. *Action spectra in ultraviolet wavelengths (150–250 nm) for inactivation and mutagenesis of Bacillus subtilis spores obtained with synchrotron radiation.*
- [321] M. Pedraza-Reyes, F. Gutierrez-Corona, W. L. Nicholson, *J. Bacteriol.* **1994**, 176, 3983–3991. *Temporal regulation and forespore-specific expression of the spore photoproduct lyase gene by sigma-G RNA polymerase during Bacillus subtilis sporulation.*
- [322] J. E. Donnellan, Jr., R. S. Stafford, *Biophys. J.* **1968**, 8, 17–28. *The ultraviolet photochemistry and photobiology of vegetative cells and spores of Bacillus megaterium.*
- [323] P. Fajardo-Cavazos, R. Rebeil, W. L. Nicholson, *Curr. Microbiol.* **2005**, 51, 331–335. *Essential cysteine residues in Bacillus subtilis spore photoproduct lyase identified by alanine scanning mutagenesis.*
- [324] R. Rebeil, Y. Sun, L. Chooback, M. Pedraza-Reyes, C. Kinsland, T. P. Begley, W. L. Nicholson, *J. Bacteriol.* **1998**, 180, 4879–4885. *Spore photoproduct lyase from Bacillus subtilis spores is a novel iron-sulfur DNA repair enzyme which shares features with proteins such as class III anaerobic ribonucleotide reductases and pyruvate-formate lyases.*
- [325] A. Chandor-Proust, O. Berteau, T. Douki, D. Gasparutto, S. Ollagnier-de-Choudens, M. Fontecave, M. Atta, *J. Biol. Chem.* **2008**, 283, 36361–36368. *DNA repair and free radicals, new insights into the mechanism of spore photoproduct lyase revealed by single amino acid substitution.*
- [326] J. M. Buis, J. Cheek, E. Kalliri, J. B. Broderick, *J. Biol. Chem.* **2006**, 281, 25994–26003. *Characterization of an active spore photoproduct lyase, a DNA repair enzyme in the radical S-adenosylmethionine superfamily.*
- [327] S. C. Silver, T. Chandra, E. Zilinskas, S. Ghose, W. E. Broderick, J. B. Broderick, *J. Biol. Inorg. Chem.* **2010**, 15, 943–955. *Complete stereospecific repair of a synthetic dinucleotide spore photoproduct by spore photoproduct lyase.*
- [328] L. Yang, G. Lin, R. S. Nelson, Y. Jian, J. Telser, L. Li, *Biochemistry* **2012**, 51, 7173–7188. *Mechanistic studies of the spore photoproduct lyase via a single cysteine mutation.*

- [329] K. B. Song, P. A. Frey, *J. Biol. Chem.* **1991**, 266, 7651–7655. *Molecular properties of lysine-2,3-aminomutase.*
- [330] W. L. Nicholson, L. Chooback, P. Fajardo-Cavazos, *Mol. Gen. Genet.* **1997**, 255, 587–594. *Analysis of spore photoproduct lyase operon (splAB) function using targeted deletion-insertion mutations spanning the Bacillus subtilis operons ptsHI and splAB.*
- [331] T. A. Slieman, R. Rebeil, W. L. Nicholson, *J. Bacteriol.* **2000**, 182, 6412–6417. *Spore photoproduct (SP) lyase from Bacillus subtilis specifically binds to and cleaves SP (5-thyminy-5,6-dihydrothymine) but not cyclobutane pyrimidine dimers in UV-irradiated DNA.*
- [332] R. A. Mehl, T. P. Begley, *Org. Lett.* **1999**, 1, 1065–1066. *Mechanistic studies on the repair of a novel DNA photolesion: The spore photoproduct.*
- [333] K. Yokoyama, M. Numakura, F. Kudo, D. Ohmori, T. Eguchi, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 15147–15155. *Characterization and mechanistic study of a radical SAM dehydrogenase in the biosynthesis of butirosin.*
- [334] P. H. Szu, M. W. Rusczycky, S. H. Choi, F. Yan, H. W. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 14030–14042. *Characterization and mechanistic studies of DesII: A radical S-adenosyl-L-methionine enzyme involved in the biosynthesis of TDP-D-desosamine.*
- [335] G. Fuchs, *Allgemeine Mikrobiologie*, 8th ed., Georg Thieme Verlag, Stuttgart/New York, **2007**.
