

**Strukturelle und funktionelle Charakterisierung eines neuartigen
bakteriellen Cryptochroms sowie Analysen von mikrobiellen Photolyasen**

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

dem

Fachbereich Chemie
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Dipl.-Chem. Yann Geisselbrecht

aus Biebertal

Marburg an der Lahn, 2013

Vom Fachbereich Chemie der Philipps-Universität Marburg (Hochschulkennziffer 1180) als
Dissertation am _____ angenommen.

Erstgutachter: Prof. Dr. Lars-Oliver Essen
Fachbereich Chemie, Philipps-Universität Marburg

Zweitgutachter: Prof. Dr. Alfred Batschauer
Fachbereich Biologie, Philipps-Universität Marburg

Tag der Disputation: 27.03.2013

Die Untersuchungen zur vorliegenden Dissertation wurden in der Zeit vom November 2009 bis zum November 2012 unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Lars-Oliver Essen an der Philipps-Universität Marburg und zum Teil an der Nanyang Technological University (NTU) Singapur durchgeführt.

Erklärung

(gemäß § 10, Abs. 1 der Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen
Fachbereiche und des Medizinischen Fachbereichs für seine mathematisch-
naturwissenschaftlichen Fächer der Philipps-Universität Marburg vom 15.07.2009)

Ich erkläre, dass eine Promotion noch an keiner anderen Hochschule als der Philipps-Universität Marburg, Fachbereich Chemie, versucht wurde.

Ich versichere, dass ich meine vorliegende Dissertation mit dem Titel

**„Strukturelle und funktionelle Charakterisierung eines neuartigen bakteriellen
Cryptochroms sowie Analysen von mikrobiellen Photolyasen“**

selbst und ohne fremde Hilfe verfasst, nicht andere als die in ihr angegebenen Quellen oder Hilfsmittel benutzt, alle vollständig oder sinngemäß übernommenen Zitate als solche gekennzeichnet sowie die Dissertation in der vorliegenden oder in einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen in- oder ausländischen Hochschule anlässlich eines Promotionsgesuchs oder zu anderen Prüfungszwecken eingereicht habe.

Ort, Datum

Unterschrift Yann Geisselbrecht

Publikationen:

Der Großteil der hier vorgestellten Arbeiten wurde bereits in den folgenden Publikationen veröffentlicht:

Geisselbrecht Y., Frühwirth S., Schroeder C., Pierik A.J., Klug G., Essen L-O., *CryB from Rhodobacter sphaeroides: a unique class of cryptochromes with new cofactors.*, EMBO Reports **2012**, 13:223-9.

Kiontke S., Geisselbrecht Y., Pokorny R., Carell T., Batschauer A., Essen L-O., *Crystal structures of an archaeal class II DNA photolyase and its complex with UV-damaged duplex DNA.*, EMBO Journal **2011**, 30::4437-49.

Weitere Publikationen, deren Arbeiten nicht in diese Dissertation eingeflossen sind:

Blanck S., Geisselbrecht Y., Kräling K., Middel S., Mietke T., Harms K., Essen L-O., Meggers E., *Bioactive cyclometalated phthalimides: design, synthesis and kinase inhibition.*, Dalton Transactions **2012**, 41:9337-48.

Eigener Anteil: Strukturlösung des Proteins Pim1 mit dem gebundenen Phtalimid-Ruthenium-Komplexinhibitor RPS, die Strukturdaten sind in der pdb unter dem Zugriffscode **4AS0** hinterlegt.

Feng L., Geisselbrecht Y., Blanck S., Wilbuer A., Atilla-Gokcumen G.E., Filippakopoulos P., Kräling K., Celik M.A., Harms K., Maksimoska J., Marmorstein R., Frenking G., Knapp .S, Essen L-O., Meggers E., *Structurally sophisticated octahedral metal complexes as highly selective protein kinase inhibitors.*, Journal of the American Chemical Society **2011**, 133:5976-86.

Eigener Anteil: Strukturlösung des Proteins Dapk1 mit dem gebundenen Ruthenium-Oktasporin-Inhibitor OSV, die Strukturdaten sind in der pdb unter dem Zugriffscode **2YAK** hinterlegt.

Moldt J., Pokorny R., Orth C., Linne U., Geisselbrecht Y., Marahiel MA., Essen L-O., Batschauer A., *Photoreduction of the folate cofactor in members of the photolyase family.*, Journal of Biological Chemistry **2009**, 284:21670-83.

Eigener Anteil: Spektroskopische Untersuchungen zur lichtgetriebenen MTHF-Reduktaseaktivität der *E. coli* Photolyase.

Wissenschaftlicher Werdegang:

Yann Geisselbrecht

geboren am 02.12.1983 in Köln

Email: yanng (at) web.de

November 2009 – März 2013

Promotion

Philipps-Universität Marburg, Fachbereich Chemie

Arbeitsgruppe Prof. Dr. Lars-Oliver Essen

Januar 2009 – September 2009

Diplomarbeit

Philipps-Universität Marburg, Fachbereich Chemie

Arbeitsgruppe Prof. Dr. Lars-Oliver Essen

Oktober 2004 – September 2009

Studium der Chemie

Philipps-Universität Marburg

Juni 2003

allgemeine Hochschulreife

Landgraf-Ludwig-Schule Gießen

„So eine Arbeit wird eigentlich nie fertig, man muss sie für fertig erklären, wenn man nach Zeit und Umständen das möglichste getan hat.“

– Johann Wolfgang von Goethe (1749-1832)

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	13
Summary.....	15
1. Einleitung.....	17
1.1. <i>Licht, einer der wichtigsten physikalischen Reize und Lebensquelle.....</i>	17
1.2. <i>Flavine sind wichtige biochemische Kofaktoren.....</i>	18
1.3. <i>Flavin enthaltenden Photorezeptordomänen.....</i>	20
1.4. <i>Die Photolyase/Cryptochrom Superfamilie.....</i>	21
1.5. <i>Der katalytische Kofaktor FAD in der PCSf.....</i>	23
1.6. <i>Funktionsprinzipien von Cryptochromen und Photolyasen.....</i>	24
1.6.1. <i>Cryptochrome sind die zentralen Blaulichtrezeptoren in Pflanzen.....</i>	24
1.6.2. <i>Tierische Cryptochrome regulieren die circadiane Uhr.....</i>	25
1.6.3. <i>Cryptochrome in der Magnetorezeption.....</i>	27
1.6.4. <i>Photolyasen injizieren lichtabhängig Elektronen auf DNA-Photoläsionen.....</i>	27
1.6.5. <i>Mikrobielle Cryptochrome zeigen duale Funktionen in vivo.....</i>	28
1.7. <i>Der kanonische Typ der PCSf.....</i>	29
1.7.1. <i>Der N5-Stickstoff wird im kanonischen Typ von der gleichen Position aus gebunden.....</i>	29
1.7.2. <i>Die Reduktionskaskade des kanonischen Typs der PCSf.....</i>	31
1.8. <i>Antennenchromophore in der Photolyasen/Cryptochrom-Superfamilie.....</i>	32
1.9. <i>DNA-Bindung durch Photolyasen und Cryptochrome.....</i>	33
1.10. <i>Kinetik der CPD-Reparatur durch die EcCPDI.....</i>	35
1.11. <i>Das Purpurbakterium Rhodobacter sphaeroides.....</i>	36
1.11.1. <i>Die Regulation der Photosynthese in R. sphaeroides.....</i>	37
1.11.2. <i>Das Cryptochrom B aus R. sphaeroides.....</i>	38
2. Motivation und Zielsetzung.....	39
3. Material und Methoden.....	40
3.1. <i>In dieser Arbeit verwendete Materialien.....</i>	40
3.1.1. <i>Auflistung der verwendeten Geräte, Programme sowie Webtools.....</i>	40
3.1.2. <i>Auflistung der Verbrauchsmaterialien, Chemikalien und Enzyme.....</i>	43
3.1.3. <i>Beschreibung der verwendeten Bakterienstämme.....</i>	45
3.1.3.1. <i>Escherichia coli DH5α99.....</i>	45
3.1.3.2. <i>Escherichia coli BL21(DE3)Gold.....</i>	45
3.1.3.3. <i>Escherichia coli Rosetta.....</i>	46
3.1.4. <i>DNA-Oligonukleotide und Vektoren.....</i>	46
3.1.4.1. <i>Auflistung der DNA-Oligonukleotide.....</i>	46
3.1.4.2. <i>Vektoren.....</i>	48
3.1.5. <i>Kulturmedien, Stammlösungen und Puffer.....</i>	49
3.1.5.1. <i>Kulturmedien zur Anzucht von Escherichia coli.....</i>	49

Inhaltsverzeichnis

3.1.5.2. Stammlösungen.....	50
3.1.5.3. Übersicht über die verwendeten Puffer in dieser Arbeit.....	50
3.2. Mikrobiologische und molekularbiologische Methoden.....	56
3.2.1. Präparation chemisch kompetenter Zellen und deren Transformation.....	56
3.2.2. Die Agarosegelelektrophorese.....	56
3.2.3. Präparation von Plasmiden aus <i>E. coli</i> Übernachtskulturen.....	56
3.2.3.1. Plasmidpräparation über das QIAprep spin MiniPrep Kit.....	57
3.2.3.2. Plasmidpräparation durch Alkoholpräzipitation nach Birnboim & Doly.....	57
3.2.4. Gentechnische Methodik zur Herstellung von Expressionsplasmiden.....	57
3.2.5. Gezielter Austausch von einzelnen Nukleotiden auf genetischer Ebene (Mutagenese-PCR).....	58
3.3. Proteinchemische Methoden.....	59
3.3.1. Kultivierung von <i>E. coli</i> und Produktion rekombinanter Proteine.....	59
3.3.2. Proteinextraktion durch Immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC).....	60
3.3.3. Selektive Reinigung von DNA bindenden Proteinen durch Heparin Affinitätschromatographie.....	61
3.3.4. Proteintrennung durch Größenausschlusschromatographie (SEC).....	62
3.3.5. Langzeitlagerung der MmCPDII.....	62
3.3.6. Identifikation möglicher Antennenchromophore durch Mikrodialyse.....	63
3.4. Analytische Methoden.....	63
3.4.1. Konzentrationsbestimmungen von Proteinlösungen.....	63
3.4.2. Analyse von Proteinen durch die SDS-PAGE.....	64
3.4.3. Massenspektrometrische Analysen.....	64
3.4.4. Western-Blot mit Anti-His-HRP-Konjugat und ECL Detektion.....	65
3.4.5. UV/Vis-Spektroskopie.....	66
3.4.6. Bestimmung des Besetzungsgrades von FeS-Clustern.....	66
3.4.6.1. Vorgehensweise zur Eisenbestimmung.....	67
3.4.6.2. Bestimmung des Gehalts an säurelabilem Schwefel.....	67
3.4.7. Reduktionsassays von Cryptochromen und Photolyasen.....	67
3.4.8. Elektrophoretic mobility shift assays (EMSA) zur Bestimmung von Protein-DNA Dissoziationskonstanten.....	68
3.5. Ultrakurzzeitspektroskopie time correlated single photon counting (TCSPC).....	70
3.5.1. Die Probenvorbereitung.....	70
3.5.1.1. Vorbereitung von Experimenten im Peltier-Element-Setup.....	71
3.5.1.2. Vorbereitung von Experimenten im Kryostat.....	72
3.5.2. Das experimentelle Setup.....	72
3.6. Kristallisation von Proteinen und Röntgenstrukturanalyse.....	73
3.6.1. Initiales Auffinden und Optimierung von Kristallisationsbedingungen.....	73
3.6.2. Microseeding.....	74
3.6.3. Vorbereitung von Kristallen für Röntgenbeugungsexperimente.....	75
3.6.4. Datensammlung in Röntgenbeugungsexperimenten.....	75
3.6.5. Strukturlösung aus Röntgendaten.....	76
3.6.5.1. Lösen des Phasenproblems durch single wavelength anomalous dispersion (SAD).....	77
3.6.5.2. Lösen des Phasenproblems durch molekularen Ersatz (MR).....	77
3.6.5.3. Strukturlösung von RsCryB.....	78
3.6.6. Strategien zur Entwicklung von Ligandenbibliotheken für REFMAC5.....	78

Inhaltsverzeichnis

4. Ergebnisse.....	81
4.1. Untersuchungen zum Cryptochrom B aus Rhodobacter sphaeroides.....	81
4.1.1. Phylogenetische Einordnung des neuartigen Cryptochroms.....	81
4.1.2. Erzeugung des Expressionsplasmids sowie Produktion von rekombinantem <i>RsCryB</i>	82
4.1.3. Photochemische Analyse von <i>RsCryB</i>	83
4.1.4. Ein möglicher Antennenchromophor von Cryptochrom B.....	84
4.1.5. <i>RsCryB</i> enthält einen [4Fe-4S] konfigurierten Eisen-Schwefel-Cluster.....	87
4.1.6. Kristallisation und Strukturlösung von <i>RsCryB</i>	88
4.1.7. In <i>crystallo</i> Spektroskopie.....	91
4.1.8. Die Struktur von <i>RsCryB</i> und der Vergleich mit den kanonischen Mitgliedern der <i>PCSf</i>	92
4.1.9. Untersuchung zur möglichen (6-4)-Photolyase Aktivität.....	98
4.1.10. Funktionelle Analyse der postulierten Reduktionskaskade durch ortsgerichtete Mutagenese.....	98
4.1.11. Einflussnahme auf das Reduktionsverhalten durch Mutagenese an den Positionen H384 und E399.....	100
4.1.12. Analyse der elektrostatischen Oberfläche hinsichtlich DNA-Bindung.....	103
4.2. Untersuchungen an der Klasse II CPD Photolyase aus Methanosarcina mazei.....	104
4.2.1. Studien zur Bindung von geschädigter und intakter doppelsträngiger DNA.....	104
4.2.2. Rekombinante Produktion und Lagerung der <i>MmCPDII</i>	105
4.2.3. Untersuchung des vollständig reduzierten Zustandes mittels <i>time correlated single photon counting</i>	106
4.2.3.1. Ergebnisse der temperaturabhängigen Experimente	107
4.2.3.2. Ergebnisse der wellenlängenabhängigen Experimente.....	108
4.3. Untersuchungen zur (6-4)-Photolyase aus Dunaliella salina	113
4.3.1. Identifizierung des nativen Antennenchromophors der <i>Ds(6-4)</i>	113
4.3.2. Die <i>D. salina</i> (6-4) repariert das (6-4) Pyrimidin-Pyrimidon Photoprodukt <i>in vitro</i>	115
4.3.3. Optimierung des Expressionskonstruktes für die Kristallisation.....	115
5. Diskussion.....	117
5.1. Das Cryptochrom B aus Rhodobacter sphaeroides.....	117
5.1.1. Cryptochrom B aus <i>Rhodobacter sphaeroides</i> , ein Repräsentant der <i>CryPro</i> -Familie.....	117
5.1.2. Eine Tryptophandiade als Elektronentransferweg in der <i>CryPro</i> -Familie.....	119
5.1.3. Ein Oxo-Ligand ist für die Photoreduktion von <i>RsCryB</i> unabdingbar.....	121
5.1.4. Der [4Fe-4S]-Cluster in der <i>CryPro</i> -Familie.....	125
5.1.5. Die <i>CryPro</i> -Familie ist ein evolutionäres Bindeglied zwischen der <i>PCSf</i> und eukaryotischen Primasen.....	127
5.1.6. 6,7-Dimethyl-8-ribityl-lumazin ist der typische Antennenchromophor in der <i>CryPro</i> -Familie.....	128
5.1.7. Vergleich der <i>CryPro</i> -Familie mit anderen Photolyasen/Cryptochromen.....	129
5.1.8. <i>RsCryB</i> – Erste strukturelle und funktionelle Einsichten in ein bakterielles Cryptochrom.....	132
5.2. Die (6-4)-Photolyase aus Dunaliella salina (Ds(6-4)).....	134

Inhaltsverzeichnis

5.2.1. Die Ds(6-4) repariert das (6-4)-Pyrimidinpyrimidon-Photoprodukt in vitro.....	134
5.2.2. 8-Hydroxydeazaflavin ist der native Antennenchromophor der Ds(6-4).....	135
5.3. Die Klasse II CPD-Photolyase aus Methanosarcina mazei.....	137
5.3.1. Analyse der DNA-Bindung der MmCPDII an ungeschädigte DNA.....	137
5.3.2. Analyse der DNA-Bindung der MmCPDII an UV-geschädigte DNA.....	137
5.3.3. Untersuchung des vollständig reduzierten Zustands der MmCPDII.....	138
5.4. Ausblick zu offenen Fragen in der PCSf.....	141
6. Literatur.....	143
7. Anhang.....	156
7.1. Abkürzungsverzeichnis.....	156
7.2. Proteinsequenzen.....	159
7.2.1. RsCryB.....	159
7.2.2. MmCPDII.....	160
7.2.3. Ds(6-4).....	160
7.3. Repräsentatives alignment der CryPro-Familie.....	161
7.4. Ergebnis des SilverBullet-Screenings.....	162
8. Danksagung.....	164

Zusammenfassung

Zusammenfassung

Cryptochrome und Photolyasen sind eine Gruppe ubiquitärer, FAD bindender, blaulichtabhängiger Signalproteine bzw. Enzyme, welche zusammen die Photolyase/Cryptochrom-Superfamilie (PCSF) bilden. Während Photolyasen UV-induzierte DNA-Läsionen zwischen benachbarten Pyrimidinbasen, nämlich die Cyclobutanpyrimidindimere (CPD) und die (6-4)-Pyrimidin-pyrimidon-Photoprodukte ((6-4)), erkennen und blaulichtabhängig reparieren, üben Cryptochrome regulatorische Funktionen *in vivo* aus. Die pflanzlichen Vertreter sind in der Antwort auf Blaulichtreize involviert und nehmen Einfluss auf Wachstum, Entwicklung und die circadiane Uhr von Pflanzen. In Tieren partizipieren Cryptochrome in der circadianen Uhr als Blaulichtsensor (Typ-I), oder lichtunabhängig als Teil des zentralen Oszillators (Typ-II). Cryptochrome aus Bakterien sind weniger gut untersucht, der bestcharakterisierte Vertreter aus *Synechocystis* sp. PCC6803 gehört zur CryDASH-Familie, deren genaue biologische Funktion noch immer unklar ist.

In dieser Arbeit erfolgte eine funktionelle und die erste strukturelle Charakterisierung eines echten bakteriellen Cryptochroms, des Cryptochroms B aus *Rhodobacter sphaeroides* (*RsCryB*). *RsCryB* zeigt keine DNA-Reparaturaktivität und reguliert die Photosynthese von *R. sphaeroides* auf dem Transkriptlevel sauerstoff- und blaulichtabhängig. *RsCryB* definiert eine neue, überwiegend in Proteobakterien auftretende Proteinfamilie in der PCSF, die proteobakteriellen Cryptochrome (CryPro). Trotz geringer Sequenzidentitäten zu anderen Vertretern der PCSF ist die Struktur der CryPro-Familie homolog zur konservierten Überstruktur der Superfamilie. Überraschenderweise konnte in *RsCryB* ein [4Fe-4S]-Cluster identifiziert werden, der neben dem katalytischen Kofaktor FAD das bestimmende Element der C-terminalen Domäne ist. Dieser Cluster ist strukturell und chemisch verwandt mit bekannten Clustern aus eukaryotischen Primaseuntereinheiten, wie durch EPR-Experimente gezeigt werden konnte. Daneben wurde in *RsCryB* mit 6,7-Dimethyl-8-ribityl-lumazin, ein für die PCSF neuer Antennenchromophor identifiziert. Diese Studien werden ergänzt durch eine Analyse der DNA-Bindung der Klasse II CPD-Photolyasen aus *Methanosarcina mazei* (*MmCPDII*), sowie durch die Analyse des vollständig reduzierten Zustandes der *MmCPDII* mittels Ultrakurzzeitspektroskopie. In einem dritten Teilprojekt konnte der Antennenchromophor der (6-4)-Photolyase aus *Dunaliella salina* als 8-Hydroxy-5-deazaflavin identifiziert und die *in vitro* Reparatur des (6-4)-Schadens durch das Enzym demonstriert werden.

Summary

Summary

Cryptochromes and photolyases constitute a group of highly distributed, FAD-binding, blue-light dependent signaling proteins and enzymes, which together form the photolyase/cryptochrome-superfamily (PCSf). Photolyases recognize UV-induced DNA lesions between adjacent pyrimidine bases, namely cyclobutanopyrimidindimers (CPD) and (6-4)-pyrimidine-pyrimidone-photoproducts ((6-4)), and repair them blue-light dependently, whereas cryptochromes rather show regulatory functions *in vivo*. The plant representatives are involved in responses to blue-light stimuli and take influence on growth, development and the circadian clock of the plant. Cryptochromes in animals participate in the circadian clock as blue-light sensors (type I), or light-independently as part of the central oscillator (type II). Cryptochromes from bacteria are still poorly understood, the best characterized representatives from *Synechocystis* sp. PCC6803 belongs to the CryDASH family whose exact biological function is still unknown.