- [336] J. Ghosh, P. Larsson, B. Singh, B. M. F. Pettersson, N. M. Islam, S. N. Sarkar, S. Dasgupta, L. A. Kirsebom, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2009**, 106, 10781–10786. *Sporulation in Mycobacteria.*
- [337] C. E. Bagwell, S. Bhat, G. M. Hawkins, B. W. Smith, T. Biswas, T. R. Hoover, E. Saunders, C. S. Han, O. V. Tsodikov, L. J. Shinkets, *PLoS One* **2008**, 3, e3878. *Survival in nuclear waste, extreme resistance, and potential applications gleaned from the genome sequence of kineococcus radiotolerans SRS30216.*
- [338] D. N. Fredricks, *Introduction to the rickettsiales and other intracellular prokaryotes*, in *The prokaryotes, a handbook of the biology of bacteria*, 3rd ed. (Eds.: M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer, E. Stackebrandt), Springer-Verlag, New York, **2006**.
- [339] A. C. Kneuttinger, *Master's Thesis*, T. Carell, Technische Universität München **2010**. *Isolation and characterisation of spore photoproduct lyase from Geobacillus stearothermophilus.*
- [340] K. S. Hagen, J. G. Reynolds, R. H. Holm, *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, 103, 4054–4063. *Definition of reaction sequences resulting in self-assembly of [Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub>(SR)<sub>4</sub>]<sup>2-</sup> clusters from simple reactants.*
- [341] C. Krebs, T. F. Henshaw, J. Cheek, B. H. Huynh, J. B. Broderick, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 12497–12506. *Conversion of 3Fe-4S to 4Fe-4S clusters in native pyruvate formate-lyase activating enzyme: Mössbauer characterization and implications for mechanism.*
- [342] S. J. Lippard, J. M. Berg, S. Müller-Becker, *Bioanorganische Chemie*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, **1995**.
- [343] S. M. Kelly, T. J. Jess, N. C. Price, *Biochim. Biophys. Acta* **2005**, 1751, 119–139. *How to study proteins by circular dichroism.*
- [344] X. Yang, S. V. Kathuria, R. Vadrevu, C. R. Matthews, *PLoS One* **2009**, 4, e7179. *Betaalpha-hairpin clamps brace betaalphabeta modules and can make substantive contributions to the stability of TIM barrel proteins.*
- [345] S. Haldar, S. Paul, N. Joshi, A. Dasgupta, K. Chattopadhyay, *PLoS One* **2012**, 7, e31797. *The presence of the iron-sulfur motif is important for the conformational stability of the antiviral protein, viperin.*

- [346] ExPASy – Bioinformatics Resource Portal: Compute pI/Mw, *Swiss Institute of Bioinformatics*, [http://web.expasy.org/compute\\_pi/](http://web.expasy.org/compute_pi/)
- [347] E. E. Carlson, L. L. Kiessling, *J. Org. Chem.* **2004**, 69, 2614–2617. *Improved chemical syntheses of 1- and 5-deazariboflavin.*
- [348] D. E. Bergstrom, K. F. Rash, *J. Org. Chem.* **1979**, 44, 1414–1417. *Synthesis of 5,6-dihydro-5-(alpha-thyminy)thymine.*
- [349] A. C. Kneutinger, K. Heil, G. Kashiwazaki, T. Carell, *Chem. Commun.* **2013**, 49, 722–724. *The radical SAM enzyme spore photoproduct lyase employs a tyrosyl radical for DNA repair.*
- [350] R. A. Copeland, *Enzymes: A practical introduction to structure, mechanism, and data analysis*, Wiley-VCH, New York, **2000**.