This work dealt with functional and the first structural characterization of a true bacterial cryptochrome, cryptochrome B from *Rhodobacter sphaeroides* (*RsCryB*). *RsCryB* shows no DNA repair activity and participates in the light-dependent and oxygen-dependent regulation of photosynthesis genes in *R. sphaeroides*. It defines a new family of proteins in the PCSf, predominantly occurring in proteobacteria, the proteobacterial cryptochromes (CryPro). Despite low sequence identity to the other representatives of the PCSf, the structure of the CryPro family is analogous to the conserved overall fold of the superfamily. Surprisingly, one [4Fe-4S] clusters was identified, which is along with the catalytic cofactor FAD the defining element of *RsCryB*'s C-terminus. This cluster is structurally and chemically related to known clusters of eukaryotic primase subunits, as was shown by EPR experiments. Moreover 6,7-dimethyl-8-ribityl-lumazine was identified as antenna chromophore of *RsCryB*, yet unknown inside the PCSf.

These studies are complemented by an DNA binding analysis of the class II CPD photolyase from *Methanosarcina mazei* (*MmCPDII*), the model photolyase for plant homologs, as well as an analysis of the fully reduced state of *MmCPDII* by ultrafast spectroscopy. In the third part of the project the native antenna chromophore of the (6-4)-photolyase from *Dunaliella salina* was identified as 8-hydroxy-5-deazaflavin and the *in vitro* repair of (6-4)-damages by the enzyme was shown.

1. Einleitung

1.1. Licht, einer der wichtigsten physikalischen Reize und Lebensquelle

Die Sonneneinstrahlung auf die Erdoberfläche ist die Grundlage für das Leben auf der Erde wie wir es heute kennen. Die Intensität und Qualität dieser Lichteinstrahlung ist dabei einer der wichtigsten Reize unserer Umwelt (vergleiche Abbildung 1.1 für eine Übersicht). Es ist daher wichtig für Organismen in sonnenexponierten Habitaten diesen Lichtreiz wahrzunehmen, ihn als Signal zu integrieren, es weiterzuleiten und gegebenenfalls eine Antwort darauf zu induzieren.¹⁻³ Für photosynthetisch lebende Organismen ist dieses essentiell, um die optimale Lichtqualität festzustellen. Zum einen müssen zu dunkle Umgebungen vermieden werden, in denen nicht genug Lichtenergie zum Leben zur Verfügung steht, zum anderen sind Orte mit zu intensiver Einstrahlung zu vermeiden, da durch zu hohen Energiefluss die schädlichen Aspekte des Sonnenlichts, zum Beispiel die vermehrte Bildung von UV-Läsionen an Pyrimidinbasen oder Nebenreaktionen in der Photosynthese, wie beispielsweise die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS)⁴, überhand nehmen.¹⁻³

Cyanobakterien nutzen Sonnenlicht im grünen Spektralbereich für ihre oxygene Photosynthese. Im Gegensatz dazu hat das Aktionsspektrum der pflanzlichen Photosynthese zwei Maxima, eines im roten Wellenlängenbereich (um 680 nm) und eines im blauen (um 450 nm), wobei die exakten Wellenlängen von den jeweiligen Lichtsammelkomplexen abhängen. Der rote Wellenlängenbereich wird dabei für die Photosynthese bevorzugt. Bei der von Pflanzen, den meisten anderen phototrophen Eukaryoten und Cyanobakterien angewendeten oxygenen Photosynthese wird Wasser zu Sauerstoff oxidiert und die Reduktionsäquivalente lichtabhängig als $\text{NADPH} + \text{H}^+$ fixiert. Simultan wird in diesem Prozess ein Protonengradient erzeugt, dessen chemisches Potenzial zur Erzeugung von Adenosintriphosphat (ATP), der universellen zellulären Energiequelle, dient. Im Photosystem II, welches Wasser zu Sauerstoff oxidiert, kann dabei unter Lichtstress Sauerstoff im Singulett-Zustand erzeugt werden, welcher durch seine hohe Reaktivität äußerst schädlich für die Zelle ist.

1. Einleitung

Neben der oxygenen Photosynthese gibt es viele Organismen, die anoxygene Photosynthese betreiben. Um die Freisetzung von molekularem Sauerstoff zu vermeiden, oxidieren sie kein Wasser, sondern verwenden andere Redoxpaare wie z.B. $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$, $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$, S^{2-}/S oder $\text{H}_2/\text{H}_2\text{O}$.

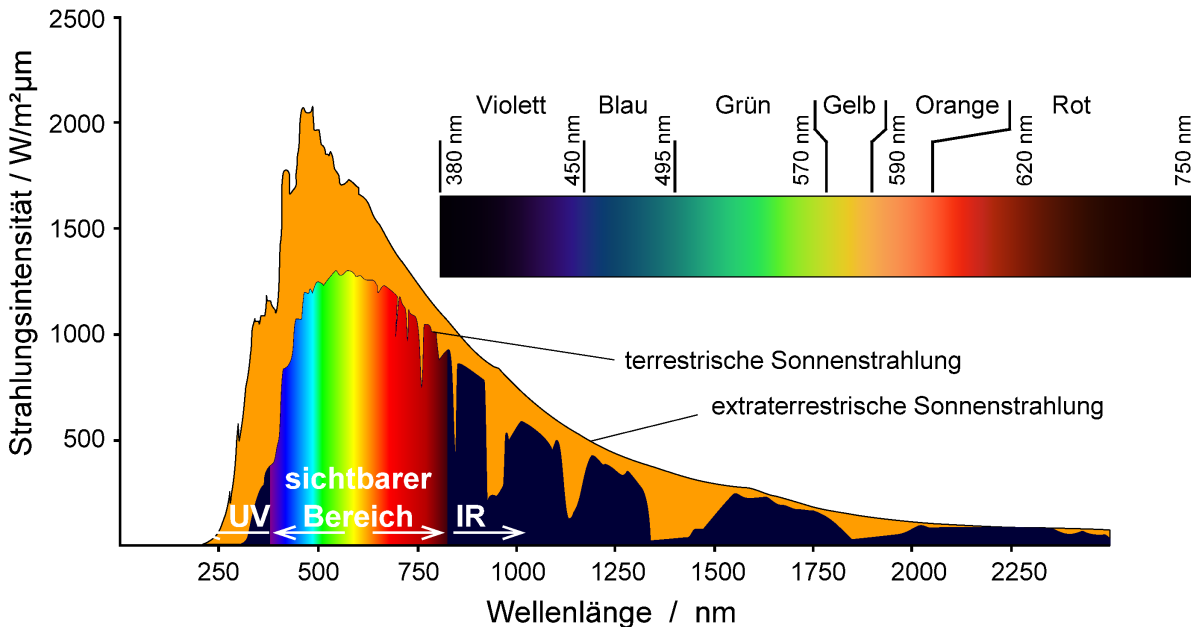


Abbildung 1.1: Schematische Übersicht über das Sonnenspektrum. Von der extraterrestrischen Strahlung wird ein großer Bereich von der Erdatmosphäre absorbiert, vor allem harte ultraviolette (UV) Strahlung gelangt nicht durch die Ozonschicht. Die starken Absorptionen im Infrarot (IR) kommen durch Anregung von Rotations- und Schwingungsmoden der atmosphärischen Moleküle zustande. Oben rechts: Lineares Farbspektrum mit markanten Wellenlängen. Die gezeigten Farben sind nicht exakt sondern geben nur ein ungefähres Bild der Realität wieder.

Diese Abbildungen basieren auf einem schematischen Sonnenspektrum, das unter der Creative Commons Lizenz veröffentlicht wurde (Degreen, Quilbert), sowie dem linearen Farbspektrum aus der Public Domain (Gringer).

Trotz der verschiedenen Mechanismen zur Energiegewinnung aus Licht ist die Wahrnehmung der Lichtqualität für alle diese Organismen von immenser Bedeutung, um schädliche Einflüsse durch das Sonnenlicht zu vermeiden oder aktiv entgegenzutreten. Im blauen und nahen ultravioletten (UV) Spektralbereich übernehmen unter anderem flavinhaltige Photorezeptoren diese Aufgabe.

1.2. Flavine sind wichtige biochemische Kofaktoren

Flavine sind eine Gruppe gelb gefärbter (der Name stammt vom griechischen *flavus* - gelb) Chromophore, die alle auf dem Isoalloxazingerüst basieren. Die bekanntesten Vertreter sind Riboflavin, Flavinmononukleotid (FMN) und das Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD). Diese

drei Moleküle leiten sich alle vom 7,8-Dimethyl-Isoalloxazin ab und tragen einen Ribitylrest am N10-Stickstoff desselben. Eine weitere, mit den Flavinen eng verwandte und biochemisch wichtige Kofaktorklasse sind die sogenannten Deazaflavine welche als Reduktionsäquivalente in der Methanogenese eine wichtige Rolle spielen.^{5,6} Auf diese soll jedoch an dieser Stelle nicht im Detail eingegangen werden.

Flavine sind zumindest peripher in allen Hauptwegen des Metabolismus und der Atmungskette involviert.⁷ Dort stellen sie zum Beispiel die Verknüpfung zwischen den Zweielektronen-Äquivalenten des Metabolismus und den Einelektronen-Äquivalenten der Atmungskette dar. Die katalytische Aktivität des Flavinkofaktors lässt sich auch im Metabolismus in 1- bzw. 2-Elektronentransfers einteilen. In bakteriellen Flavodoxinen, welche FMN verwenden, wechselt der Kofaktor während des Redoxvorganges zwischen der oxidierten und neutralen semichinoiden Form.⁷ In flavinabhängigen Dehydrogenasen, die beispielsweise im Citratzyklus oder der

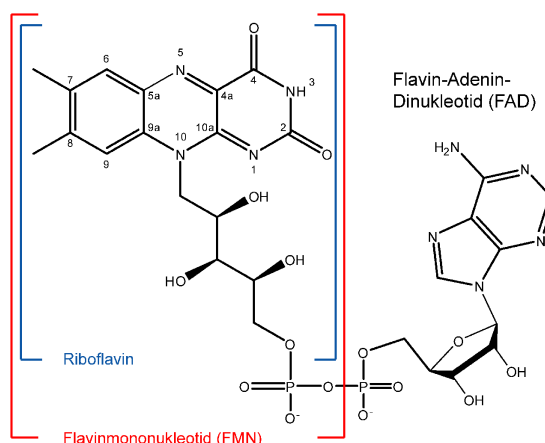


Abbildung 1.2: Strukturformel von Riboflavin (blaue Klammer), FMN (rote Klammer) und FAD. Die drei Chromophore bauen alle auf dem Isoalloxazinring auf, dessen Atompositionen im aromatischen System durchnummeriert sind.

β-Oxidation vorkommen, wird FAD als Kofaktor benutzt. Hier findet formal der Transfer eines Hydridions (= zwei Elektronen + H⁺) statt. Dabei wechselt der Kofaktor zwischen der vollständig oxidierten Form und der vollständig reduzierten Form.⁷ Im Fall der Succinat-Dehydrogenase können die beiden Elektronen anschließend einzeln auf Ubichinon (Q) übertragen werden und dieses zu Ubichinol (QH₂) reduzieren.

Neben dieser Nutzung von Flavinen im Metabolismus werden sie auch in der Blaulichtrezeption von drei großen Photorezeptorklassen eingesetzt. Diese sind Blaulichtrezeptoren mit *light-oxygen-voltage*-Domänen (LOV), Proteine mit „*blue light sensors using FAD*“-Domänen (BLUF), als auch die Mitglieder der Photolyase/Cryptochrom-Superfamilie (PCSf).³³

1. Einleitung

1.3. Flavin enthaltenden Photorezeptordomänen

Während die PCSf und BLUF-Domänen FAD als Kofaktor binden, verwenden die aus den Phototropinen bekannten LOV-Domänen meist FMN. Eine der bekanntesten LOV-Domänen enthaltenden Photorezeptoren sind die pflanzlichen Phototropine, welche zwei FMN-bindende LOV-Domänen und eine Serin/Threonin-Kinase als *output*-Domäne enthalten.^{8,9} In Pflanzen optimieren sie die Ausbeute der Photosynthese durch Steuerung des Phototropismus, Kontrolle der Stomataöffnung und Akkumulation von Chloroplasten an der Lichtseite des Blattes und die Blattbewegung selber.⁹

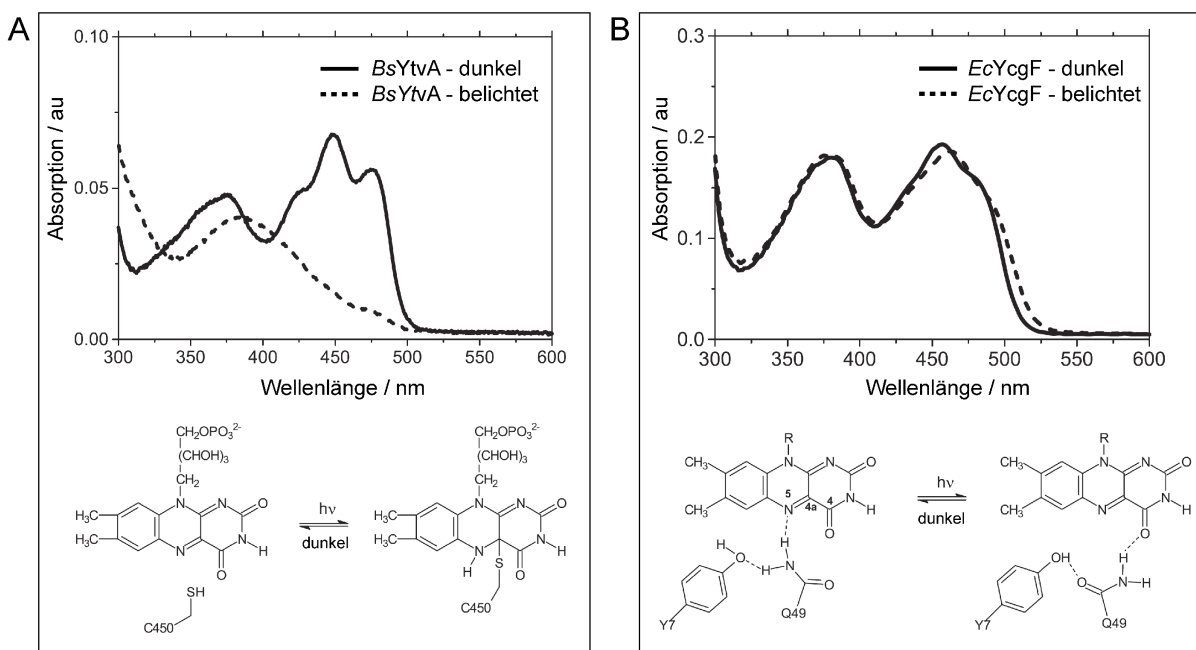


Abbildung 1.3: Absorptionsspektren und schematische Darstellung der dunkel- und lichtadaptierten Zustände von light-oxygen-voltage (LOV) und blue light sensing using FAD (BLUF)-Domänen.

A: LOV-Domänen addieren bei Belichtung die des Thiolgruppe funktionellen Cysteins an die C4a-N5 Doppelbindung des Isoalloxazinringes. Dadurch verändert sich das Absorptionsspektrum drastisch. Das typische Absorptionsspektrum des proteingebundenen FAD geht komplett verloren. **B:** In BLUF-Domänen organisiert sich das Wasserstoffbrückennetzwerk um den Isoalloxazinring neu, was zu einer bathochromen Verschiebung des Absorptionsspektrums um ca. 5 nm führt.

Beide Prozesse sind vollständig reversibel. Die Abbildungen wurden aus Losi & Gärtner 2011 entnommen.⁸

LOV-Domänen sind intensiv untersucht worden, so dass ihr Photozyklus gut beschrieben ist. Nach Lichtabsorption durch das FMN im vollständig oxidierten Zustand kann das Flavin in den Tripletzustand übergehen. Dieser Zustand reagiert mit einem, in allen LOV-Domänen konservierten Cystein unter Ausbildung einer kovalenten Bindung zwischen dem Schwefelatom und dem C4a-Kohlenstoff des Isoalloxazinringes. Dieser Zustand ist durch ein deutlich verändertes Absorptionsspektrum mit einem einzelnen Absorptionsmaximum bei ca.

390 nm gekennzeichnet, im Gegensatz zum typischen LOV-gebundenen Flavinspektrum mit dem Absorptionsmaximum bei 450 nm und mehreren Nebenmaxima (Abbildung 1.3 A).¹⁸

Durch thermische Relaxation im Dunkeln ist der Prozess vollständig reversibel.⁸

Die BLUF-Domäne wurde zuerst im Photosensorprotein AppA aus *Rhodobacter sphaeroides* identifiziert, und tritt vor allem in Proteobakterien und Cyanobakterien auf.^{19,20}

BLUF-Domänen enthaltende Proteine sind meist in der lichtabhängigen Expressionsregulation beteiligt.²⁰ Die Domäne verwendet FAD als Chromophor und durchläuft einen reversiblen Photozyklus jedoch ohne kovalent gebundene Flavinform. Im Grundzustand bildet die Seitenkette eines konservierten Glutamins Wasserstoffbrückenbindungen zu dem N5-Stickstoff und O4-Sauerstoff des FAD und einem konservierten Tyrosin aus. Bei Belichtung mit Blaulicht kommt es zu einer intermediären Radikalpaarbildung zwischen dem Tyrosin und dem FAD. In der Lebensdauer des Radikalpaares kommt es zu einer Umordnung der Wasserstoffbrücken. Dadurch entsteht eine bathochrome Verschiebung im Absorptionsspektrum des FAD, welche den belichteten Signalzustand charakterisiert (Abbildung 1.3).^{8,21,22} Diese Umordnung involviert entweder eine Tautomerisierung des Säureamids zum Imid oder eine Drehung der Seitenkette des Glutamins. Der genaue Mechanismus wird zur Zeit noch untersucht und in der Literatur diskutiert, wobei neueste quantenmechanische Rechnungen auf die Tautomerisierung hindeuten.²³

Die dritte große Klasse von flavinhaltigen blaulichtabhängigen Signalproteinen und Enzymen ist die PCSf, auf die in den nächsten Abschnitt detailliert eingegangen wird.

1.4. Die Photolyase/Cryptochrom Superfamilie

Cryptochrome und Photolyasen sind monomere Enzyme mit einem Molekulargewicht von 50-60 kDa. Sie bilden, trotz teilweise geringer Sequenzidentitäten untereinander, eine phylogenetische Superfamilie: Die Photolyase/Cryptochrom-Superfamilie (PCSf). Während Photolyasen DNA-Reparaturenzyme sind, welche UV-induzierte DNA-Läsionen reparieren können, wirken Cryptochrome aktiv als Blaulicht-Photorezeptoren in diversen lichtabhängigen und lichtunabhängigen Prozessen mit. Darunter fallen unter anderem die circadiane Uhr, Phototropismus oder auch Magnetorezeption.^{24,25}

Photolyasen lassen sich nach dem jeweiligen Substrat in zwei Gruppen einteilen: Zum Einen die CPD-Photolyasen, welche das Cyclobutanpyrimidindimer (CPD) spalten, zum Anderen

1. Einleitung

die (6-4)-Photolyasen, welche das (6-4)-Pyrimidinpyrimidon-Photoprodukt als Substrat erkennen. Die CPD-Photolyasen lassen sich aufgrund von Sequenzunterschieden in weitere Unterklassen einteilen, von denen die Klasse I und Klasse II CPD-Photolyasen die mit Abstand Wichtigsten sind.²⁶

Cryptochrome unterteilen sich in pflanzliche, tierische und eubakterielle Cryptochrome. Dabei zeigt die in Pflanzen gefundene Subgruppe interessanterweise eine hohe Homologie zu CPD-Photolyasen, während die in Tieren gefundenen Verwandten enger mit den (6-4)-Photolyasen verwandt sind.²⁷ Eine interessante eigenständige Familie bilden die CryDASH Cryptochrome, die nicht nur in höheren Eukaryoten, sondern auch in verschiedenen Bakterien zu finden sind. Interessanterweise zeigen sie wie CPD-Photolyasen DNA-Affinität und können spezifisch den CPD-Schaden binden sowie reparieren, allerdings nur wenn dieser in einzelsträngiger Umgebung vorliegt.²⁸ Über ihre biologische Funktion als Signalproteine ist bisher jedoch nur wenig bekannt.

Als katalytischen Kofaktor binden alle Mitglieder der PCSf Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD). FAD ist für die katalytische Aktivität der Photolyasen und Sensorfunktion der Cryptochrome unabdingbar. Die meisten Familienmitglieder binden einen zweiten, nicht essentiellen Antennenchromophor. Dieser dient nach gängiger Meinung dazu, das Aktionsspektrum der in Katalyse oder Signalgebung aktiven Form zu erweitern und somit die Effizienz zu verbessern.²⁹

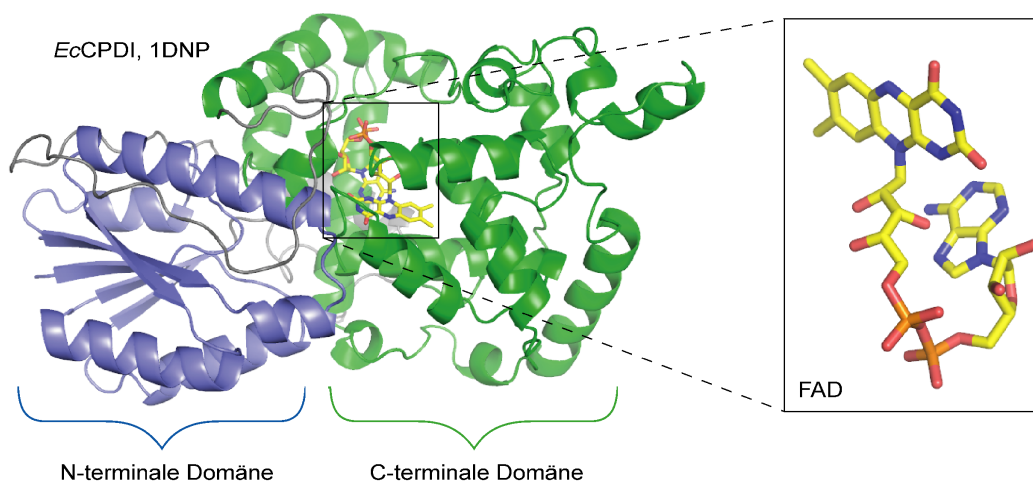


Abbildung 1.4: Die EcCPDI als strukturell typischer Vertreter der PCSf. Die N-terminale DNA-Photolyase-Domäne (blau), ähnlich der Rossmannfaltung, ist über einen Linker (grau) mit der C-terminalen, katalytischen FAD-7-Bindungsdomäne verbunden. Der in allen Mitgliedern der PCSf vorhandene, essentielle Kofaktor FAD wird dort in der typischen U-förmigen Konformation (siehe Kasten) gebunden.

Aus allen bisher bekannten identifizierten Unterfamilien ist mindestens ein Vertreter strukturell charakterisiert worden. Dies sind für die Klasse I CPD-Photolyasen (CPDI) die Enzyme aus *Escherichia coli* (*EcCPDI*, 1DNP³⁰), *Anacystis nidulans* (*AnCPDI*, 1QNF¹⁵), *Thermus thermophilus* (*TtCPDI*, 1IQR³¹) und *Sulfolobus tokodaii* (*StCPDI*, 2E0I³²). Die in Eukaryoten, Bakterien und Archaeen zu findenden Klasse II CPD-Photolyasen (CPDII) wurden am Modellenzym aus *Methanosarcina mazei* (*MmCPDII*, 2XRY¹⁰) bzw. dem pflanzlichen Homologen aus *Oryza sativa* (*OsCPDII*, 3UMV³³) charakterisiert. Von den Cryptochromen wurde das pflanzliche Cryptochrom 1 aus *Arabidopsis thaliana* (*AtCry1*, 1U3C³⁴), das zu der CryDASH Familie gehörende Cryptochrom 3 ebenfalls aus *A. thaliana* (*AtCry3*, 2J4D³⁵), das Homologe aus *Synechocystis* sp. PCC6803 (1NP7³⁶) sowie ein tierisches Cryptochrom aus *Drosophila melanogaster* (*DmCry1*, 4GU5³⁷) strukturell untersucht. Aus der Familie der (6-4)-Photolyasen ((6-4)) wurden Röntgenstrukturen der beiden eukaryotischen Vertreter aus *D. melanogaster* (*Dm(6-4)*, 3CVU³⁸) und *A. thaliana* (*At(6-4)*, 2FY4³⁹) gelöst.

Alle strukturell charakterisierten Vertreter zeigen einen bilobalen Aufbau mit einer N-terminalen DNA-Photolyase-Domäne (Pfam PF00875⁴⁰) und einer C-terminalen FAD-7-Bindungsdomäne (Pfam PF03441⁴⁰), wobei die Anordnung der Sekundärstrukturelemente konserviert ist (siehe Abbildung 1.4). Unterschiede treten vor allem in den Längen der Termini auf. Die C-terminale Domäne bindet den katalytischen Kofaktor FAD in der für diese Familie typischen U-ähnlichen Konformation. Die gefundenen Antennenchromophore wurden, im Falle von Nucleosiden/Nucleotiden in der N-terminalen Domäne, welche eine der Rossmannfaltung ähnliche Struktur einnimmt, oder in der Spalte zwischen den beiden Domänen gebunden.

1.5. Der katalytische Kofaktor FAD in der PCSf

Wie bereits erwähnt, ist der katalytische Kofaktor FAD der PCSf in der C-terminalen katalytischen Domäne in einer nur bei dieser Proteinfamilie gefundenen U-förmigen Anordnung gebunden. Das Flavin ist dazu befähigt, die vier folgenden Oxidationszustände einzunehmen: Vollständig oxidiert (FAD), anionisch radikalisch (FAD^{•-}), semichinoid oder auch neutral radikalisch (FADH[•]) und anionisch vollständig reduziert (FADH⁻). Diese Oxidationszustände spielen jedoch, je nach PCSf-Unterfamilie, verschiedene Rollen.²⁴⁻²⁶ *In vitro* können die verschiedenen Oxidationszustände durch Chemikalien oder durch

1. Einleitung

Bestrahlung mit Blaulicht bzw. UV-A in Gegenwart eines Reduktionsmittels, wie z.B. 2-Mercaptoethanol oder Dithiothreitol (DTT), erreicht werden (siehe Abbildung 1.5).^{10,41} Dieser Prozess wird allgemein als Photoreduktion bezeichnet.⁴² Dabei spielt die sogenannte Tryptophantriade oder auch Reduktionskaskade der PCSF-Mitglieder eine entscheidende Rolle, auf welche an späterer Stelle eingegangen werden soll (siehe 1.7.2).

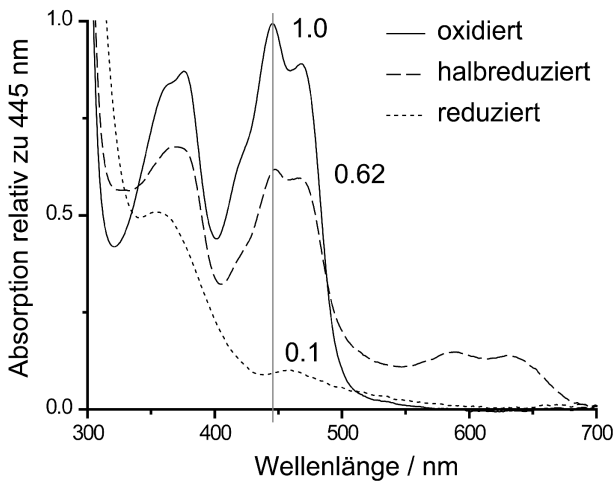


Abbildung 1.5: Typisches, auf 445 nm normiertes Absorptionsspektrum von Photolyase gebundenem FAD (hier die MmCPDII) in den drei Photolyase-typischen Oxidationsstufen vollständig oxidiert, semichinoid (halbreduziert) und vollständig reduziert. Der halbreduzierte Zustand ist, bedingt durch das experimentelle Setup, nicht rein, sondern ein spektroskopischer Schnappschuss während der Photoreduktion. Die Zahlenangaben spiegeln die ungefähren Verhältnisse der Absorptionskoeffizienten bei 445 nm (graue Linie) wieder. Die Daten sind Kiontke et al., 2011 entnommen.¹⁰

1.6. Funktionsprinzipien von Cryptochromen und Photolyasen

Alle Cryptochrome und Photolyasen binden den katalytischen Kofaktor FAD in der C-terminalen Domäne und benötigen ihn für die jeweilige Aktivität.²⁴⁻²⁶ Die katalytische Aktivität der Photolyasen ist strikt lichtabhängig, nur durch Absorption eines Lichtquants passender Energie können sie DNA-Läsionen reparieren.⁴³ Die in Pflanzen beschriebenen Cryptochrome sind echte Photorezeptoren, bei tierischen Cryptochromen hingegen wurde in einem Untertyp eine lichtunabhängige Funktion nachgewiesen.²⁴

1.6.1. Cryptochrome sind die zentralen Blaulichtrezeptoren in Pflanzen

Pflanzliche Cryptochrome sind Zellkern-lokalisiert und wurden zuerst in einem in der Hypocotyl-Elongation gehemmtem Phänotyp von *A. thaliana* Keimlingen identifiziert,⁴⁴ wobei heute die zwei Homologe Cryptochrom 1 (Cry1) und Cryptochrom 2 (Cry2) bekannt sind. Man versteht die pflanzlichen Cryptochrome als zentrale Blaulichtrezeptoren, welche Funktionen in unterschiedlichen Prozessen, wie der Entwicklung der Pflanze, der circadianen Uhr, im Metabolismus, bei Stress und Verteidigungsantworten oder auch bei der Signalgebung durch Hormone, wahrnehmen.²⁴ Alle Funktionen lassen sich dabei über die Einflussnahme

von Cryptochromen auf die Regulation der Transkription erklären. Cryptochrome reprimieren dabei über eine direkte Interaktion die Aktivität der E3 Ubiquitin-Ligase COP1, der zentralen Schaltstelle der lichtabhängigen Genregulation.²⁴

Von den beschriebenen Oxidationszuständen des katalytischen Flavins ist bei den pflanzlichen Cryptochromen vermutlich nur der vollständig oxidierte und der semichinoide Zustand physiologisch relevant. So akkumulieren sie den neutral radikalischen Zustand *in vitro* Experimenten bei Belichtung mit Blaulicht in Anwesenheit von Reduktionsmitteln, wobei im Dunkeln innerhalb weniger Minuten Reversion durch vollständige Oxidation erfolgt.²⁴ Analog akkumuliert sich auch bei Belichtung *in vivo* primär das neutrale Radikal, welches als der Signalzustand identifiziert wurde.¹³ Dadurch lässt sich ein Photozyklus des Flavins vorschlagen, in welchem es nur zwischen den beiden Oxidationszuständen FAD und FADH[•] wechselt.

Kürzlich wurde publiziert, dass durch den Austausch von Aspartat 396 zu einem Asparagin (D396N) ein Photolyasen ähnliches Verhalten in *AtCry1* induziert werden kann. So wurde durch den Aminosäureaustausch die vollständig reduzierte Form des katalytischen FADs stabilisiert und *AtCry1D396N* zeigte Reparaturaktivität gegenüber CPD-Schäden in ssDNA, jedoch nicht in dsDNA.⁴⁵ Dieses Verhalten ist analog zu dem CryDASH-Vertreter *AtCry3*, bei welchem ebenfalls CPD-Reparaturaktivität in ssDNA gezeigt wurde.²⁸

1.6.2. Tierische Cryptochrome regulieren die circadiane Uhr

Tierische Cryptochrome lassen sich in zwei Typen einteilen, die Typ-I oder Insekten-Cryptochrome und die Typ-II oder Vertebraten-Cryptochrome. Trotz struktureller Ähnlichkeit zeigen sie *in vivo* unterschiedliches Verhalten. Die Typ-I Cryptochrome zeigen dabei lichtabhängigen Einfluss auf die circadiane Uhr und sind somit „echte“ Photorezeptoren. Der Typ-II zeigt dagegen eine lichtunabhängige Transkriptionsrepression (Abbildung 1.6). Beide Typen sind eng verwandt mit den (6-4)-Photolyasen, so zeigt das Typ-I Cryptochrom aus *D. melanogaster* spezifische Bindung an den (6-4)-Schaden aber keine Reparaturaktivität.²⁴

Typ-I wurde in *D. melanogaster* als primärer Photorezeptor in der circadianen Uhr identifiziert. Das Cryptochrom interagiert in einer negativen Rückkopplung dabei lichtabhängig mit dem molekularen Oszillator der circadianen Uhr und ist für die

1. Einleitung

lichtabhängige Steuerung wichtig. Dabei übernimmt der C-Terminus, auch unabhängig vom Kernbereich der Domäne, die Interaktion mit dem *Timeless* Protein (siehe Abbildung 1.6 links).^{46,47}

Typ-II Cryptochrome beeinflussen die circadiane Uhr lichtunabhängig, sie haben also keine Funktion als Photorezeptor. Die Interaktion erfolgt hierbei direkt mit dem *Period* Protein und das Cryptochrom scheint direkt Teil des molekularen Oszillators zu sein. Der C-Terminus ist dabei das interagierende Strukturelement, er ist aber für die Steuerung nicht hinreichend. Diese erfolgt nur im Kontext mit der gesamten C-terminalen Domäne (siehe Abbildung 1.6 rechts).^{48,49} Auch die tierischen Cryptochrome akkumulieren *in vivo*, wie die pflanzlichen Verwandten, unter Belichtung die semichinoide Form des katalytischen FAD. Allerdings konnte *in vitro* die Anhäufung in der anionischen radikalischen Form beobachtet werden.²⁴ In der kürzlich publizierten Struktur des Cryptochrom 1 (Typ I Cryptochrom) aus *Drosophila melanogaster* nimmt interessanterweise die Seitenkette eines Tryptophans (W536) die analoge Position einer DNA-Läsion in der „katalytischen Tasche“ des Cryptochroms ein und verschließt diese so.³⁷

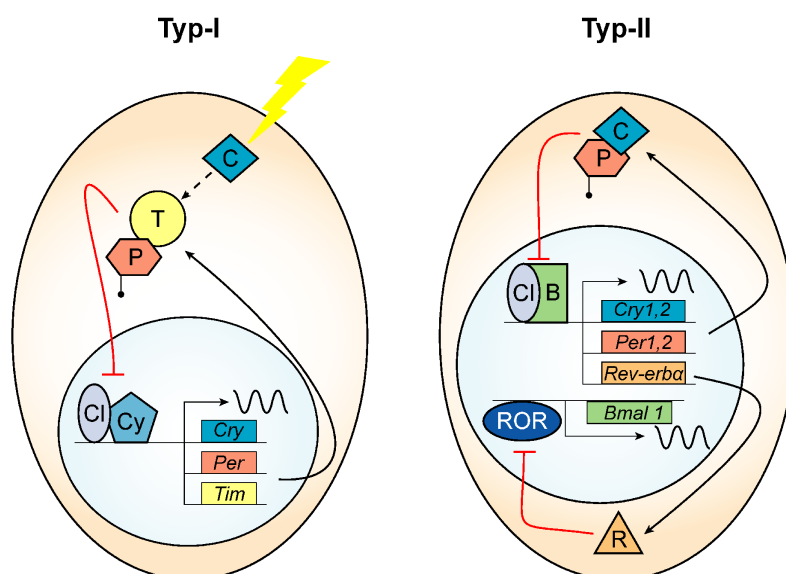


Abbildung 1.6: Schematische Übersicht der beiden Untertypen tierischer Cryptochrome entnommen aus Chaves et al., 2011. Links: Typ I Cryptochrome nehmen lichtabhängig über eine Interaktion mit dem *Timeless* Protein (T, Tim) Einfluss auf den Oszillator der circadianen Uhr. Rechts: Cryptochrome vom Typ II sind selbst Teil des Oszillators und zeigen keine lichtabhängige Funktion. Verwendete Abkürzungen der involvierten Proteine: B – *Bmal1*, Cl – *Clock*, Cy – *Cycle*, C/Cry – *Cryptochrom*, P/Per – *Period*, R – *Rev-erba*, T/Tim – *timeless*.

1.6.3. Cryptochrome in der Magnetorezeption

Insekten und Zugvögel können sich unter anderem am Magnetfeld der Erde orientieren. In diesem Zusammenhang werden Cryptochrome als Kandidaten für einen solchen Magnetosensor gehandelt.⁵⁰ Dieses beruht vor allem auf der Tatsache, dass Cryptochrome z.B. aus *A. thaliana*⁵¹ oder *Sylvia borin*⁵² (Gartengrasmücke) in der Lage sind, langlebige Radikalpaare zu bilden, auf welche das Erdmagnetfeld Einfluss nehmen könnte.⁵³ Neue Studien an *Erithacus rubecula* (europäisches Rotkehlchen) legen den Schluss nahe, dass Cryptochrome in den Augen von Vögeln in der Tat über einen Blaulicht-abhängigen Radikalpaarmechanismus für die Wahrnehmung des Erdmagnetfeldes verantwortlich sind.⁵⁴ Allerdings fehlen immer noch direkte experimentelle Beweise dafür, dass Cryptochrome in der Magnetorezeption von Pflanzen und Tieren involviert sind.^{24,54}

Weiter fortgeschritten ist die Forschung bei der Fähigkeit zur Magnetorezeption von Insekten. In *Drosophila melanogaster* zeigt das eigene Cryptochrom vom Typ-I, als auch in einem transgenen Ansatz das Cryptochrom vom Typ-II aus *Danaus plexippus* (Monarchfalter), einen zur Magnetorezeption befähigten Phänotyp bei Bestrahlung mit Wellenlängen < 420 nm.^{55,56} Interessanterweise involviert der vorgeschlagene Mechanismus in *D. melanogaster* dabei kein aus FAD und Tryptophantriacid gebildetes, intramolekulares Radikalpaar im Cryptochrom, wie durch eine Mutagenesestudie gezeigt werden konnte.⁵⁶

1.6.4. Photolyasen injizieren lichtabhängig Elektronen auf DNA-Photoläsionen

Photolyasen sind DNA-Reparaturenzyme, welche durch Absorption von Lichtenergie einen katalytischen Elektronentransfer auf CPD- bzw. (6-4)-Schäden durchführen können und diese dadurch reparieren,⁵⁷ ein Prozess, der zuerst in Form der Photoreaktivierung bei einzelligen Organismen beobachtet wurde.^{58,59} In beiden Fällen muss der katalytische Kofaktor FAD im Enzym in der vollständig reduzierten Form FADH⁻ vorliegen. Die Photolyase kann in einem lichtunabhängigen Schritt den Schaden in der DNA erkennen und binden. Durch Absorption eines Photons passender Energie, entweder direkt durch das Flavin oder durch eine Antenne, welche die Energie per resonanten Energietransfer (Förstertransfer) auf das Flavin überträgt, wird FADH⁻ in einen angeregten Zustand überführt. Aus diesem kann ein Elektron auf den Schaden übertragen werden, welcher daraufhin in der katalytischen Tasche eine thermische

1. Einleitung

Zykloreversion durchläuft. Das Elektron wird daraufhin auf das nun im semichinoiden Zustand befindliche Flavin übertragen und das Protein dissoziiert vom intakten DNA-Strang ab.⁴³

Die Erkennung und die elektronische Feinabstimmung zur Reparatur des Schadens übernimmt dabei die jeweilige katalytische Tasche, welche im Laufe der Evolution perfekt auf den jeweiligen Schaden zur Maximierung der Reparatureffizienz abgestimmt wurde. In allen Photolyasen sind zwei Seiten der katalytischen Tasche durch Tryptophane, die sogenannte L-förmige Wandung, aufgebaut (W277, W384 *Ec*CPDI 1DNP³⁰; W286, W392 *An*CPDI 1QNF¹⁵; W305, W421 *Mm*CPDII 2XRY¹⁰). In CPD-Photolyasen wird die dritte Seite durch ein Methionin geformt, welches durch elektrostatische Wechselwirkungen an der Katalyse beteiligt ist (M345 *Ec*CPDI 1DNP³⁰; M353 *An*CPDI 1QNF¹⁵; M379 *Mm*CPDII 2XRY¹⁰). In (6-4)-Photolyasen befindet sich an der äquivalenten Position ein für die Katalyse wichtiges Histidin (H369 *Dm*(6-4) 3CVU³⁸), welches zusammen mit einem weiteren Histidin (H365 *Dm*(6-4) 3CVU³⁸) und einem Tyrosin (Y423 *Dm*(6-4) 3CVU³⁸) interagiert.