- [351] A. M. Taylor, C. E. Farrar, J. T. Jarrett, *Biochemistry* **2008**, 47, 9309–9317. *9-mercaptopdethiobiotin is formed as a competent catalytic intermediate by Escherichia coli biotin synthase.*
- [352] R. M. Cicchillo, D. F. Iwig, A. D. Jones, N. M. Nesbitt, C. Baleanu-Gogonea, M. G. Souder, L. Tu, S. J. Booker, *Biochemistry* **2004**, 43, 6378–6386. *Lipoyl synthase requires two equivalents of S-adenosyl-L-methionine to synthesize one equivalent of lipoic acid.*
- [353] M. R. Challand, F. T. Martins, P. L. Roach, *J. Biol. Chem.* **2010**, 285, 5240–5248. *Catalytic activity of the anaerobic tyrosine lyase required for thiamine biosynthesis in Escherichia coli.*
- [354] T. L. Grove, K. H. Lee, J. St Clair, C. Krebs, S. J. Booker, *Biochemistry* **2008**, 47, 7523–7538. *In vitro characterization of AtsB, a radical SAM formylglycine-generating enzyme that contains three [4Fe-4S] clusters.*
- [355] J. Miller, V. Bandarian, G. H. Reed, P. A. Frey, *Arch. Biochem. Biophys.* **2001**, 387, 281–288. *Inhibition of lysine-2,3-aminomutase by the alternative substrate 4-thialysine and characterization of the 4-thialysyl radical intermediate.*
- [356] L. Yang, R. S. Nelson, A. Benjdia, G. Lin, J. Telser, S. Stoll, I. Schlichting, L. Li, *Biochemistry* **2013**, 52, 3041–3050. *A radical transfer pathway in spore photoproduct lyase.*
- [357] D. Guianvarc'h, D. Florentin, B. Tse Sum Bui, F. Nunzi, A. Marquet, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1997**, 236, 402–406. *Biotin synthase, a new member of the family of enzymes which uses S-adenosylmethionine as a source of deoxyadenosyl radical.*
- [358] S. Ollagnier-de Choudens, Y. Sanakis, K. S. Hewitson, P. Roach, E. Munck, M. Fontecave, *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 13449–13454. *Reductive cleavage of S-adenosylmethionine by biotin synthase from Escherichia coli.*
- [359] G. Layer, K. Grage, T. Teschner, V. Schunemann, D. Breckau, A. Masoumi, M. Jahn, P. Heathcote, A. X. Trautwein, D. Jahn, *J. Biol. Chem.* **2005**, 280, 29038–29046. *Radical S-adenosylmethionine enzyme coproporphyrinogen III oxidase HemN: Functional features of the [4Fe-4S] cluster and the two bound S-adenosyl-L-methionines.*
- [360] N. B. Ugulava, K. K. Frederick, J. T. Jarrett, *Biochemistry* **2003**, 42, 2708–2719. *Control of adenosylmethionine-dependent radical generation in biotin synthase: A kinetic and thermodynamic analysis of substrate binding to active and inactive forms of BioB.*
- [361] J. Hioe, G. Savasci, H. Brand, H. Zipse, *Chem. Eur. J.* **2011**, 17, 3781–3789. *The stability of C $\alpha$  peptide radicals: Why glycyl radical enzymes?*
- [362] G. T. Babcock, B. A. Barry, R. J. Debus, C. W. Hoganson, M. Atamian, L. McIntosh, I. Sithole, C. F. Yocum, *Biochemistry* **1989**, 28, 9557–9565. *Water oxidation in photosystem II: From radical chemistry to multielectron chemistry.*
- [363] C. L. Atkin, L. Thelander, P. Reichard, G. Lang, *J. Biol. Chem.* **1973**, 248, 7464–7472. *Iron and free radical in ribonucleotide reductase. Exchange of iron and Mössbauer spectroscopy of the protein B2 subunit of the Escherichia coli enzyme.*

- [364] A. R. Offenbacher, J. Chen, B. A. Barry, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 6978–6988. *Perturbations of aromatic amino acids are associated with iron cluster assembly in ribonucleotide reductase.*
- [365] L. Petersson, A. Graslund, A. Ehrenberg, B. M. Sjöberg, P. Reichard, *J. Biol. Chem.* **1980**, *255*, 6706–6712. *The iron center in ribonucleotide reductase from Escherichia coli.*
- [366] A. B. Tomter, G. Zoppellaro, F. Schmitzberger, N. H. Andersen, A. L. Barra, H. Engman, P. Nordlund, K. K. Andersson, *PLoS One* **2011**, *6*, e25022. *HF-EPR, Raman, UV/VIS light spectroscopic, and DFT studies of the ribonucleotide reductase R2 tyrosyl radical from epstein-barr virus.*
- [367] C. Kolano, W. Sander, *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, *2003*, 1074–1079. *Snm as a photolabile protecting group for the cysteinyl radical – direct evidence from time-resolved IR and UV/Vis spectroscopies.*
- [368] E. E. Di Iorio, *Preparation of derivatives of ferrous and ferric hemoglobin*, in *Methods Enzymol.*, Vol. 76 (Eds.: E. Antonini, L. Rossi-Bernardi, E. Chiancone), Academic Press, **1981**, p. 58.
- [369] W. R. Hagen, *Biomolecular EPR Spectroscopy*, CRC Press, Boca Raton, **2009**.