1.6.5. Mikrobielle Cryptochrome zeigen duale Funktionen *in vivo*

Neben den beschriebenen monofunktionellen Signalproteinen und DNA-Reparaturenzymen sind in der PCSf in neuerer Zeit auch Vertreter untersucht worden, welche zwei Funktionen in sich vereinen, die sogenannten *dual function* Mitglieder der PCSf. In dem Schimmelpilz *Aspergillus nidulans*, in den Grünalgen *Chlamydomonas reinhardtii* und *Ostreococcus tauri* und der Kieselalge *Phaeodactylum tricorutum* wurden echte bifunktionelle Mitglieder der PCSf identifiziert.⁶⁰⁻⁶⁴

Dabei wurde gezeigt, dass das CryA aus *A. nidulans* (*An*CryA) homolog zu den Klasse I CPD-Photolyasen ist und in einem *in vivo* Photoreaktivierungsassay sowohl in *A. nidulans* als auch heterolog in *E. coli* Photolyaseaktivität vermittelt. Weiterhin wurde eindeutig eine Funktion von *An*CryA als Transkriptionsrepressor von Regulatoren in der sexuellen Entwicklung des Organismus nachgewiesen.⁶⁰

Im Zweiten Beispiel für ein bifunktionelles Cryptochrom, dem *animal like* Cryptochrom aCry aus *C. reinhardtii* (*Cra*Cry) wurde bei dem Photorezeptor nicht nur die Fähigkeit Blaulicht wahrzunehmen, sondern auch eine deutliche Signalantwort auf Gelblicht und Rotlicht nachgewiesen.⁶² Dieses Verhalten wird dabei spektroskopisch durch eine deutliche Rotverschiebung der Absorptionsbanden des neutralen Radikals erklärt. Diese

spektroskopische Verschiebung wurde interessanterweise auch für *AtCry3* gefunden, dem CryDASH aus *A. thaliana*, welches ein ähnliches Absorptionsverhalten des FADH^{*}-Zustands aufweist, von dem jedoch noch keine Signalfunktion bekannt ist.⁶² Weitere Vertreter dieser neuen Cryptochrome mit dualer Funktion sind CPF1 aus *P. tricotnutum* (*PtCPF1*)⁶³, welches sowohl (6-4)-Schäden reparieren kann als auch als Blaulichtrezeptor fungiert, und die homologen CPF1 und CPF2 aus *O. tauri*, die ebenfalls Photolyaseaktivität und Blaulicht abhängige regulatorische Funktionen zeigen.^{61,64}

1.7. Der kanonische Typ der PCSf

Bei genauerer struktureller Analyse der einzelnen Mitglieder der PCSf stellt sich heraus, dass beim überwiegenden Teil der identifizierten Mitglieder neben der globalen Struktur auch Kernbereiche in der Sequenz hoch konserviert sind (Abbildung 1.7). Ausgenommen davon ist die Umgebung des Adeninteils des katalytischen Kofaktors, welcher weniger streng konserviert ist, da sich hier die katalytische Tasche befindet. Je nach Typ sind Aminosäuren substituiert, um die jeweilige Aktivität zu ermöglichen.

Andere Struktur motive sind in allen Klassen konserviert. So zeigen alle Mitglieder eine typische Salzbrücke zwischen einem Aspartat und einem Arginin, welche das FAD in seiner Bindungstasche regelrecht einklammert (Abbildung 1.7 A). Zwei weitere Funktionalitäten sind jedoch in allen Unterfamilien vorhanden, aber auf anderen Strukturelementen lokalisiert. Dieses ist zum Einen die Aminosäure, die mit dem N5-Stickstoff des Flavins interagiert und zum Zweiten die Reduktionskaskade, welche für die *in vitro* Photoreduktion essentiell ist. Hierbei setzt sich die Anordnung im Klasse II Typ der CPD-Photolyasen von der in allen anderen bisher bekannten Mitgliedern der PCSf deutlich ab.¹⁰ Daher wird die Untermenge der PCSf bestehend aus den Klassen CPDI, CryDASH, (6-4), tierischen und pflanzlichen Cryptochromen im Folgenden als kanonischer Typ bezeichnet.

1.7.1. Der N5-Stickstoff wird im kanonischen Typ von der gleichen Position aus gebunden

In allen bekannten Vertretern der PCSf interagiert der N5-Stickstoff des katalytischen Flavins mit einer Aminosäureseitenkette. Durch die strukturell bekannten Vertreter und durch Sequenzanalysen stellte sich heraus, dass für jede Unterfamilie eine andere Aminosäure typisch ist.

1. Einleitung

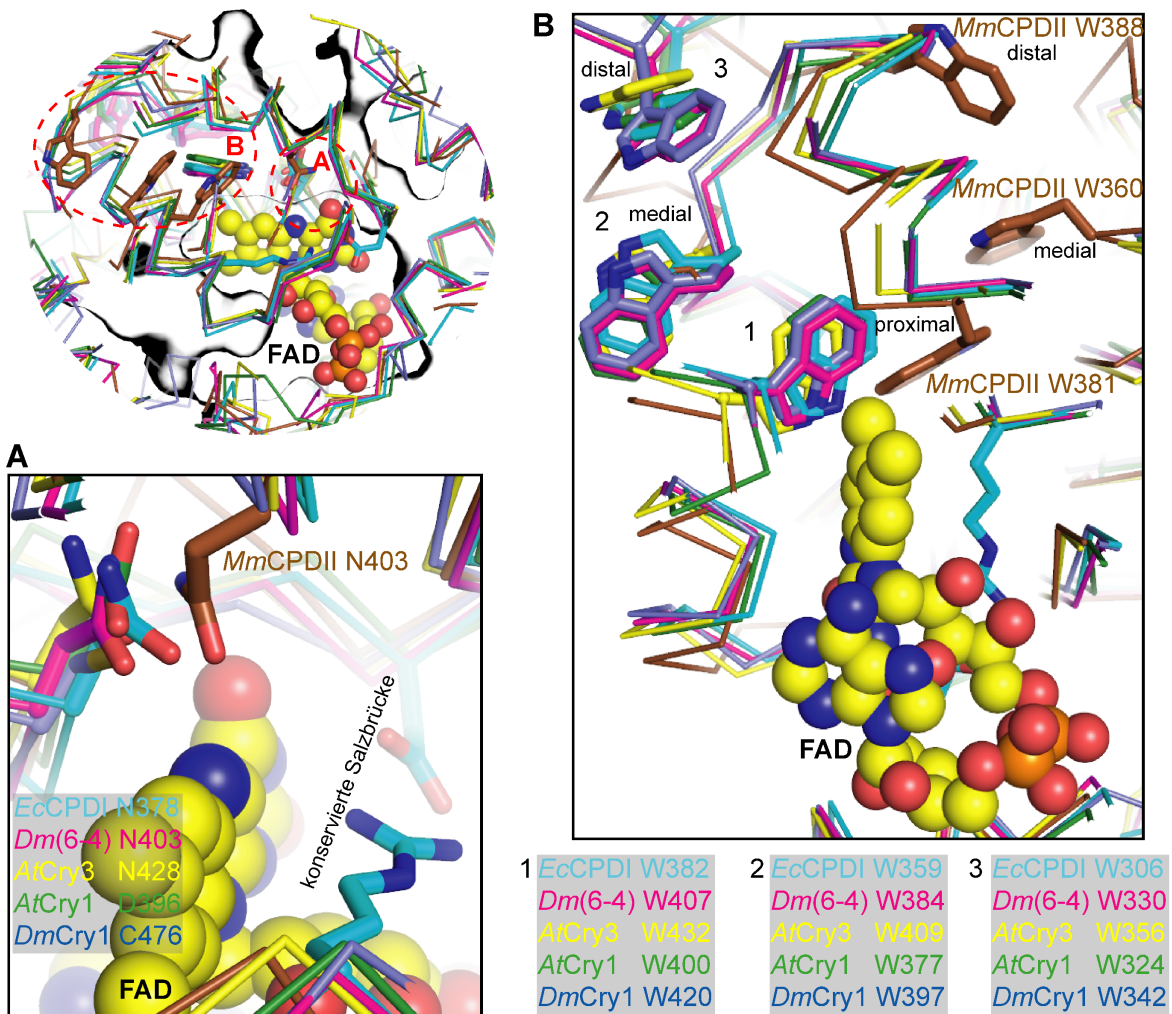


Abbildung 1.7: Ansicht der kanonischen Motive in der Photolyase/Cryptochrom-Superfamilie. Die angesprochenen Elemente sind in der Gesamtübersicht links oben, welche die strukturelle Konservierung innerhalb der Familie verdeutlicht, durch rote Kreise markiert. **A:** Der kanonische Typ interagiert mit dem N5-Stickstoff des FAD über eine konservierte Position auf der hinter dem Flavin entlang laufenden Helix. Nur in den Klasse II-Photolyasen befindet sich dieser Rest auf einem anderen Strukturelement. **B:** Die Tryptophantriade des kanonischen Strukturtyps nimmt eine konservierte Route über die markierten Tryptophane (1, 2, 3). In der Klasse II Photolyase nimmt die die Tryptophantriade eine andere Route. Die funktionellen Unterschiede wurden der Übersichtlichkeit halber an dieser Stelle außer acht gelassen.

Dies ist bei Photolyasen, im CPD- sowie im (6-4)-Typ, und CryDASH das Säureamid eines Asparagins,^{15,30,38,65} bei pflanzlichen Cryptochromen der Säurerest eines Aspartats³⁴ und bei Insekten Cryptochromen das Thiol eines Cysteins, welches jedoch in der Struktur des DmCry1 (4GU5) ungünstig für eine Wasserstoffbrückenbindung positioniert ist.³⁷

Im kanonischen Typ ist diese Aminosäure strukturell stets an der gleichen Position lokalisiert, nämlich auf der α -Helix welche parallel zum Isoalloxazinrings des Flavins entlang läuft. Nur in den CPD-Photolyasen der Klasse II ist das angesprochene Asparagin auf einem anderen

Strukturelement lokalisiert. Die Seitenkette nimmt jedoch räumlich gesehen eine vergleichbare Position ein, so dass die Funktion vollständig erhalten bleibt (vergleiche Abbildung 1.7 A).¹⁰

1.7.2. Die Reduktionskaskade des kanonischen Typs der PCSf

Für die Photoreduktion *in vitro* ist bei Photolyasen und Cryptochromen eine Reduktionskaskade aus mehrere redoxaktiven Aminosäuren essentiell. Beim kanonischen Typ besteht diese aus drei konservierten Tryptophanen. Diese Tryptophantriade ist als Elektronenlochleiter beschrieben worden, von der das gebildete Radikal vom katalytischen FAD bis hin zur Proteinoberfläche geleitet wird. Dieses kann dort anschließend abgesättigt werden (vergleiche Abbildung 1.7 B).⁶⁶

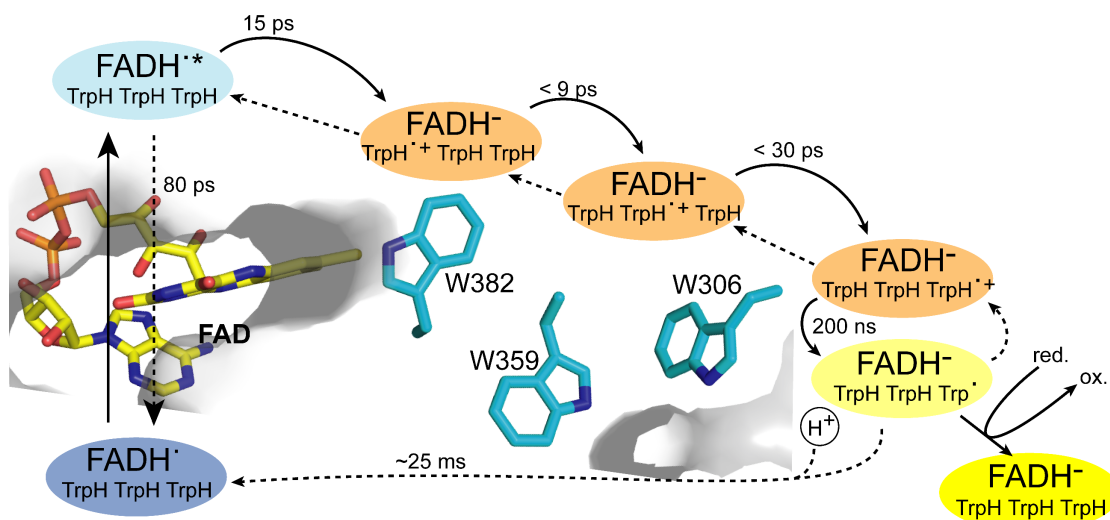


Abbildung 1.8: Schematische Darstellung der Photoreduktionskinetik in der EcCPDI, ausgehend von halb-reduziertem Flavin (FADH^{\cdot}). Nach Anregung des Flavins ($\text{FADH}^{\cdot*}$) kann dieses entweder mit einer Lebensdauer von 80 ps wieder in den Grundzustand zurückfallen oder aber das Flavin abstrahiert in einem schnelleren, aber reversiblen Prozess ein Elektron vom proximalen Tryptophan (W382). Das Elektronenloch wird reversibel über das mediale (W359) zum distalen, oberflächenexponierten Tryptophan (W306) transportiert. Dort kann sich das System durch Abgabe eines Protons stabilisieren. Ist ein externes Reduktionsmittel in der Lösung vorhanden, kann das Radikal von diesem abgesättigt werden, ansonsten fällt das System innerhalb von 25 ms wieder in den Ausgangszustand zurück. Die Zeitangaben sind Brettel & Byrdin, 2010 entnommen.

Diese Triade ist ausgehend von semichinoidem FADH^{\cdot} in der EcCPDI mittels Ultrakurzzeitspektroskopie detailliert untersucht worden (Abbildung 1.8).^{66,67} So abstrahiert das Flavin vom proximalen Tryptophan, nach Absorption eines Photons passender Wellenlänge, reversibel ein Elektron im Zeitraum weniger Picosekunden. Das entstehende Tryptophanylradikal wird schrittweise und ebenfalls reversibel über das mediale zum

1. Einleitung

oberflächenexponierten Tryptophan transportiert. Dieser ganze Prozess ist kürzer als die Lebensdauer des angeregten Flavins. An der Oberfläche kann das kationische Tryptophanylradikal innerhalb von 200 ps deprotonieren und den gebildeten Zustand dadurch zunächst stabilisieren. Bei Anwesenheit eines geeigneten Reduktionsmittels kann das Radikal reduziert werden und das Flavin geht stabil in den vollständig reduzierten Zustand über. Ist kein passendes Reduktionsmittel zugegen, fällt das System innerhalb von gut 25 ms wieder in den Ausgangszustand zurück (Abbildung 1.8).⁶⁷

Normalerweise kann dieses Schema auch auf den Übergang vom vollständig oxidierten Flavin hin zur semichinoiden Form übertragen werden. In manchen Fällen kann aber durch bisher nicht geklärte Prozesse, wie zum Beispiel bei der (6-4)-Photolyase aus *Dunaliella salina* (*Ds*(6-4)) eine langlebige semichinoide Form nur durch Belichtung in Abwesenheit eines externen Reduktionsmittels entstehen.⁶⁸ Wie das Radikalpaar in diesem Enzym stabilisiert wird, ist bisher nicht verstanden.

1.8. Antennenchromophore in der Photolyasen/Cryptochrom-Superfamilie

In Vertretern der PCSf wurden bisher vier Antennenchromophore identifiziert. Dies sind Methenyl-tetrahydrofolat (MTHF), das in der *Ec*CPDI (1DNP³⁰) und dem *At*Cry3 (2J4D³⁵) identifiziert wurde, 8-Hydroxydeazaflavin (F0, 8-HDF), gefunden in der *An*CPDI (1QNF¹⁵) und der *Mm*CPDI⁶⁹, Flavinmononukleotid (FMN), welches in der *Tt*CDI (2J09⁷⁰) gebunden wurde sowie ein zweites FAD im vollständig oxidierten Zustand in der *St*CPDI (2E0I³²) (siehe Abbildung 1.9).

Das Nukleosid 8-HDF und die Nukleotide FMN sowie FAD werden dabei im Inneren der N-terminalen Domäne in konservierten Sequenz- beziehungsweise Strukturmotiven gebunden. MTHF dagegen bindet stark solvensexponiert zwischen den beiden Domänen. Die Bindung des kationischen Moleküls an das Enzym ist qualitativ gesehen nicht so stark wie die der Nukleosid/Nukleotidchromophore und ist vermutlich hauptsächlich elektrostatischer Natur, da MTHF durch Dialyse oder Inkubation bei hohen Ionenstärken annähernd quantitativ vom Protein entfernt werden kann.⁷¹ Die beiden MTHF enthaltenden Strukturen zeigen nur ein konserviertes Glutamat, welches spezifisch mit dem Folat interagiert, und lassen keine weitere Konservierung in der Bindungstasche erkennen.^{30,35}

Trotzdem ist die Entfernung zwischen den beiden Arten von Antennenchromophoren zum FAD in der C-terminalen Domäne in den gelösten Strukturen ähnlich. Alle erweitern bzw.

verstärken das Aktionsspektrum des Proteins, indem die absorbierte Photonenenergie durch resonanten Energietransfer auf den katalytischen Kofaktor übertragen wird. Besonders wichtig erscheint dies bei Photolyasen, da der Absorptionskoeffizient des aktiven, vollständig reduzierten Zustands des katalytischen Chromophors im sichtbaren Spektrum um den Faktor 10 kleiner ist als der der vollständig oxidierten Form (vergleiche Zahlenwerte Abbildung 1.5).¹⁰

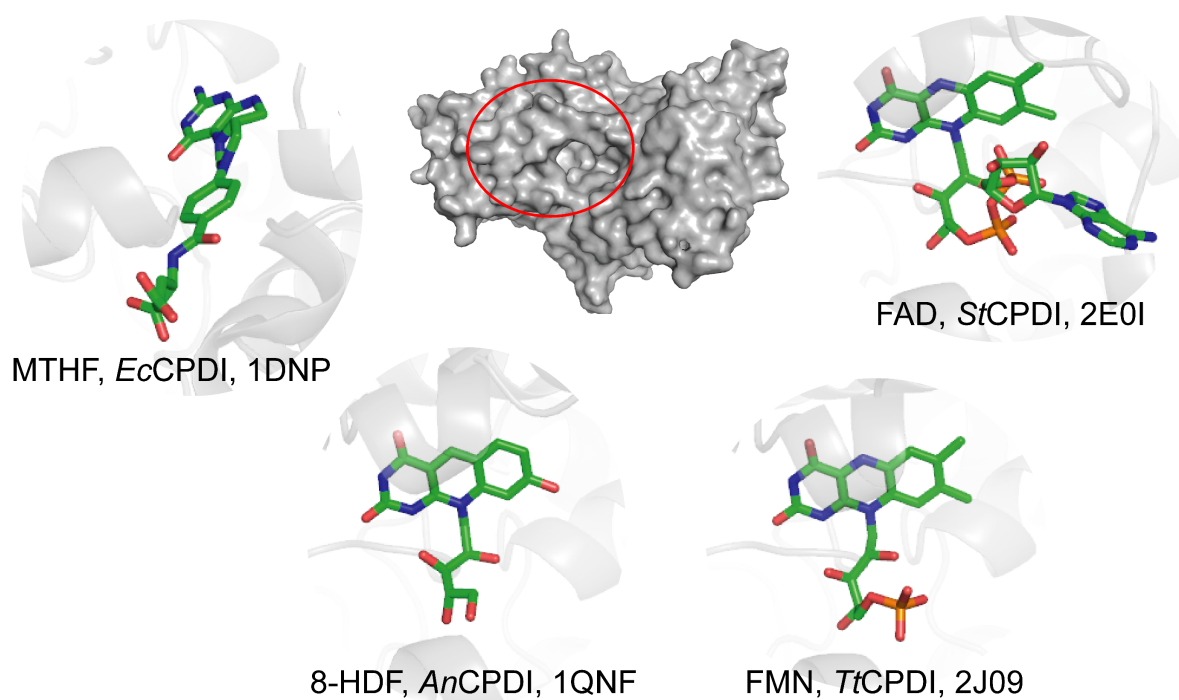


Abbildung 1.9: Identifizierte Antennenchromophore aus der Photolyase/Cryptochrom-Superfamilie. Die N-terminale Domäne der Struktur ist durch den roten Kreis markiert. Das kationische MTHF bindet in einer kleinen Spalte zwischen den beiden Domänen und ist größtenteils solvensexponiert. Der Nucleosidchromophor 8-HDF sowie die beiden Nukleotide FMN und FAD binden im Inneren der N-terminalen Domäne, in einer vergleichbaren Ausrichtung der Isoalloxazinringe. Alle Antennenchromophore nehmen eine vergleichbare Distanz (~17-18 Å) zum katalytischen FAD ein.

1.9. DNA-Bindung durch Photolyasen und Cryptochrome

DNA wird konstant durch UV-B-Strahlung geschädigt. Die beiden möglichen Photoprodukte sind dabei cytotoxisch und wurden in Verbindung mit der Erkrankung Hautkrebs gebracht, für Mikroorganismen können sie letal sein.⁷²⁻⁷⁴ Statistisch gesehen ist nur jedes 16. Basenpaar in DNA ein Thymindimer, von denen nur ein Bruchteil geschädigt ist. Photolyasen müssen ihr Substrat im Hintergrund der umgebenden DNA daher möglichst spezifisch identifizieren, um eine schnelle Reparatur zu gewährleisten. Die beiden Schäden stören die Struktur von B-DNA

1. Einleitung

dabei unterschiedlich stark. Der CPD-Schaden führt zu einem leichten Knick von $\sim 9^\circ$ unter Aufrechterhaltung der Watson-Crick-Paarung, wohingegen das (6-4)-Photoprodukt den DNA-Strang um 44° knickt und die Basenpaarung auf der 3'-Seite verloren geht.⁷⁵

In allen veröffentlichten Komplexstrukturen zwischen Photolyasen und geschädigter dsDNA ist die UV-Läsion aus der Doppelhelix heraus in das aktive Zentrum geklappt, was daher der Schlüsselschritt in der Substraterkennung ist.^{10,38,76} Das Substrat (CPD und (6-4)) wird dabei mit hoher Affinität im niedrigen nanomolaren Bereich gebunden (*Ec*CPDI $K_d = \sim 38$ nmol/L;⁷⁷ *Methanobacterium thermoautotrophicum* CPDI $k_d = \sim 1$ nmol/L;⁷⁸ *Xenopus laevis* (6-4) $K_d = \sim 5$ nmol/L⁷⁹). Diese Studien zeigten außerdem eine intrinsische Affinität von Photolyasen an ungeschädigte DNA, die vermutlich durch den basischen Kanal vermittelt wird (Abbildung 1.10), der die Oberfläche von den zur DNA-Reparatur befähigten Mitglieder der PCSf durchzieht.^{38,76-79}

Die Interaktion der CryDASH Cryptochrome und DNA wurde an den Vertretern aus *A. thaliana* (*AtCry3*)²⁸ und *Vibrio cholerae* (*VcCry1*)⁸⁰ untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Enzyme spezifisch Thymindimere in einzelsträngiger DNA (ssDNA) bzw. bereichsweise ungepaarter dsDNA reparieren können. Allerdings wurden keine Daten zur Affinität veröffentlicht.

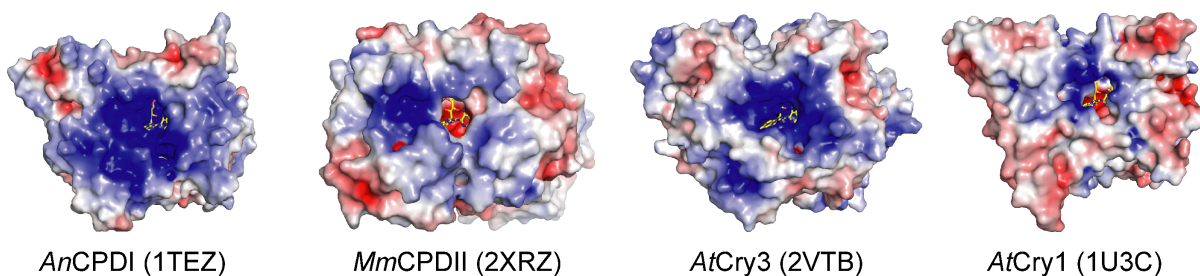


Abbildung 1.10: Vergleich des Oberflächenpotentials von drei Vertreter aus der PCSf, deren DNA-Komplex Strukturen veröffentlicht wurden (*An*CPDI 1TEZ; *Mm*CPDII, 2XRZ, *At*Cry3 2VBT) und dem Cryptochrom 1 aus *A. thaliana* (*At*Cry1 1U3C). Der Bereich um den Zugangskanal zum katalytischen FAD ist in *At*Cry1 wesentlich weniger basisch und deutlich kleiner als in den drei anderen Vertretern, welche eine ausgeprägte DNA-Affinität aufweisen.

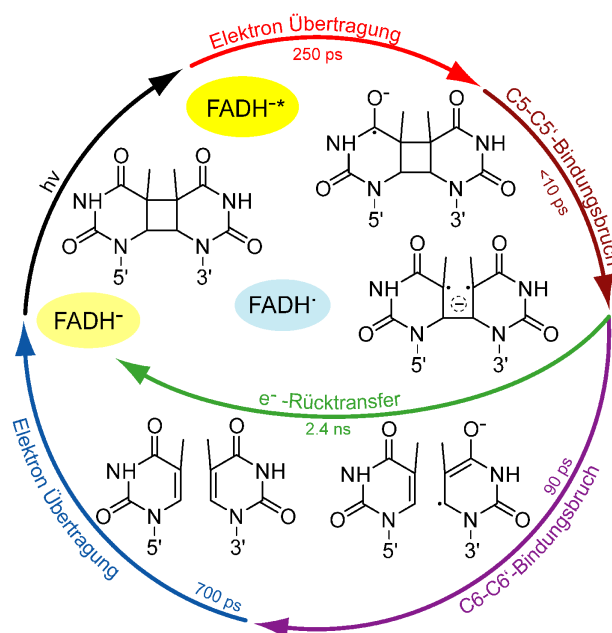
Von den echten Cryptochromen wurde das humane Cryptochrom 2 in DNA-Bindungsstudien untersucht. Dort zeigte es eine starke Bindung an ssDNA ($K_d = 5$ nmol/L), aber eine um den Faktor 100 schwächere für dsDNA, was im Kontrast zu den Photolyasen steht, welche ssDNA und dsDNA mit vergleichbarer Stärke binden.⁸¹ Vermutlich der Verwandtschaft mit (6-4)-Photolyasen geschuldet, bindet humanes Cry2 auch den (6-4)-Schaden mit erhöhter Affinität, das Cryptochrom hat jedoch jegliche Reparaturaktivität verloren.⁸¹ Von pflanzlichen

Cryptochromen ist keine DNA-Bindung bekannt. Das Oberflächenpotential von *AtCry1* (1U3C) zeigt auch warum: Während die DNA-bindende Proteinen wie *AtCry3* oder *MmCPDII* eine stark basische Oberfläche aufweisen, zeigt *AtCry1* einen im Vergleich sehr kleinen neutralen bis schwach basischen Bereich um den Zugangskanal zum FAD (Abbildung 1.10.). Allerdings schließt das keine Interaktion aus, da in der angesprochenen Mutante *AtCry1D396N* (siehe 1.6.1), aufgrund der gezeigten Reparatur von CPD-Schäden in ssDNA zwingend eine Interaktion zwischen Protein und DNA erfolgen muss.

1.10. Kinetik der CPD-Reparatur durch die *EcCPDI*

Der Reparaturmechanismus des CPD-Schadens durch Photolyasen ist in der Literatur viel diskutiert worden. Diskussionspunkte waren dabei immer, von welchen Atomen das Elektron zwischen Flavin und Substrat ausgetauscht wird, sowie die Rolle der einzelnen Aminosäuren in der katalytische Tasche. Durch Ultrakurzzeitspektroskopie wurde der zeitliche und räumliche Ablauf des Reparaturvorganges von Liu *et al.* 2011 veröffentlicht.⁸²

Abbildung 1.11:
Schematischer Reaktionsmechanismus der *EcCPDI* nach Liu *et al.*, 2011. Nach Anregung des katalytisch aktiven Kofaktors FADH überträgt dieser ein Elektron auf das 5'-Thymin des CPD-Schadens. Innerhalb von 10 ps kommt es zum ersten Bindungsbruch. Diese Zeitspanne ist sehr viel kürzer als der unproduktive Elektronenrücktransfer, welcher mit einer Halbwertszeit von 2.4 ns erfolgt. Nach weiteren 90 ps erfolgt der zweite Bindungsbruch und das Radikal ist nun am 3'-Thymidin lokalisiert. Durch den folgenden Elektronentransfer wird die katalytische aktive vollständig reduzierte Form des Flavins innerhalb von 700 ps regeneriert und der CPD-Schaden ist repariert.



Der allgemeine Reparaturvorgang, das heißt lichtgetriebene Injektion des Elektrons in die DNA-Läsion, autokatalytische Spaltung desselben und Rücktransfer des Elektrons auf FADH^{*}, war dabei in der wissenschaftlichen Welt schon länger akzeptiert und ist in 1.6.4 zusammenfassend dargestellt worden.^{25,43} Durch kinetische Studien mittels Ultrakurzzeitspektroskopie konnte der Mechanismus der CPD-Reparatur durch die *EcCPDI*

1. Einleitung

vor kurzem vollständig aufgeklärt werden. Im diesem veröffentlichten Mechanismus (Abbildung 1.11) wird besonders der Einfluss der U-Form des Flavins betont, wodurch das Elektron besonders effizient über den Adeninteil des Kofaktors auf den Schaden tunneln kann.⁸² Das Elektron wird dabei innerhalb von 250 ps auf den 5'-Thyminteil des CPD-Schadens übertragen. In den folgenden 10 ps bricht die C5-C5'-Bindung und die C6-C6'-Bindung folgt innerhalb von 90 ps. Das Radikal ist nun am gebildeten 3'-Thymidin lokalisiert und wird über 700 ps auf das FADH[•] übertragen. Der Rücktransfer vom CPD-Radikal ohne Spaltung desselben ist mit 2.4 ns wesentlich langsamer als die Reparatur, wodurch deren hohe Effizienz zu erklären ist.⁸²

Das Elektron kann nur effizient auf den Schaden übertragen werden, wenn die Lebensdauer des angeregten Zustands lang gegenüber dem ersten Schritt der Reparatur ist. Diese wurde von Kao et al. 2005 mit 1.3 ns bestimmt.⁸³ Die Lebensdauer ist somit gut fünfmal länger als der initiale Schritt in der Reparatur. Für diese lange Lebensdauer ist vor allem die Proteinumgebung verantwortlich, die den Kofaktor in seiner Beweglichkeit einschränkt. So kann die Schwingung entlang der N5-N10-Achse nur schwer durchgeführt werden. Gerade diese Schwingung verkürzt die Lebensdauer des angeregten vollständig reduzierten Flavins in Lösung durch die Möglichkeit der internen Konversion erheblich.⁸⁴

1.11. Das Purpurbakterium *Rhodobacter sphaeroides*

Rhodobacter sphaeroides (Abbildung 1.12) ist ein gramnegatives, monotrich begeißeltes, stäbchenförmiges α -Proteobakterium, dass in der Wassersäule lebt und zur Gruppe der nicht-Schwefel Purpurbakterien gehört. Für die Forschung ist es besonders von Interesse, da es sich unter verschiedensten Bedingungen kultivieren lässt. Bevorzugt ist dabei das anaerobe, phototrophe Wachstum oder das aerobe, chemotrophe Wachstum unter Lichtausschluss.

Unter anderem kann *R. sphaeroides* mit CO₂ als einziger Kohlenstoffquelle leben und ist dazu befähigt, Stickstoff zu fixieren. Durch diese Vielseitigkeit lässt sich *R. sphaeroides* leicht kultivieren und dient als Modellorganismus für die bakterielle Photosynthese, wodurch sein Photosyntheseapparat zu einem der am besten untersuchten gehört.⁸⁵

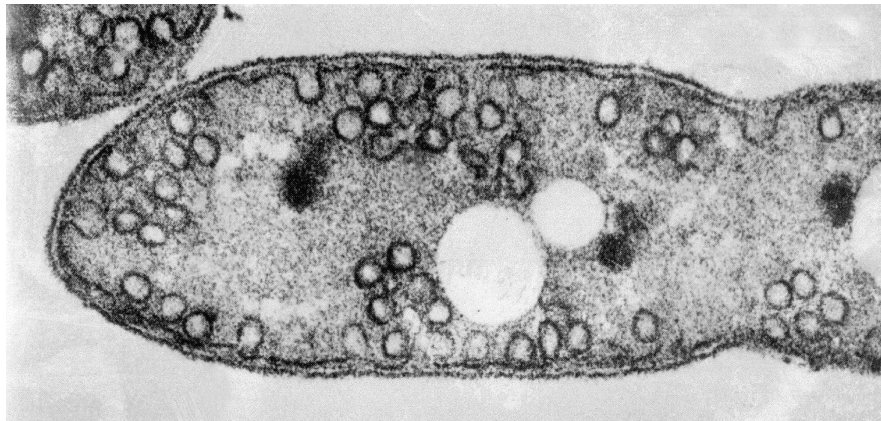


Abbildung 1.12: Aufnahme von *Rhodobacter sphaeroides*. Die dunklen Kreise sind die Einstülpungen der intercytoplasmatischen Membran, der Ort der Photosynthese von *R. sphaeroides*. Mit freundlicher Genehmigung (courtesy of) Timothy Donohue, University of Wisconsin-Madison.

1.11.1. Die Regulation der Photosynthese in *R. sphaeroides*

Der Photosyntheseapparat (PS) von *R. sphaeroides* besteht aus einem Photosystem II-artigem Reaktionszentrum (RZ) mit assoziierten Lichtsammelkomplexen 1 und 2 (LHC 1, LHC 2). Das RZ reduziert nach Lichtabsorption Ubichinon (Q) zu Ubichinol (QH₂), wobei der primäre Elektronendonator Cytochrom c₂ ist. Mit dem reduzierten Ubichinol können ein Cytochrom bc₁-Komplex, zur Erzeugung des Protonengradienten für die ATP Synthese, und eine NADH:Chinon-Oxidoreduktase, welche die Reduktionsäquivalente auf NADH zur Kohlenstofffixierung im Calvinzyklus überträgt, gespeist werden. Der Elektronentransfer zwischen dem RZ und Cytochrom bc₁-Komplex verläuft dabei zyklisch über das angesprochene Cytochrom-c₂.⁸⁵

Strukturell ist der Apparat in intercytoplasmatischen Membranen (ICM, siehe Abbildung 1.12), Einstülpungen der Cytoplasmamembran, lokalisiert. Diese ICM werden erst bei sinkenden Sauerstoffkonzentrationen gebildet, da *R. sphaeroides* anaerobe Photosynthese betreibt. Untersuchungen haben gezeigt, dass auch die Regulation der Expression von Genen des PS sauerstoffabhängig ist. Zentraler Regulator ist dabei das Protein PpsR, dass das photosynthetische Operon reprimiert.⁸⁵ Die Wahrnehmung der Sauerstoffkonzentration erfolgt dabei vermutlich in Abhängigkeit vom Redoxpotential über die Interaktion mit dem bereits erwähnten AppA¹⁹. AppA besteht aus einer N-terminalen BLUF-Domäne und bindet ein FAD, C-terminal bindet das Protein eine Häm-Gruppe in einer neuartigen Domäne.⁸⁶ Diese Häm-Gruppe steuert dabei die Interaktion zwischen AppA und PspR abhängig von ihrem Oxidationszustand. So wird die Affinität von AppA zu PspR bei niedrigen

1. Einleitung

Sauerstoffkonzentrationen erhöht und die Repression der Photosynthesegene dadurch verringert. Zusätzlich zeigt das AppA/PpsR-System auch eine blaulichtabhängige Regulation.⁸⁷ Neben AppA wurde in *R. sphaeroides* ein zweiter Baulichtrezeptor identifiziert, das Cryptochrom B (*R*sCryB).⁸⁸

1.11.2. Das Cryptochrom B aus *R. sphaeroides*

Zu Beginn dieser Arbeit waren einige biochemische Eckdaten aus der Erstveröffentlichung von Hendrischk *et al.*, 2009⁸⁸ zu Cryptochrom B aus *R. sphaeroides* bekannt. Von der Primärsequenz her schien es entfernt verwandt mit den Mitgliedern der PCSf. Das Protein besitzt eine C-terminale FAD-7-Domäne (PFAM PF03441)⁴⁰ und bindet FAD. Daneben gab es starke Hinweise auf einen weiteren Chromophor, dessen Identität jedoch nicht geklärt werden konnte. *R*sCryB zeigt eine höhere Affinität zu einzelsträngiger DNA ($K_d = \sim 30$ nmol/L) im Vergleich zu dsDNA ($K_d = \sim 1$ μ mol/L). Ebenfalls zeigte es erhöhte Affinität zu einzelsträngiger RNA. Das bakterielle Cryptochrom zeigt weiterhin eine leicht erhöhte Affinität zum CPD-Schaden ($K_d = \sim 7.5$ nmol/L), weist jedoch keinerlei Reparaturaktivität für diesen auf. Durch eine *in vivo* Studie konnte gezeigt werden, dass *R*sCryB lichtabhängig für die Transkriptionskontrolle von Photosynthesegenen verantwortlich ist und das Expressionslevel von *cryB* selbst durch Singulett-Sauerstoff erhöht werden kann. Damit ist *R*sCryB das erste bakterielle Cryptochrom, dem eine direkte Funktion als Photorezeptor nachgewiesen wurde.⁸⁸

2. Motivation und Zielsetzung

Cryptochrome sind essentielle Blaulichtrezeptoren in einer Vielzahl von Organismen. Während ihre Funktion in höheren pflanzlichen und eukaryotischen Systemen gut untersucht ist, sind die bakteriellen Cryptochrome bisher unter-repräsentativ charakterisiert. Jedoch sind gerade zentrale Komponenten wichtiger Regulationssysteme Ausgangspunkt für ein tieferes Verständnis der molekularen Vorgänge und können Angriffspunkte beim Kampf gegen Pathogene darstellen.

Zu Beginn dieser Arbeit existierte nur eine rudimentäre biochemische Analyse des Cryptochrom B aus *Rhodobacter sphaeroides* sowie grundlegende Untersuchungen zur *in vivo* Funktion als Blaulicht- und Redoxsensor. Durch die Determination der dreidimensionalen Struktur von *RsCryB* sollten tiefere Einblicke in die Funktionsweise des Signalproteins gewonnen werden, vor allem bezüglich der molekularen Interaktion und Erkennung. Aufbauend auf der strukturellen Analyse sollten weitergehende funktionelle Untersuchungen durch gezielte Mutation einzelner Aminosäuren an zentralen Punkten von *RsCryB* erfolgen.

Photolyasen bilden den primären Schutz von Mikroorganismen gegen die mutagenen und letalen UV-Schäden an DNA, von denen der CPD-Schaden zwischen zwei benachbarten Thymidinen der häufigste ist. Während die Vertreter der Klasse I CPD-Photolyasen sowohl strukturell als auch funktionell gut untersucht sind, lag eine solche Studie für Klasse II CPD-Photolyasen zu Beginn dieser Arbeit nicht vor. Durch die vorhandenen strukturellen Vorarbeiten lag es daher nahe, weitergehende Untersuchungen an der Klasse II CPD-Photolyase aus *Methanosarcina mazei* durchzuführen. Von besonderem Interesse war dabei die Bindung der *MmCPDII* an den CPD-Schaden und an intakte DNA, sowie die spektroskopische Charakterisierung des aktiven Zustands des Enzyms. Letztere sollte Aufschluss darüber geben, ob sich die strukturellen Unterschiede der beiden Photolyase-Subtypen in funktionellen Divergenzen manifestieren.

Mit der Untersuchung der beiden angesprochenen nichtkanonischen Mitglieder der Photolyase/Cryptochrom-Superfamilie und den durchgeführten Arbeiten an der (6-4)-Photolyase aus *Dunaliella salina*, einem Enzym mit potentiell dualer Funktion, sollte das Struktur-Funktions-Verständnis der Photolyase/Cryptochrom-Superfamilie erweitert werden.

3. Material und Methoden

3.1. In dieser Arbeit verwendete Materialien.

3.1.1. Auflistung der verwendeten Geräte, Programme sowie Webtools.

In den Folgenden Tabellen finden sich die in dieser Arbeit an der Philipps-Universität verwendeten Geräte (Tab. 3.1) und Programme (Tab. 3.2) in alphabetischer Reihenfolge. Im Weiteren Verlauf des Textes wurde darauf verzichtet, den Firmen- oder Herstellernamen nochmals gesondert aufzuführen.

Tab. 3.1: Auflistung der verwendeten Geräte.

Bezeichnung	Firma, Herstellername
Äkta Purifier bestehend aus: pH/C-900, UV-900, P-900, Frac-950	GE Healthcare
Apparaturen für Agarosegelelektrophorese	Feinmechanik Philipps-Universität Marburg, FB Chemie
Autoklav T-Line	Fedegari
Brutschrank	Hereaus
Cartesian Microsys 4000XL Kristallisationsroboter	Genomic Solutions
Dokumentationssystem für Agarosegele bestehend aus: Biodoc AnalyzeLive Paket UV-Tisch ($\lambda = 312 \text{ nm}$)	Biometra Vilber-Lourmat
Durchlaufkühler DLK 1002	Fryka
Elektrophorese Spannungsquelle Modell 453	ISCO
Fastprep 24	MP Biomedicals
Frenchpress zur präparativen Lyse von <i>E. coli</i> Zellen	Feinmechanik Philipps-Universität Marburg, FB Biologie

Bezeichnung	Firma, Herstellername
Gelschüttler Modell 3013	GFL
G50 Spinsäulen	GE Healthcare
Heizblock Modell BT3	Grant Instruments
High Power LED's diverser Wellenlängen	Roithner Lasertechnik (LED) IT&E der Philipps-Universität Marburg (Montage)
Honeybee 693 Kristallisationsroboter	Digilab
JA-10 / JA-20 Zentrifugenbecher	Beckmann
Küvetten aus Quarzglas <i>Suprasil</i> für spektroskopische Untersuchungen	Hellma
Loops diverser Größen	Hampton Research
Micromounts diverser Größen	Jena Bioscience
Milli-Q Wasseranlage, Seralpur Pro90CN	Seral
Nanodrop ND1000	PEQ-Lab
Probenhalter mit Peltierelement passend zu Zweistrahlsspektrophotometer V-660	JASCO
pH-Meter Digital 252	WTW
Pipetten Eppendorf Research: P1000, P200, P100, P10, P2.5	Eppendorf
Schüttelinkubatoren: Certomat IS Modell TH25 Multitron eco	Sartorius Edmund Bühler Infors
SDS-Page Apparaturen Mighty Small II SE250	Hofer Scientific
Säulen 1 mL und 5mL HisTrap FF	GE Healthcare
Säule 5 mL HiTrap Heparin HP	GE Healthcare
Säulen 1 mL Protino-Ni-NTA	Macherey & Nagel

3. Material und Methoden

Bezeichnung	Firma, Herstellername
Säulenmaterial Ni-NTA Superflow	Qiagen
Säulenmaterial Superdex 200	GE Healthcare
Säulenkörper des Typs XK16/60 und XK16/20	GE Healthcare
Vortexer VTX 3000 L	LMS
Waagen LabStyle54, Delta Range PC2200	Mettler Toledo
Wasserbad NK22	Haake
Westernblotapparatur	Peqlab
Zentrifugen:	
J2/21-ME – Festwinkelrotoren JA-10 und JA20	Beckmann
Biofuge pico - Tischzentrifuge	Hereaus
Centrifuge 5810 R – Schwingrotorzentrifuge, kühlbar	Eppendorf
Sigma Laborzentrifuge 2-15 – Tischzentrifuge, kühlbar	B. Braun
Zweistrahlspektrophotometer V-660	JASCO

Tab. 3.2: Auflistung der verwendete Programme.