- [370] A. J. Stone, *Proc. R. soc. Lond. A* **1963**, *271*, 424–434. *Gauge invariance of the g tensor.*
- [371] K. K. Andersson, P. P. Schmidt, B. Katterle, K. R. Strand, A. E. Palmer, S. K. Lee, E. I. Solomon, A. Graslund, A. L. Barra, *J. Biol. Inorg. Chem.* **2003**, *8*, 235–247. *Examples of high-frequency EPR studies in bioinorganic chemistry.*
- [372] D. A. Svistunenko, G. A. Jones, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2009**, *11*, 6600–6613. *Tyrosyl radicals in proteins: A comparison of empirical and density functional calculated EPR parameters.*
- [373] M. Knipp, J. J. Taing, C. He, *J. Inorg. Biochem.* **2011**, *105*, 1405–1412. *Reduction of the lipocalin type heme containing protein nitrophorin -- sensitivity of the fold-stabilizing cysteine disulfides toward routine heme-iron reduction.*
- [374] O. T. Magnusson, G. H. Reed, P. A. Frey, *Biochemistry* **2001**, *40*, 7773–7782. *Characterization of an allylic analogue of the 5'-deoxyadenosyl radical: An intermediate in the reaction of lysine-2,3-aminomutase.*
- [375] F. Himo, A. Graslund, L. A. Eriksson, *Biophys. J.* **1997**, *72*, 1556–1567. *Density functional calculations on model tyrosyl radicals.*
- [376] J. I. Friedman, J. T. Stivers, *Biochemistry* **2010**, *49*, 4957–4967. *Detection of damaged DNA bases by DNA glycosylase enzymes.*
- [377] M. R. Seyedsayamdost, C. S. Yee, S. Y. Reece, D. G. Nocera, J. Stubbe, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 1562–1568. *pH rate profiles of FnY356-R2s (n = 2, 3, 4) in Escherichia coli ribonucleotide reductase: Evidence that Y356 is a redox-active amino acid along the radical propagation pathway.*
- [378] M. R. Seyedsayamdost, S. Y. Reece, D. G. Nocera, J. Stubbe, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 1569–1579. *Mono-, di-, tri-, and tetra-substituted fluorotyrosines: New probes for enzymes that use tyrosyl radicals in catalysis.*
- [379] E. C. Minnihan, D. D. Young, P. G. Schultz, J. Stubbe, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 15942–15945. *Incorporation of fluorotyrosines into ribonucleotide reductase using an evolved, polyspecific aminoacyl-tRNA synthetase.*
- [380] M. R. Seyedsayamdost, C. S. Yee, J. Stubbe, *Nat. protoc.* **2007**, *2*, 1225–1235. *Site-specific incorporation of fluorotyrosines into the R2 subunit of E. coli ribonucleotide reductase by expressed protein ligation.*
- [381] Invitrogen, in *Technical Resource Guide*, 4th ed., Invitrogen Corporation, **2006**.
- [382] T. D. Pollard, *Mol. Biol. Cell* **2010**, *21*, 4061–4067. *A guide to simple and informative binding assays.*
- [383] C. M. Porter, B. G. Miller, *Bioorganic Chem.* **2012**, *43*, 44–50. *Cooperativity in monomeric enzymes with single ligand-binding sites.*



- [384] A. V. Hill, *J. Physiol.* **1910**, 40, 389–403. *The heat produced in contracture and muscular tone.*
- [385] E. Zilinskas, *Dissertation*, J. B. Broderick, Montana State University (Bozeman, Montana), **2010**. *Binding and repair of DNA by spore photoproduct lyase.*
- [386] B. W. Allan, N. O. Reich, *Biochemistry* **1996**, 35, 14757–14762. *Targeted base stacking disruption by the EcoRI DNA methyltransferase.*
- [387] B. Holz, S. Klimasauskas, S. Serva, E. Weinhold, *Nucleic Acids Res.* **1998**, 26, 1076–1083. *2-aminopurine as a fluorescent probe for DNA base flipping by methyltransferases.*
- [388] A. K. McCullough, M. L. Dodson, O. D. Scharer, R. S. Lloyd, *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 27210–27217. *The role of base flipping in damage recognition and catalysis by T4 endonuclease V.*
- [389] R. P. Bandwar, S. S. Patel, *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 14075–14082. *Peculiar 2-aminopurine fluorescence monitors the dynamics of open complex formation by bacteriophage T7 RNA polymerase.*
- [390] G. B. Sancar, F. W. Smith, R. Reid, G. Payne, M. Levy, A. Sancar, *J. Biol. Chem.* **1987**, 262, 478–485. *Action mechanism of Escherichia coli DNA photolyase. I. Formation of the enzyme-substrate complex.*