Programm	Hersteller
APBS ⁸⁹ , <i>Ab initio Poison-Boltzmann Solver</i> - Generierung von elektrostatischen Proteinoberflächen	Baker und Mitarbeiter
Coot ⁹⁰ - Strukturverfeinerung	Emsley und Mitarbeiter
CCP4 Paket ^{91,92} - Strukturlösung und Verfeinerung	Collaborative Computational Project 4
ClustalW2 ¹¹ – Multiple Sequenz Alignments	http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2
MODBASE ⁹³ – Datenbank für Proteinstrukturmodelle	Pieper und Mitarbeiter
Mosflm ^{94,95} – Analyse und Integration von Datensätzen	Leslie und Mitarbeiter
NEB-Tools – Informationen und Protokolle zu Enzymen von NEB	http://www.neb.com ; NEB
Mascot – Auswertung von MS Daten von tryptischen Protein Fragmenten	http://www.matrixscience.com/ ; MatrixScience

Programm	Hersteller
Origin 7.0 – wissenschaftliche Tabellenkalkulation	OriginLab
Phenix ⁹⁶ - Strukturlösung und Verfeinerung	Adams und Mitarbeiter
Pymol ⁹⁷ – Betrachtung von .pdb Strukturdaten The PyMol molecular graphics System V. 0.99 – 1.4	Schrödinger, LLC
XDS ⁹⁸	Kabsch und Mitarbeiter

3.1.2. Auflistung der Verbrauchsmaterialien, Chemikalien und Enzyme.

Im täglichen Laborgebrauch verwendete Chemikalien wurden bei den Firmen Merck, Sigma-Aldrich, Applichem, Roth oder VWR Prolabo in p.a. oder vergleichbarer Qualität gekauft und sind nicht gesondert aufgeführt. Ausnahmen oder Spezialchemikalien sind in der folgenden Tabelle (Tab. 3.3) integriert. Alle verwendeten Enzyme (Restriktionsenzyme, T4-Ligase, Phusion-Polymerase) sowie die zugehörige Puffer und Reagenzien wurden von der Fa. New England Biolabs bezogen. Im Laborgebrauch verwendete Verbrauchsmaterialien sind in Tab. 3.4 gesondert aufgeführt. Es wurde weiterhin darauf verzichtet, Firmen- oder Herstellernamen im späteren Text nochmals aufzuführen.

Tab. 3.3: Auflistung der Chemikalien.

Bezeichnung	Lieferant
Anti-His-HRP-Konjugat	Qiagen
Bactro Trypton	Difco
Bacto Yeast Extrakt	Difco
Bradford Protein-Assay	Bio-Rad
Coomassie Brilliant Blue G-250	Serva
ECL Detektion Kit	Qiagen
Entwickler	Kodak
Glycerin Ultrapure, MB Grade – für die Ultrakurzzeitspektroskopie	Affymetrix
Kristallisationsscreens	Qiagen

3. Material und Methoden

Bezeichnung	Lieferant
Rotiphorese Gel30 – Mischung aus Acrylamid und Bisacrylamid für die SDS-PAGE	Roth
Tinte Königsblau 4001	Pelikan
Virkon	VWR
VspI (AseI), Restriktionsenzym siehe 3.4.8	Fermentas

Tab. 3.4: Verwendete Verbrauchsmaterialien.

Bezeichnung	Lieferant
24 well Platten, gefettet	VDX
24 well EasyXtal Platten mit Schraubverschluss und <i>dropguard</i>	Qiagen
96 well Platten Typ MRC-2	Jena Bioscience
Dialysemembran SnakeSkin, 3500 Da Molekulargewicht <i>cut-off</i>	Thermo Scientific
Einmalpipetten, steril, diverse Volumina	Sarstedt
Einmalpipettenspitzen, blau, gelb, weiß	Sarstedt
Einmalküvetten PS10x4x45 mm	Sarstedt
Entsalzungssäulen PD-10	GE Healthcare
Gel-Extraction Kit zur präparativen Reinigung von DNA-Fragmenten mit Agarosegelelektrophorese	Qiagen
Hibond-ECL Nitrocellulose Membran	GE Healthcare
Konzentratoren für Ultrazentrifugation Amicon Ultra 4	Millipore
Mikrodialyse-Stäbchen (<i>microdialysis rods HR3-350</i>), 10 µL	Hampton Research
PCR-Purification Kit zur Extraktion von PCR-Amplifikaten > 100 bp aus PCR-Reaktionen	Qiagen
QIAprep spin MiniPrep Kit zur Extraktion von Plasmid DNA aus <i>E. coli</i> Übernachtskulturen	Qiagen

Bezeichnung	Lieferant
Reaktionsgefäße: Eppendorf-Cups (safelock) Clik-lok Microcentrifuge tubes	Eppendorf Simport
Röntgenfilm	Kodak
Spritzenvorsatzfilter Filtropur S 0.2 (0.2µm Porendurchmesser) und S 0.45 (0.45µm Porendurchmesser)	Sarstedt
Sterilfilter für Vorratsflaschen PES Membran, 0.22 µm Porendurchmesser	Corning
Whatmanpapier / Gel-Blotting-Papier, 1.5 mm	CarlRoth
Zentrifugenfilter Ultrafree PVDF-Membran, 0.22 µm Porendurchmesser	Millipore

3.1.3. Beschreibung der verwendeten Bakterienstämme.

Alle verwendeten Bakterienstämme sind bereits gentechnisch veränderte Organismen und wurden in die Sicherheitsstufe S1 klassifiziert. Sie wurden gemäß den gesetzlichen geltenden Bestimmung gehandhabt.

3.1.3.1. *Escherichia coli* DH5 α ⁹⁹

Genotyp: F ϕ 80dlacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169 *recA1 endA1 hsdR17*(rk⁻, mk⁺) *phoA supE44 λ -thi-1 gyrA96 relA1*

Chemisch kompetente *E. coli* DH5 α Zellen wurden für molekularbiologische Arbeiten verwendet, da sie defizient in den DNasen sind, welche DNA nach der Transformation abbauen. Der Zellstamm wurden von der Fa. Invitrogen bezogen.

3.1.3.2. *Escherichia coli* BL21(DE3)Gold

Genotyp: F⁻ *ompT hsdS_B* (r_B⁻m_B⁻) *dcm⁺ TetR gal λ* (DE3) *endA Hte*

E. coli BL21(DE3)Gold Zellen tragen durch eine Infektion mit dem Phagen DE3 chromosomal ein Gen für die T7-RNA-Polymerase unter Kontrolle des lacUV5-Promotors.

3. Material und Methoden

Die Expression der Phagen-Polymerase ist somit durch IPTG induzierbar oder kann unter Autoinduktionsbedingungen erfolgen. Der Stamm besitzt keine ompT- und Lon-Proteasen, welche hauptsächlich für den unspezifischen Abbau von Proteinen verantwortlich sind. Durch die vorgenommenen Änderungen ist dieser Stamm auf Erhöhung des Expressionslevels und gute Ausbeuten des rekombinanten Proteins optimiert. Der Zellstamm wurde von der Fa. Novagen bezogen und zur Proteinproduktion verwendet.

3.1.3.3. *Escherichia coli* Rosetta

Genotype: F⁻ ompT hsdSB(rB⁻ mB⁻) gal dcm (DE3) pRARE (CamR)

Um das Problem der seltenen Codone (*rare codons*) zu lösen, wurde der Stamm Rosetta entwickelt. Auf einem mit Chloramphenicolresistenz selektionsmarkierten Plasmid werden die in *E. coli* seltenen tRNAs für die Aminosäuren Arg (AGG und AGA), Ile (AUA), Leu (CUA), Pro (CCC) und Gly (GGA) unter Kontrolle der jeweils nativen Promotoren zur Verfügung gestellt, wodurch deren Kopienanzahl in der Zelle erhöht wird. Aufgrund der verbesserten Verfügbarkeit kommt es seltener zum Abbruch der Translation durch tRNA-Mangel und die Ausbeute an rekombinanten Protein kann somit deutlich erhöht werden. Auch in diesem Stamm ist die Induktion der Genexpression chemisch durch IPTG oder durch Autoinduktion möglich. Der Zellstamm wurde von der Fa. Novagen bezogen und wurde zur Produktion von RsCryB und dessen erzeugten Varianten eingesetzt.

3.1.4. DNA-Oligonukleotide und Vektoren

3.1.4.1. Auflistung der DNA-Oligonukleotide

Im Folgenden (Tab. 3.5) sind alle DNA-Oligonukleotide, welche als sogenannte Primer in PCR-Experimenten oder in DNA-Reparaturassays verwendet wurden, aufgelistet. Die Oligonukleotide wurden standardmäßig bei der Fa. Metabion geordert. Gegebenenfalls eingefügte Schnittstellen sind im Namen sowie durch unterstreichen in der Sequenz gekennzeichnet. Mutationen der Wildtypsequenz in Mutageneseprimern sind durch fette Schrift und die Bezeichnung im Namen des Oligonukleotids angezeigt. Die verwendeten Abkürzungen „fwd“ und „rev“ stehen jeweils für den *forward* (vorwärts) gerichteten Primer,

welcher am *antisense* Strang bindet und für den *reverse* (rückwärts) gerichteten Primer, welcher am *sense* Strang bindet. Oligonukleotide mit „Pho“ in der Sequenz sind am entsprechenden Ende der Sequenz phosphoryliert. Die Bezeichnung T<>T weist auf ein Thymindimer an der entsprechenden Position hin.

Tab. 3.5: Auflistung der verwendeten DNA-Oligomere.

Name	Sequenz
<i>RsCryB</i> -NdeI-fwd	5'-GTTGTT <u>CATATG</u> CTGACACGGCTCATCCTC-3'
<i>RsCryB</i> -HindIII-rev	5'-CATTACA <u>AGCTT</u> TTCAGACCGGCTCGCC-3'
<i>RsCryB</i> -D10L-fwd	5'-Pho-GTGCTGGGCT TTG CAGCTCAGGC-3'
<i>RsCryB</i> -D10L-rev	5'-Pho-GAGGATGAGCCGTGTCAGCATATGG-3'
<i>RsCryB</i> -E37F-fwd	5'-Pho-GAG TTG GGCACCTATGTCCC-3'
<i>RsCryB</i> -E37F-rev	5'-Pho-GTCATGGCCGAGGTGATG-3'
<i>RsCryB</i> -Y40F-fwd	5'-Pho-GGGCACCT TT TGTCCCGCAC-3'
<i>RsCryB</i> -Y40F-rev	5'-Pho-CATGGCCGAGGTGATGGAGGA-3'
<i>RsCryB</i> -W338F-fwd	5'-Pho-CCGCTGTACT TC GGCAAGCCCACG-3'
<i>RsCryB</i> -W338F-rev	5'-Pho-CGGCAGGGCGGGCGCTGTG-3'
<i>RsCryB</i> -W386F-fwd	5'-Pho-CACGAAT TT CTATCTCTCGGTCTATATC-3'
<i>RsCryB</i> -W386F-rev	5'-Pho-CACCTCGGCGGGATCGAC-3'
<i>RsCryB</i> -Y387F-fwd	5'-Pho-GAATGGT TT TCTCTCGGTCTATATC-3'
<i>RsCryB</i> -Y387F-rev	5'-Pho-GTGCACCTCGGGCGGG-3'
<i>RsCryB</i> -Y391F-fwd	5'-Pho-GTATCTCTCGGTCT TT TATCGATGCGCTGG-3'
<i>RsCryB</i> -Y391F-rev	5'-Pho-CATTTCGTGCACCTCGGCG-3'
<i>RsCryB</i> -Y387F-Y391F-fwd	5'-Pho-GT TT TCTCTCGGTCT TT TATCGATGCGCTGG-3'
<i>RsCryB</i> -H384F-fwd	5'-Pho-GCCGAGGTG TT TCGAATGGTATCTC-3'
<i>RsCryB</i> -H384F-rev	5'-Pho-GCGGGCGTTCGATCCC-3'
<i>RsCryB</i> -E399D-fwd	5'-Pho-CTGGAATGGGTTCGA TT GCGCCGAACAC-3'

3. Material und Methoden

Name	Sequenz
<i>R</i> sCryB-E399N-fwd	5'-Pho-CTGGAATGGGTCAATGCGCCGAACAC-3'
<i>R</i> sCryB-E399Q-fwd	5'-Pho-CTGGAATGGGTCCAGGCGCCGAACAC-3'
<i>R</i> sCryB-E399x-rev	5'-Pho-CGCATCGATATAGACCGAGAGATACCATTTCGTG-3'
IRD-T<>T	5'-IRDye700- AAAATGCTGGATGTTCGAGGTGTAAT<>TAATGTGGAGCTGTAGGTC GTAAAA-3' ²⁸
IRD-TT	5'-IRDye700- AAAATGCTGGATGTTCGAGGTGTAATTAATGTGGAGCTGTAGGTCGT AAAA-3' ²⁸
Gegenstrang	5'- TTTTACGACCTACAGCTCCACATTAATTACACCTCGACATCCAGCA TTTT-3' ²⁸
Oligo dT ₁₈	5'-TTTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3'
Oligo mit synthetischem (6-4)- Schaden ³⁸	5'-AGGT (6-4) TGGC

3.1.4.2. Vektoren

In dieser Arbeit wurde das Plasmid pET-28a(+) der Fa. Novagen als Vektor für rekombinante Gene zur Expression in *E. coli* verwendet. Der Vektor vermittelt eine Kanamycinresistenz, verfügt über den Replikationsursprung pBR322 und kodiert das *lacI* Gen. In die *multiple cloning site (mcs)* mit diversen Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme können Gene mit einem N-terminalen und/oder C-terminalen His-Tag fusioniert werden, wobei die N-terminale Variante eine zusätzliche Thrombin-Schnittstelle enthält, so dass der Tag nach der Proteinreinigung abgespalten werden kann. Im 5'-Bereich der *mcs* befindet sich der T7-Promotor, welcher durch eine Bindestelle für den lac-Repressor gesteuert werden kann, in 3'-Richtung von der *mcs* befindet sich der T7-Terminator zum kontrollierten Abbruch der Transkription.

3.1.5. Kulturmedien, Stammlösungen und Puffer

Im Folgenden werden die verwendeten Kulturmedien zur Anzucht von Bakterien, die verwendeten Stammlösungen sowie alle verwendeten Puffer aufgeführt. Die Rezepte für Kulturmedien sowie Puffer für die Agarosegelelektrophorese und die SDS-PAGE sind dabei dem Buch *Molecular cloning* von *Sambrook, Fritsch & Maniatis* entnommen¹⁰⁰.

3.1.5.1. Kulturmedien zur Anzucht von *Escherichia coli*

Kulturmedien wurden bei 121 °C und 2 bar Druck autoklaviert, um sie zu sterilisieren. Die Medien wurden anschließend verschlossen bis zu mehreren Wochen steril gelagert werden.

3.1.5.1.1. Lysogeny broth Medium

Das *lysogeny broth* (LB) Medium¹⁰¹ ist ein Vollmedium, welches, versetzt mit entsprechenden Selektionsmarkern, für Übernachtkulturen verwendet wurde. Durch Zusatz von 1.5% (w/v) Agar-Agar wurde Festmedium für LB-Agar-Platten hergestellt. Das Medium wurde bei RT gelagert und Selektionsmarker direkt vor der Verwendung zugesetzt. Festmedium musste zum Gießen erneut aufgekocht werden, die entsprechenden Selektionsmarker wurden dabei erst nach Abkühlen auf 50 °C zugesetzt.

Tab. 3.6: *Lysogeny Broth* nach Bertani.

Lysogeny Broth (LB) Medium	
Reagenz	Menge
Bacto Yeast	5 g
Bacto Trypton	10 g
NaCl	10 g
10 mol/L NaOH	400 µL
Entionisiertes Wasser	auf 1 L

3.1.5.1.2. Terrific Broth Medium

Das *terrific broth* (TB) Medium¹⁰² ist besonders geeignet für die durch Autoinduktion induzierte Genexpression in *Escherichia coli*. Der verwendete 10x Phosphatpuffer muss getrennt autoklaviert werden, um Präzipitate zu vermeiden. Das Medium wird vor Verwendung durch Zugabe des Puffers sowie eines passenden Selektionsmarkers vervollständigt.

3. Material und Methoden

Tab. 3.7: Terrific broth Medium und 10x Phosphatpuffer nach Tartof.¹⁰²

Terrific Broth (TB) Medium		10x Phosphatpuffer	
Reagenz	Menge	Reagenz	Konzentration
Bacto Yeast	24 g	KH ₂ PO ₄	0.17 mol/L
Bacto Trypton	12 g	K ₂ HPO ₄	0.72 mol/L
Glycerin	4 mL		
Entionisiertes Wasser	auf 900 mL		

3.1.5.2. Stammlösungen

Häufig verwendete Chemikalien wurden als 1000x Stammlösungen angesetzt. Die Lösungen wurden unter sterilen Bedingungen über Spritzenvorsatzfilter (0.2 µm) filtriert und bei -20 °C gelagert.

Tab. 3.8: Liste der verwendeten Stammlösungen.

Bezeichnung	Chemikalie	Lösungsmittel	Konzentration
Kan35	Kanamycin	Milli-Q H ₂ O	35 mg/mL
Cam34	Chloramphenicol	Ethanol p.a.	34 mg/mL
Strep50	Streptomycin	Milli-Q H ₂ O	50 mg/mL
Glucose	Glucose	Milli-Q H ₂ O	1 mol/L

3.1.5.3. Übersicht über die verwendeten Puffer in dieser Arbeit

Puffer wurden generell mit entionisiertem Wasser angesetzt (falls nicht anders angegeben) und üblicherweise bei 4 °C gelagert. Puffer für die Proteinreinigung wurden über einen Membranfilter (0.45 µm Porengröße) gegeben.

3.1.5.3.1. Puffer für die Agarosegelelektrophorese.

Tab. 3.9: Puffer für die Agarosegelelektrophorese von DNA.

6x DNA-Probenpuffer		10x TBE-Puffer	
Chemikalie	Konzentration	Chemikalie	Konzentration
Bromphenolblau	0.03% (w/v)	Tris	1 mol/L
Tris/HCl, pH7.6	10 mmol/L	Borsäure	1 mol/L
Glycerin	60 mmol/L	EDTA	20 mmol/L
EDTA	60% (w/v)		

Die Puffer für die Agarosegelelektrophorese wurden bei Raumtemperatur gelagert.

3.1.5.3.2. Puffer für den Westernblot.

Tab. 3.10: Puffer für den Westernblot.

Transferpuffer		10x TBS-Puffer	
Chemikalie	Konzentration	Chemikalie	Konzentration
Tris/HCl pH 8.0	25 mmol/L	Tris/HCl pH 7.3	100 mmol/L
Methanol	20% (v/v)	NaCl	1.37 mol/L
Glycin	40 mmol/L		
SDS	0.0375% (w/v)		

Tintenstain		TBS-T-Puffer	
Chemikalie	Konzentration	Chemikalie	Konzentration
Tinte Königsblau	2% (v/v)	Tween20	0.05% (v/v), 1xTBS
Essigsäure	1% (v/v)		

Blotentfärber	
Chemikalie	Konzentration
NaOH	200 mmol/L

Die Puffer für den Westernblot wurden bei Raumtemperatur gelagert.

3. Material und Methoden

3.1.5.3.3. Puffer für die SDS-PAGE.

Tab. 3.11: Puffer für die SDS-PAGE.

Trenngelpuffer		SDS-Probenpuffer	
Chemikalie	Konzentration	Chemikalie	Konzentration
Tris/HCl, pH 8.8	1.125 mol/L	Tris/HCl, pH 6.8	62.5 mmol/L
Saccharose	30% (w/v)	Glycerin	15% (w/v)
		SDS	4% (w/v)
		Bromphenolblau	Spatelspitze
		2-Mercaptoethanol	4% (w/v)

Sammelgelpuffer		Färbelösung	
Chemikalie	Konzentration	Chemikalie	Konzentration
Tris/HCl, pH 6.8	0.625 mol/L	Essigsäure	5% (v/v)
		Ethanol	28% (v/v)
		Coomassie G250	0.25% (w/v)

10x Laufpuffer		Entfärbelösung	
Chemikalie	Konzentration	Chemikalie	Konzentration
Glycin	2 mol/L	Essigsäure	5% (v/v)
SDS	15% (w/v)	2-Propanol	28% (v/v)
Tris	0.25 mol/L		

Trenngel- und Sammelgelpuffer wurden bei 4 °C gelagert. Der SDS-Probenpuffer wurde ohne 2-Mercaptoethanol angesetzt und bei Raumtemperatur gelagert. Nach Bedarf wurde ein Aliquot mit 2-Mercaptoethanol vervollständigt und direkt verwendet.

3.1.5.3.4. Puffer zur Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* Zellen.

Tab. 3.12: Puffer zur Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*.

TFB I		TFB II	
Reagenz	Konzentration	Reagenz	Konzentration
RbCl ₂	100 mmol/L	RbCl ₂	10 mmol/L
MnCl ₂	50 mmol/L	CaCl ₂	75 mmol/L
CaCl ₂	10 mmol/L	MOPS	10 mmol/L
Kaliumacetat	30 mmol/L	Glycerin	15% (v/v)
Glycerin	15% (v/v)		

Die Puffer wurden nach dem Ansetzen über einen Spritzenvorsatzfilter (0.2 µm) sterilfiltriert und bei -20 °C gelagert.

3.1.5.3.5. Puffer für die Plasmidpräparation über Alkoholpräzipitation.

Tab. 3.13: Puffer für die Alkoholpräzipitation von Plasmiden.

Puffer P1		Puffer P2	
Chemikalie	Konzentration	Chemikalie	Konzentration
Tris/HCl pH 8.0	50 mmol/L	NaOH	200 mmol/L
EDTA	10 mmol/L	SDS	1% (w/v)
RNaseA	100 µg/mL		
		Puffer P3	
		Chemikalie	Konzentration
		Kaliumacetat, pH 5.5	3 mol/L

Puffer P1 und P3 wurden bei 4 °C gelagert, Puffer P2 bei Raumtemperatur.

3. Material und Methoden

3.1.5.3.6. Puffer für *electrophoretic mobility shift assays* (EMSAs)

Tab. 3.14: Puffer für *electrophoretic mobility shift assays*.

Puffer EMSA		10x TBE für EMSAs	
Chemikalie	Konzentration	Chemikalie	Konzentration
Tris/HCl pH 8.0	10 mmol/L	Tris	250 mmol/L
NaCl	100 mmol/L	Borsäure	250 mmol/L
Glycerin	10% (v/v)	EDTA	6.25 mmol/L

Der 1x TBE Puffer für die EMSAs wurde vor dem Experiment angesetzt und sofort auf Eis gekühlt, um bei der nativen PAGE ausreichend kalt zu sein.

3.1.5.3.7. Verwendete Puffer in der Proteinchemie und Proteinanalytik

Im Folgenden sind die für die Proteinreinigung verwendeten Puffer angegeben. Da für verschiedene Proteine die gleichen Methoden angewendet wurden, ist zusätzlich ein Schlüssel für die zugehörigen pH-Werte angegeben.

Tab. 3.15: Puffer in der Proteinreinigung.

RsCryB					
Chemikalie	Puffer A (NiNTA A)	Puffer B (NiNTA B)	Puffer C (Heparin)	Puffer D (Heparin)	Puffer X (SEC)
Phosphat	50 mmol/L	50 mmol/L	50 mmol/L	50 mmol/L	---
Tris/HCl	---	---	---	---	10 mmol/L
NaCl	300 mmol/L	300 mmol/L	---	2000 mmol/L	100 mmol/L
Imidazol	---	500 mmol/L	---	---	---
pH-Wert	8.3	8.3	8.3	8.3	8.3
MmCPDII					
Chemikalie	Puffer A (NiNTA A)	Puffer B (NiNTA B)	(Heparinsäule nicht verwendet)		Puffer X (SEC)
Phosphat	50 mmol/L	50 mmol/L			---
Tris/HCl	---	---			10 mmol/L
NaCl	300 mmol/L	300 mmol/L			100 mmol/L
Imidazol	---	500 mmol/L			---
pH-Wert	8.0	8.0			8.0
Ds(6-4)					
Chemikalie	Puffer A (NiNTA A)	Puffer B (NiNTA B)	Puffer C (Heparin)	Puffer D (Heparin)	Puffer X (SEC)
Phosphat	50 mmol/L	50 mmol/L	50 mmol/L	50 mmol/L	---
Tris/HCl	---	---	---	---	10 mmol/L
NaCl	500 mmol/L	500 mmol/L	---	2000 mmol/L	100 mmol/L
Imidazol	---	500 mmol/L	---	---	---
Glycerin	10% (v/v)	10% (v/v)	10% (v/v)	10% (v/v)	10% (v/v)
pH-Wert	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5

3. Material und Methoden

3.2. Mikrobiologische und molekularbiologische Methoden

3.2.1. Präparation chemisch kompetenter Zellen und deren Transformation

In dieser Arbeit wurden ausschließlich chemisch kompetente *E. coli*-Zellen verwendet, die nach dem Protokoll von Hanahan¹⁰³ und den in Tab. 3.12 angegebenen Puffer TFB I und TFB II hergestellt wurden. Die Lagerung erfolgte in Aliquots von 50 µL bei -80 °C.

Die Zellen wurden nach dem Protokoll von Morrison transformiert¹⁰⁴. Hierbei wurden für eine Retransformation 0.5 µL bzw. 5 µL für die Transformation nach einer Ligation zu einem Aliquot der kompetenten Zellen gegeben und die Zellsuspension für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 90 s auf 42 °C erwärmt und danach für 30 s auf Eis gekühlt. Zur Ausbildung der Resistenz wurden 950 µL LB-Medium zugegeben und die Kultur für 1 h bei 37 °C angezogen. Die Zellsuspension wurde mit einem Drigalski-Spatel auf 1.5%igen LB-Agar Platten vereinzelt, welche die passenden Antibiotika als Selektionsmarker enthielten, und bei 37 °C über Nacht inkubiert.

3.2.2. Die Agarosegelelektrophorese

DNA kann aufgrund ihrer inhärenten negativen Ladung im elektrischen Feld aufgetrennt werden. Als Matrix dienen dabei Gele aus Agarose, wobei die Porengröße durch die Konzentration an Agarose bestimmt werden kann. Standardmäßig wurden 1%ige Agarosegele in 1x TBE Puffer (siehe Tab. 3.9) zur Trennung von Amplifikaten nach der PCR oder zur Extraktion von Hydrolyseprodukten eingesetzt. Die DNA konnte im Gel in einem Ethidiumbromidbad gefärbt werden und im Anschluss unter UV-Licht ($\lambda = 312 \text{ nm}$) visualisiert und dokumentiert werden.

3.2.3. Präparation von Plasmiden aus *E. coli* Übernachtskulturen

5 mL LB-Medium werden mit einem entsprechenden Selektionsmarker versetzt, mit einer einzelnen Kolonie von einer LB-Agar-Platte inokuliert und die Kultur bei 37 °C und 225 rpm über Nacht angezogen. Anschließend werden 4 mL der Kultur pelletiert und enthaltene plasmidische DNA nach einer der beiden folgenden Methoden extrahiert. Beide Methoden

basieren dabei zunächst auf einer alkalischen Lyse der Zellen, wobei die genomische DNA an der Zellwand adsorbiert bleibt und deshalb pelletierbar ist. Nach Isolierung der plasmidischen DNA konnte diese bei -20 °C gelagert werden.

3.2.3.1. Plasmidpräparation über das QIAprep spin MiniPrep Kit

Die pelletierten Zellen wurden nach Herstellerangaben einer alkalischen Lyse unterzogen und die plasmidische DNA über die passenden Säulen extrahiert. Das System nutzt die spezifische Bindung von Nukleinsäuren an eine Silica-Matrix bei hohen Konzentrationen von chaotropen Salzen und leicht basischem pH-Wert aus, wobei die Elution mit wässrigen Puffern erfolgen kann. Das Protokoll konnte sowohl mit Hilfe einer Tischzentrifuge oder vollautomatisch mit dem QiaCube durchgeführt werden. Die DNA wurde in beiden Fällen mit 50 µL EB-Puffer eluiert.

3.2.3.2. Plasmidpräparation durch Alkoholpräzipitation nach Birnboim & Doly

Bei der Methode nach Birnboim & Doly¹⁰⁵ wurden die pelletierten Zellen zunächst in 250 µL Puffer P1 resuspendiert und mit 250 µL Puffer P2 versetzt. Anschließend wurde das Reaktionsgefäß vorsichtig invertiert und für 5 min auf Eis inkubiert und im Anschluss mit Puffer P3 neutralisiert. Die dabei gefällten Proteine und die unlöslichen Zellbestandteile wurden durch Zentrifugieren in einer Tischzentrifuge bei 13000 rpm für 30 min bei 4 °C pelletiert und der Überstand vorsichtig in eine neues Reaktionsgefäß überführt. Durch Zugabe von 600 µL Isopropanol zu der Lösung wurde die plasmidische DNA gefällt und in einem erneuten Zentrifugationsschritt über 30 min und 13000 rpm bei RT pelletiert, der Überstand wurde verworfen, das DNA-Pellet mit 350 µL 70% (v/v) Ethanol gewaschen und erneut für 15 min bei 13000 rpm und RT zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet bei 50 °C getrocknet und in 50 µL EB-Puffer (Qiagen) aufgenommen. Die verwendeten Puffer sind in Tab. 3.13 aufgeführt.

3.2.4. Gentechnische Methodik zur Herstellung von Expressionsplasmiden

Zur Amplifikation von Genen aus chromosomaler DNA oder aus Plasmiden wurde die Polymerasekettenreaktion (PCR) angewendet. Bei dieser Methode kann ein gegebenes

3. Material und Methoden

DNA-Templat, durch wiederholte Denaturierung der DNA, Anlagerung spezifischer Oligonukleotide (Primer) und Amplifizierung der Zielsequenz durch eine thermostabile DNA-Polymerase, exponentiell *in vitro* vervielfältigt werden¹⁰⁶.

Dafür wurden die in Tab. 3.5 angegebenen Primer, das entsprechende Templat und die thermostabile *Phusion* Polymerase nach Herstellerangaben eingesetzt und die experimentellen Bedingungen, ebenfalls nach dem Benutzerblatt der *Phusion* Polymerase variiert. Das Experiment wurde mittels Agarosegelelektrophorese analysiert und das gewünschte Amplifikat je nach Spezifität der PCR über eine präparative Agarosegelelektrophorese (siehe Abschnitt 3.2.2.) und Gel-Extraction Kit oder dem PCR-Purification Kit, bei einer spezifischen PCR mit nur einem Produkt, aus der Reaktionslösung extrahiert.

Das so gereinigte Amplifikat wurde anschließend nach Herstellerangaben unter Verwendung der mitgelieferten Puffer mit Restriktionsenzymen hydrolytisch gespalten und über eine präparative Agarosegelelektrophorese von der Reaktionslösung abgetrennt. Parallel wurde der gewünschte Vektor analog vorbereitet. Die Konzentration der extrahierten DNA-Fragmente wurden an einem Nanodrop Photometer bestimmt und 100 fmol des vorbereiteten Amplifikats mit der T4-Ligase nach Herstellerangaben in den linearisierten Vektor (20 fmol) ligiert, zumindest für kurze Zeit bei -20 °C eingefroren und anschließend mit chemisch kompetenten *E. coli* DH5 α Zellen transformiert (siehe Abschnitt 3.2.1.).

Mittels einer Plasmidpräparation kann das rekombinante Plasmid in ausreichender Menge für eine Restriktionsanalyse, Sequenzierung und Retransformation aus einen Expressionsstamm extrahiert werden.

3.2.5. Gezielter Austausch von einzelnen Nukleotiden auf genetischer Ebene (Mutagenese-PCR)

Über die Methode der PCR (siehe Abschnitt 3.2.4.) können schnell und gezielt einzelne Aminosäuren der Primärsequenz des Proteins durch Variation des entsprechenden Codons ausgetauscht werden. Die verwendeten Primer wurden unter Berücksichtigung der Angaben im *Phusion* Mutagenesis Kit konzipiert und finden sich ebenfalls in Tab. 3.5. Als Templat für eine Mutagenese-PCR mit der *Phusion* Polymerase wurde das jeweils passende Plasmid verwendet, wobei die DNA-Konzentration bei 1 ng/ μ L liegen sollte. Die Reaktionsbedingungen wurden nach Herstellerangaben variiert und das Experiment gelelektrophoretisch kontrolliert. Je nach Spezifität der PCR wurde das Amplifikat mit dem

Gel-Extraction Kit oder dem PCR-Purification Kit aus der Reaktionslösung extrahiert, wobei stets ein Elutionsvolumen von 30 μL gewählt wurde. Anschließend wurden 5 μL der Amplifikatlösung in einem 20 μL Ansatz mit der T4-Ligase nach Herstellerangaben ligiert und 5 μL dieser Reaktionslösung direkt mit chemisch kompetenten *E. coli* DH5 α Zellen transformiert. Aus den erhaltenen Kolonien werden Übernachtskulturen inokuliert, die Plasmid-DNA nach Abschnitt 3.2.3. präpariert und der Austausch durch eine Sequenzierung bei der Fa. Qiagen oder der Fa. GATC kontrolliert.

3.3. Proteinchemische Methoden

3.3.1. Kultivierung von *E. coli* und Produktion rekombinanter Proteine

Zu Beginn jeder Kultivierung wurde zunächst mit einer einzelnen Kolonie einer LB-Agar-Platte eine 5 mL Übernachtskultur (ÜNK) in LB-Medium (siehe Tab. 3.6) für Plasmidpräparationen bzw. eine 50 mL LB-ÜNK zur Inokulation präparativer Kulturen gestartet. Zur Bestimmung optimaler Bedingungen zur Genexpression wurden zunächst Experimente im 50 mL Maßstab durchgeführt, wobei zwischen Zellstamm, Temperatur (zwischen 17 °C-37 °C) sowie der Induktion durch IPTG (LB-Medium) und der Autoinduktionsmethode (TB-Medium) variiert wurde.

Das entscheidende Kriterium stellte hierbei die Löslichkeit des gewünschten, rekombinanten dar. Dazu wurden die 50 mL Kulturen durch Zentrifugation in Polypropylenröhrchen pelletiert (4000 rpm, Rotor Eppendorf A-4-62, 4 °C, 15 min) im entsprechenden Puffer A (Tab. 3.15) resuspendiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Der analytische Aufschluss von 1 mL erfolgte an einer Sonotrode (3mal 30Pulse, 60% Leistung) bzw. am Fastprep 24. Das Rohlysate wurde zentrifugiert (13.000 rpm, 4°C, 15 min) und der Überstand abgenommen. Aus Pellet und Überstand wurden Proben für eine SDS-PAGE abgenommen. Der restliche Überstand wurde für eine analytische Ni-NTA-Chromatographie nach Herstellerangaben verwendet, wobei statt einer Elution über einen Imidazolgradienten vereinfachend unverdünnter Puffer B (Tab. 3.15) verwendet wurde. Die erhaltenen Fraktionen wurden ebenfalls über die SDS-PAGE analysiert. Falls nötig konnte ein Westernblot mit Anti-His-HRP-Konjugat und ECL-Detektion angeschlossen werden (siehe Abschnitt 3.4.4.).

3. Material und Methoden

Die ermittelten Bedingungen wurden auf Kulturen im 2 L Maßstab übertragen und das rekombinante Protein präparativ produziert. Dazu wurden 2 L Medium in 5 L Schikane Kolben angesetzt und mit 40 mL einer ÜNK inokuliert. Die Kultur wurde dabei mit 110 rpm geschüttelt. Nach abgeschlossener Wachstumszeit wurde die Kultur durch Zentrifugation (Rotor JA-10, 7000 rpm, 4 °C, 25 min) geerntet, in 25 mL Puffer A pro Liter Kultur resuspendiert, in je 35 mL aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung bis zur Lyse erfolgte bei -80 °C. Das gelagerte Zellpellet wurde zur Lyse aufgetaut und die Zellen über eine French press bei einem Druck von 10 bar ruptiert. Das Rohlysate wurde von den Zelltrümmern und unlöslichen Bestandteilen durch Zentrifugation (Rotor JA-20, 18000 rpm, 4 °C, 35 min) getrennt und das Zielprotein durch chromatographische Methoden weiter angereichert.

3.3.2. Proteinextraktion durch Immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC)

Heterolog exprimierte Proteine können auf genetischer Ebene leicht mit affinitätsvermittelnden Sequenzen, sogenannten *Tags*, versehen werden. Eine weit verbreitete Methode ist das Anfügen von sechs Histidinen, welche zusätzlich in eine Linker-Sequenz (*His-Tag*) o.ä. eingebunden sein können. Bei entsprechenden pH-Werten (>7.0) können die freien Elektronenpaare der Histidinseitenkette an Metallionen koordinieren. Das wird bei der „immobilisierte Metallionen Affinitätschromatographie“ (IMAC) ausgenutzt. Die stationäre Phase besteht dabei aus an einer hochpolymeren Glykanmatrix gebundenen Nitrilotriessigsäureresten (NTA) und von diesen koordinierten Ni²⁺-Ionen. Dadurch, dass zwei Koordinationsstellen der Nickel(II)ionen mit Wasser besetzt sind, können stickstoffhaltige Liganden mit besseren Donoreigenschaften (so wie Histidin) selektiv gebunden werden. Gebundene Proteine können anschließend durch einen geeigneten Liganden z.B freies Imidazol, oder durch einen pH-Wechsel ins Saure (pH <6.0) eluiert werden. Das Säulenmaterial Ni-NTA-Superflow wurde entweder selbst in XK16-20 Säulenkörper gegossen oder es wurden kommerziell erhältliche Säulen des Typs HisTrap-FF bzw. Protino-Ni-NTA verwendet.

Die verwendete NiNTA-Säule wurde vor der Verwendung zunächst mit dem 5-fachen Säulenvolumen (*cv*) entionisiertem Wasser gewaschen und anschließend mit 5 *cv* Puffer A äquilibriert. Der Auftrag des Rohzelleextraktes erfolgte an einer Peristaltikpumpe bei einer

Flussrate von maximal 2 mL/min. Anschließend wurde die Säule mit 5 *cv* (1 mL Säulenvolumen) bzw. 3 *cv* (5 mL Säulenvolumen) 2% Puffer B gewaschen. Die Elution der immobilisierten Proteine erfolgte an einem Äkta-Purifier FPLC-System mit einem linearen Gradienten auf 50% Puffer B über 45 *cv* und 1 mL/min Flussrate (1 mL Säulenvolumen) bzw. 18 *cv* und 2 mL/min Flussrate (5 mL Säulenvolumen). Dabei wurde die Absorption bei 280 nm, 450 nm (Flavoproteine) und 260 nm (DNA bindende Proteine), sowie eine SDS-PAGE (siehe Abschnitt 3.4.2.) zur Analyse der Elutionsfraktionen herangezogen.

Bei einem etablierten Protokoll wurde der Wechsel an den Äkta-Purifier verzichtet und die gebundenen Proteine nach dem Waschschrift mit 50% Puffer B an der Peristaltikpumpe eluiert. Die Säule wurde nach der Verwendung mit 7 *cv* Puffer B, 7 *cv* entionisiertem Wasser und 7 *cv* 20% Ethanol gewaschen und anschließend bei 4 °C gelagert. Die verwendeten Puffer sind in Tab. 3.15 angegeben.

3.3.3. Selektive Reinigung von DNA bindenden Proteinen durch Heparin Affinitätschromatographie

Heparin ist ein sulfoniertes Polysaccharid welches aufgrund seiner Struktur und elektrostatischen Eigenschaften dem Zuckerphosphat-Rückgrat von Nukleinsäuren ähnelt. Dadurch haben Nukleinsäure bindende Proteine, welche das DNA Rückgrat erkennen, eine gewisse Affinität zu Heparin, was zu ihrer Reinigung verwendet werden kann. Außerdem ist Heparin durch die hohe Dichte an negativer Ladung auch ein exzellenter Kationenaustauscher. Während der Arbeit wurde eine 5 mL Säule des Typs HiTrap Heparin HP verwendet. Die Heparin Affinitätschromatographie wurde nur bei *R*sCryB Wildtyp und Mutanten als zweiter Reinigungsschritt nach erfolgreicher NiNTA angewendet. Zum einen konnte dadurch eine höhere Reinheit, in der Regel >95%, erreicht werden und zum anderen wurden gebundene Nukleinsäuren abgetrennt.