- [391] S. E. Halford, J. F. Marko, *Nucleic Acids Res.* **2004**, 32, 3040–3052. *How do site-specific DNA-binding proteins find their targets?*
- [392] M. I. Ponferrada-Marin, T. Roldan-Arjona, R. R. Ariza, *Nucleic Acids Res.* **2012**, 40, 11554–11562. *Demethylation initiated by ROS1 glycosylase involves random sliding along DNA.*
- [393] D. S. Daniels, T. T. Woo, K. X. Luu, D. M. Noll, N. D. Clarke, A. E. Pegg, J. A. Tainer, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2004**, 11, 714–720. *DNA binding and nucleotide flipping by the human DNA repair protein AGT.*
- [394] D. E. Atkinson, J. A. Hathaway, E. C. Smith, *J. Biol. Chem.* **1965**, 240, 2682–2690. *Kinetics of regulatory enzymes. Kinetic order of the yeast diphosphopyridine nucleotide isocitrate dehydrogenase reaction and a model for the reaction.*
- [395] D. E. Atkinson, G. M. Walton, *J. Biol. Chem.* **1965**, 240, 757–763. *Kinetics of regulatory enzymes. Escherichia coli phosphofructokinase.*
- [396] G. S. Adair, A. V. Bock, H. Field, *J. Biol. Chem.* **1925**, 63, 529–545. *The hemoglobin system: VI. The oxygen dissociation curve of hemoglobin.*
- [397] A. C. Storer, A. Cornish-Bowden, *Biochem. J.* **1976**, 159, 7–14. *Kinetics of rat liver glucokinase. Co-operative interactions with glucose at physiologically significant concentrations.*
- [398] G. R. Ainslie, Jr., J. P. Shill, K. E. Neet, *J. Biol. Chem.* **1972**, 247, 7088–7096. *Transients and cooperativity. A slow transition model for relating transients and cooperative kinetics of enzymes.*
- [399] Z. D. Hill, P. MacCarthy, *J. Chem. Educ.* **1986**, 63, 162–167. *Novel approach to Job's method.*
- [400] K. Paspaleva, G. F. Moolenaar, N. Goosen, *DNA Repair* **2009**, 8, 600–611. *Damage recognition by UV damage endonuclease from Schizosaccharomyces pombe.*
- [401] A. C. Pike, B. Shrestha, V. Popuri, N. Burgess-Brown, L. Muzzolini, S. Costantini, A. Vindigni, O. Gileadi, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2009**, 106, 1039–1044. *Structure of the human RECQ1 helicase reveals a putative strand-separation pin.*
- [402] S. M. Law, M. Feig, *Biophys. J.* **2011**, 101, 2223–2231. *Base-flipping mechanism in postmismatch recognition by MutS.*
- [403] M. H. Lamers, A. Perrakis, J. H. Enzlin, H. H. Winterwerp, N. de Wind, T. K. Sixma, *Nature* **2000**, 407, 711–717. *The crystal structure of DNA mismatch repair protein MutS binding to a G x T mismatch.*

- [404] J. M. Mason, R. H. Hackett, P. Setlow, *J. Bacteriol.* **1988**, 170, 239-244. *Regulation of expression of genes coding for small, acid-soluble proteins of Bacillus subtilis spores: Studies using lacZ gene fusions.*
- [405] N. A. Kuznetsov, Y. N. Vorobjev, L. N. Krasnoperov, O. S. Fedorova, *Nucleic Acids Res.* **2012**, 40, 7384–7392. *Thermodynamics of the multi-stage DNA lesion recognition and repair by formamidopyrimidine-DNA glycosylase using pyrrolocytosine fluorescence--stopped-flow pre-steady-state kinetics.*
- [406] W. Kaim, B. Schwederski, *Bioanorganische Chemie*, 4th ed., Teubner, Wiesbaden, **2005**.
- [407] R. Malkin, J. C. Rabinowitz, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1966**, 23, 822-827. *The reconstitution of clostridial ferredoxin.*
- [408] M. M. Bradford, *Anal. Biochem.* **1976**, 72, 248-254. *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.*
- [409] M. J. Gattner, M. Vrabel, T. Carell, *Chem. Commun.* **2013**, 49, 379–381. *Synthesis of epsilon-N-propionyl-, epsilon-N-butyryl-, and epsilon-N-crotonyl-lysine containing histone H3 using the pyrrolysine system.*
- [410] S. Stoll, A. Schweiger, *Journal of magnetic resonance* **2006**, 178, 42-55. *Easyspin, a comprehensive software package for spectral simulation and analysis in EPR.*
- [411] *Praktikumsbuch zum physikalischen Praktikum Weihenstephan*, C. Scharnagel, Lehrstuhl für Physik Weihenstephan der Technischen Universität München, Freising, **2004/2005/2006**.