Die vereinigten proteinhaltigen Fraktionen aus der NiNTA wurden um den Faktor vier mit Puffer C verdünnt, auf die mit 7 *cv* 5% Puffer D äquilibrierte Säule über eine Peristaltikpumpe aufgetragen (2 mL/min) und anschließend mit 5 *cv* 5% Puffer D gewaschen. Die Elution erfolgte am Äkta-Purifier mit einem linearen Gradienten auf 50% Puffer D über 18 *cv* bei einer Flussrate von 2 mL/min. Dabei wurde die Absorption bei 280 nm, 450 nm und 260 nm, sowie eine SDS-PAGE (siehe Abschnitt 3.4.2.) zur Analyse der Elutionsfraktionen herangezogen. Die vereinigten Proteinfractionen wurden mit Puffer C auf eine

3. Material und Methoden

NaCl-Konzentration von 300 mmol/L verdünnt und anschließend weiterverwendet. Die Säule wurde nach der Verwendung mit 7 cv Puffer D, 7 cv entionisiertem Wasser und 7 cv 20% Ethanol gewaschen und anschließend bei 4 °C gelagert. Die verwendeten Puffer sind in Tab. 3.15 angegeben.

3.3.4. Proteintrennung durch Größenausschlusschromatographie (SEC)

Die Größenausschlusschromatographie (*size exclusion chromatography*, SEC) bzw. Gelfiltration trennt Makromoleküle wie z.B. Proteine nach ihrem hydrodynamischen Durchmesser. Dabei bedient man sich einer Matrix mit sich verengenden Poren, so dass großen Molekülen weniger Volumen im Säulenbett zur Verfügung steht als kleinen. Die Gelfiltration wurde als letzter Reinigungsschritt verwendet um eine Proteinprobe auf nachfolgende Kristallisations- oder Ultrakurzzeitspektroskopie-Experimente vorzubereiten. Dabei wurde das Säulenmaterial Superdex 200 in einem XK-16/60 Säulenkörper verwendet. Nach der NiNTA- oder Heparin-Affinitätschromatographie wurden die Proteinlösung über Ultrazentrifugation mit Konzentratoren unter Beachtung des passenden Ausschlussmolekulargewichtes konzentriert und über Zentrifugenfilter (0.22 µm) von möglichen Aggregaten und Fremdkörpern befreit. Anschließend füllte man pro Säulenlauf max. 1 mL der Proteinlösung (ca. 1/100 des verwendeten Säulenvolumens) in einen mit entsprechendem Puffer gespülten 2 mL-Loop am Äkta-Purifier. Die Säule wurde vor Verwendung mit 1.5 cv entionisiertem Wasser und im Anschluss mit 1.5 cv Puffer X (Tab. 3.15) äquilibriert. Gelfiltrationen wurden stets unter Observation der Absorption bei 260 nm, 280 nm und 450 nm durchgeführt und die Flussrate, soweit vom Drucklimit des Chromatographiematerials her möglich, bei 1 mL/min gehalten. Die Fraktionen konnten im Anschluss durch das Chromatogramm des Säulenlaufs sowie die SDS-PAGE (siehe Abschnitt 3.4.2.) analysiert werden und wurden entsprechend vereinigt. Die Proteinlösung konzentrierte man durch Ultrazentrifugation auf den gewünschten Endwert und die Probe wurde anschließend bei 4 °C gelagert oder direkt für weitere Experimente verwendet.

3.3.5. Langzeitlagerung der MmCPDII

Proteine sind in wässrigen Lösungen meist einige Wochen lagerbar, zeigen aber mit längerer Zeit immer stärkere Degradation. Aufgrund dessen wurden die MmCPDII für längere

Lagerungen oder bei Transport über große Strecken bei -80 °C gelagert. Dafür wurde sie nach Extraktion und Konzentration mit dem äquivalenten Volumen Glycerin versetzt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Im Fall der Ultrakurzzeitspektroskopie musste dafür spektroskopisch reines Glycerin verwendet werden. Das Glycerin *Ultrapure – MB grade* von Affymetrix entsprach den Anforderungen und wurde ausschließlich zur Vorbereitung dieser Experimente verwendet.

3.3.6. Identifikation möglicher Antennenchromophore durch Mikrodialyse

Bei der heterologen Produktion von Proteinen kommt es vor, dass Sekundärmetabolite, welche im Ursprungsorganismus als Kofaktor dienen, im Expressionsstamm nicht verfügbar sind. Dies ist unter anderem bei den Deazaflavinen der Fall, welche von anaeroben Organismen in der Methanogenese verwendet werden¹⁰⁷, von *E. coli* jedoch nicht produziert werden können. Eine schnelle Methode rekombinante Proteine *in vitro* auf die Bindung eines solchen Moleküls zu testen, ist die Mikrodialyse.

Dazu wurde das zu untersuchende Protein im gewünschten Verhältnis mit dem zu analysierenden Kofaktor vermischt und anschließend in ein Mikrodialyse Stäbchen (*microdialysis rods*, Hampton research) mit einem Volumen von 10 µL gefüllt. Dieses wurde mit Dialysemembran (3 kDa cutoff) verschlossen und über Nacht gegen 500 µL des Protein-Puffers in eingefetteten VDX-Platten dialysiert. Entsprechende Kontrollen von Protein gegen Puffer und Kofaktor gegen Puffer wurden analog angesetzt. Nach der Dialyse konnten die Mikrodialyse Stäbchen mit einem Skalpell geöffnet und die Probe auf dem Nanodrop analysiert werden.

3.4. Analytische Methoden

3.4.1. Konzentrationsbestimmungen von Proteinlösungen

Die meisten in dieser Arbeit verwendeten Proteine tragen Kofaktoren, die im UV/Vis Bereich Licht absorbieren. Da die physikochemischen Daten dieser Kofaktoren meist in der Literatur bekannt sind, können die Absorptionsspektren prinzipiell zur Konzentrationsbestimmung herangezogen werden. Der Besetzungsgrad einer Kofaktorbindungsstelle ist in der Regel

3. Material und Methoden

jedoch nicht bekannt und im Falle mehrerer gebundener Chromophore kommt es zu Überlagerungen der Absorptionen. Deshalb wurde die Konzentration mittels des Bradford Protein-Assays¹⁰⁸ bestimmt, welcher nach Herstellerangaben durchgeführt wurde.

3.4.2. Analyse von Proteinen durch die SDS-PAGE

Die Natrium-dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)¹⁰⁹ ist seit ihrer Einführung durch Laemmli 1970 zu einer der Standardmethoden im biochemischen Labor geworden. Proteine werden hierbei durch Einwirkung von Natriumdodecylsulfat und Reduktionsmittel unter Hitze denaturiert, linearisiert und ihre Eigenladung durch Komplexierung mit

Tab. 3.16: Rezept für einen Caster SDS-PAGE

Reagenz	Menge	
	Trenngel	Sammelgel
Rotiphorese Gel30	30 mL	6.65 mL
10% (w/v) SDS	750 µL	500 µL
Trenngelpuffer	25 mL	
Sammelgelpuffer		10 mL
TEMED	75 µL	50 µL
APS 10%	375 µL	500 µL
ent. H ₂ O	19.3 mL	32.85mL

Dodecylsulfat maskiert. Anschließend werden sie in einem diskontinuierlichen Polyacrylamidgel nach ihrem hydrodynamischen Durchmesser aufgetrennt. Das Molekulargewicht als Kenngröße eines Proteins konnte dabei durch einen mitlaufenden Molekulargewichtsstandard abgeschätzt werden. Die Gele wurden à zehn Stück in einem Caster gegossen und bei 4 °C gelagert. Das verwendete Rezept für einen Caster ist Tab. 3.16 zu entnehmen, wobei die verwendeten Stammlösungen in Tab. 3.11 gesondert aufgeführt sind.

3.4.3. Massenspektrometrische Analysen

Die massenspektrometrischen Analysen wurden von der massenspektrometrischen Abteilung des Fachbereichs Chemie der Philipps-Universität Marburg unter Leitung von Herrn Dr. Uwe Linne übernommen. Zur Identifikation von Proteinen aus der SDS-PAGE schnitt man eine entsprechende Bande aus einem Coomassie-gefärbten Gel aus. Das Protein konnte daraus

solubilisiert und Trypsin-katalysiert hydrolysiert werden. Die entstandenen Fragmente wurden massenspektrometrisch analysiert. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe von Mascot, wobei die identifizierten Fragmente gegen die theoretische Datenbank abgeglichen wurden.

Zur Identifizierung der Gesamtmasse von Kofaktoren wurde das Protein über G50 Spinsäulen in entionisiertes Wasser überführt, für 15 min bei 70 °C hitzedenaturiert, das gefällte Polypeptid durch Zentrifugation abgetrennt und der Überstand lyophilisiert. Der trockene Rückstand wurde in Wasser aufgenommen und die enthaltenen Kleinmoleküle wurden mittels HPLC (Agilent 1100 System) über eine Nucleodur C18ec Säule mit 3 µm Partikelgröße sowie 120 Å Porendurchmesser getrennt. Die angelegte

Tab. 3.17: Gradient des HPLC-Programms zur Kofaktorbestimmung

Zeit / min	Wasser / %	Acetonitril / %
0	100	0
5	100	0
20	80	20
30	80	20
35	5	95
37	5	95
40	100	20

Flussrate betrug 0.2 mL/min bei einer Säulentemperatur von 40 °C. Der verwendete Gradient kann Tab. 3.17 entnommen werden. Die Detektion der Analyten erfolgte durch ein angeschlossenes ESI-MS-System im positiv Modus. Dabei konnte neben einem Massen Scan-Modus im Bereich organischer Kleinmoleküle, auch einzelne Massen im sogenannten *single ion modus* detektiert werden.

3.4.4. Western-Blot mit Anti-His-HRP-Konjugat und ECL Detektion

Durch einen Western-Blot können Proteine aus einem Polyacrylamidgel elektrophoretisch auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und dort immunologisch detektiert werden.¹¹⁰ Die Detektion erfolgte in dieser Arbeit mit dem Anti-His-HRP-Konjugat. Der Antikörper ist dabei gegen ein His₅-Epitop gerichtet, welches die rekombinant produzierten Proteine aufgrund des fusionierten HisTags aufwiesen. Weiterhin ist der Antikörper mit der Peroxidase aus Meerrettich (*horseradish peroxidase*, HRP) konjugiert, deren Aktivität zur Detektion mittels einer *enhanced chemical luminescence* (ECL) Reaktion dient.

Der Elektroblot wurde nach dem *semidry setup* durchgeführt¹¹¹. Dafür wurden Membran und vier Whatmanfilterpapiere passend auf die Größe des Gels zugeschnitten und in

3. Material und Methoden

Transferpuffer eingelegt. Zwei der Filterpapiere wurden blasenfrei auf die Anode gelegt, gefolgt von der Membran, dem kurz in Transferpuffer geschwenkten Gel und den beiden übrigen Filterpapiere. Die Apparatur wurde mit der Kathode verschlossen. Es wurde mit einer Stromstärke von 100 mA pro Gel über eine Stunde geblottet, wobei die Spannung nicht über 5 V ansteigen sollte. Direkt im Anschluss konnte die Membran in Tintenlösung angefärbt werden, um die Effizienz des Blots zu überprüfen. Im Anschluss wurde die Membran mit Blotentfärber entfärbt, einmal mit TBS- und zweimal mit TBS-T-Puffer für je 10 min gewaschen. Um übrige Bindungsstellen abzusättigen, wurde die Membran abschließend im vorbereiteten Blockpuffer (Herstellerangaben) inkubiert. Danach wurde zweimal mit TBS-T-Puffer und einmal mit TBS-Puffer gewaschen (je 10 min) und der Antikörper im Verhältnis 1:3000 in den Blockpuffer gegeben. Man ließ die Membran 1 h in der Antikörperlösung inkubieren und wusch abschließend dreimal mit TBS Puffer. Die Detektion erfolgte mit dem ECL-Kit nach Herstellerangaben mit einem Röntgenfilm, welcher im Anschluss entwickelt wurde. Die Puffer sind in Tab. 3.10 aufgelistet.

3.4.5. UV/Vis-Spektroskopie

Die UV/Vis-Spektroskopie diente dazu, unmittelbar Aufschluss über den Oxidationszustand des katalytischen FAD in Photolyasen und Cryptochromen zu erhalten. Zusätzlich können mit ihrer Hilfe Aussagen über evtl. gebundene Antennenchromophore oder andere Kofaktoren getroffen werden, welche im sichtbaren oder nahem UV-Bereich absorbieren. UV/vis-Spektren wurden an einem temperierbaren Zweistrahlenspektrophotometer aufgenommen. Die Messungen wurden standardmäßig bei einer Temperatur von 10 °C durchgeführt, wobei durch Inkubation im Probenhalter vor der Messung die Äquilibration der Probe erreicht wurde. Als Basislinie der Absorption wurde der Puffer

Tab. 3.18: Einstellungen für die Aufnahme von UV/vis-Spektren am V-660

Parameter	Wert
Messbereich	900 nm – 250 nm
Datenintervall	0.5 nm
UV/Vis Spaltbreite	1.0 nm
Response	Fast
Messgeschwindigkeit	1000 nm/min
Lampenwechsel	340 nm
Lichtquelle	D2/WI
Filterwechsel	Schrittweise

der Proteinlösung gewählt. Die Spektren wurden direkt Basislinien bereinigt aufgenommen und dreimal gemittelt, alle weiteren einstellbaren Parameter sind in Tab. 3.18 aufgeführt. Die aufgenommenen Spektren wurden über die Software von JASCO in ASCII-Code exportiert und in Origin 7.0 aufgearbeitet.

3.4.6. Bestimmung des Besetzungsgrades von FeS-Clustern

Die Bestimmung des Eisengehalts eines Proteins sowie die Menge an gebundenem, säurelabilen Schwefel gibt zusammen mit der Proteinkonzentration Aufschluss über die Zusammensetzung sowie den Besetzungsgrad von potentiell gebundenen Eisen-Schwefel-Clustern. Für die Bestimmung dieser beiden Werte wurden zwei kolorimetrische Verfahren angewandt. Zur Bestimmung des Eisengehalts kam die Lovenberg Säure-Extraktionstechnik¹¹² mit anschließender Ferenkomplexierung zum Einsatz. Zur Quantifizierung der gebundenen Menge an säurelabilem Schwefel wurde auf die Bestimmung durch Bildung von Methylenblau¹¹³ zurückgegriffen.

3.4.6.1. Vorgehensweise zur Eisenbestimmung

Die Methode beruht auf der sauren Extraktion des Eisens aus der Proteinumgebung, der Komplexierung als Eisen(II) mit einem passenden Chelator und der anschließenden kolorimetrischen Detektion des gebildeten Komplexes.

100 µL der Proteinprobe wurden mit 100 µL 1 % Salzsäure versetzt und für 10 min bei 80 °C inkubiert. Anschließend wurden nacheinander mit zwischenzeitlichem Vortexieren 500 µL 7.5 % (w/v) Ammoniumacetatlösung, 100 µL 4 % (w/v) Ascorbinsäure, 100 µL 2.5 % (w/v) Natriumdodecylsulfat und 100 µL 1.5 % (w/v) Ferenlösung hinzugefügt. Nach dem letzten Schritt wurde für 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert und die Absorbtion der Probe bei 593 nm gegen Wasser bestimmt. Eine Kalibriergerade wurde auf die gleiche Weise unter Verwendung von Mohr's Salz als Eisenstandard bestimmt.

3. Material und Methoden

3.4.6.2. Bestimmung des Gehalts an säurelabilem Schwefel

Hierbei wird das Protein im Alkalischen und in Anwesenheit von Zn^{2+} denaturiert, um die Schwefelionen aus FeS-Clustern als ZnS zu fällen. Nach Ansäuern und Zugabe von DMPD kondensiert ein Sulfidion mit zwei Molekülen DMPD unter Oxidation durch von Eisen(III) zu Methylenblau, welches photometrisch bestimmt werden kann.

200 μ L Proteinprobe wurden mit 600 μ L 1 % (w/v) Zinkacetat und 500 μ L 7 % (w/v) NaOH versetzt. Die Probe wurde durch Invertieren vorsichtig vermischt, 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend bei 2000 rpm zentrifugiert. Im Anschluss wurden vorsichtig, jedoch zügig um unnötiges Entweichen von sich bildendem H_2S zu verhindern, 150 μ L DMPD-Lösung (0.1 % (w/v) in 5 mol/L HCl) und 150 μ L $FeCl_3$ -Lösung (10 mmol/L in 1 mol/L HCl) hinzugefügt. Das Reaktionsgefäß wurde sofort wieder verschlossen und für 30 s vortextiert. Die Lösung inkubierte für 20 min bei Raumtemperatur unter Schütteln und die Absorption bei 670 nm wurde anschließend gegen Wasser bestimmt. Als Sulfidstandard wurde LiS verwendet.

3.4.7. Reduktionsassays von Cryptochromen und Photolyasen

Alle bisher untersuchten Mitglieder der Photolyase/Cryptochrom-Superfamilie binden FAD als katalytischen Kofaktor und in allen kann das Flavin in unterschiedlichen Oxidationsstufen vorliegen. Um den Kofaktor in seine möglichen Oxidationszustände zu überführen, wurde in dieser Arbeit die Methode der Photoreduktion angewandt. Dazu wurde die Probe unter Sicherheitsrotlicht mit 25 mmol/L DTT versetzt und mit einer High-Power-LED mit einem Emissionspeak bei 450 nm bestrahlt. In definierten Zeitabständen können dabei UV/Vis-Spektren aufgenommen werden, wobei die Belichtung unterbrochen werden muss. Zusätzlich kann der Absorptionsverlauf bei einer beliebigen Wellenlänge kontinuierlich verfolgt werden, ohne die Belichtung dabei zu unterbrechen. Hierbei war von Vorteil, dass die LED nach kurzer Aufwärmphase sehr kontinuierlich strahlte, wodurch ihre Emission einfach in den Nullwert (*blank*) der Wellenlänge übernommen werden konnte.

Um Konzentrationsfehler so gering wie möglich zu halten, wurde das Reduktionsmittel im Proteinpuffer in der doppelten Endkonzentration angesetzt und mit der Probe im Verhältnis 1:1 gemischt. Für die Experimente wurden Mikroküvetten aus *Suprasil* Quarzglas mit einem

Volumen von 180 µL eingesetzt, so dass nur wenig Probe benötigt wurde. Aufgrund der hohen Empfindlichkeit des V-660 Spektrophotometers reichten Endkonzentrationen des Proteins von ~15 µmol/L vollkommen aus.

3.4.8. *Electrophoretic mobility shift assays (EMSA) zur Bestimmung von Protein-DNA Dissoziationskonstanten*

Protein-DNA-Komplexe können durch ein verändertes Laufverhalten in nativen Polyacrylamidgelen identifiziert werden. Durch Verwendung einer Konzentrationsreihe kann der *electrophoretic mobility shift assay* (EMSA) zur Bestimmung der Dissoziationskonstante eines solchen Protein-DNA-Komplexes dienen. In diesem Fall sollte die Dissoziationskonstante eines Photolyase-DNA-Komplexes mit intakter dsDNA sowie mit dsDNA, welche einen zentralen CPD-Schaden enthielt, bestimmt werden. Dabei wurde auf die 2008 von Pokorny *et al.* veröffentlichte Vorgehensweise²⁸ mit fluoreszenzmarkierten Oligonukleotiden (siehe Tab. 3.5) zurückgegriffen.

Die folgenden Arbeiten wurden in den Räumlichkeiten der AG Batschauer, FB Biologie der Philipps-Universität Marburg durchgeführt, welche freundlicherweise für diese Experimente zur Verfügung gestellt wurden. Die Experimente wurden in enger Kooperation mit Dr. Richard Pokorny durchgeführt.

Die Synthese der benötigten Oligonukleotide ist bereits in der oben angegebenen Publikation veröffentlicht, so dass sie an dieser Stelle nur kurz skizziert wird. Zunächst wurde photochemisch ein zentraler CPD-Schaden in ein Oligonukleotid induziert und durch molekularbiologische Methoden flankierende Sequenzen eingeführt, wobei das 3'-Ende mit IRDye700 fluoreszenzmarkiert wurde. Ungeschädigte DNA konnte durch Hydrolyse mit dem Restriktionsenzym *VspI* abgetrennt werden. Ein finaler Reinigungsschritt erfolgt über eine denaturierende PAGE wobei dem verwendeten 5%igen Polyacrylamidgel in TBE-Puffer (Tab. 3.14) 7 mol/L Harnstoff zugesetzt wurden. Der so erhaltene geschädigte Strang (IRD-T◊T) und der analog, natürlich ohne UV-Schädigung und Hydrolyse, erzeugte ungeschädigte Strang (IRD-TT) wurden mit dem Gegenstrang in einem Thermocycler durch schrittweises Abkühlen von 95 °C auf 10 °C hybridisiert. Die beiden so erzeugten fluoreszenzmarkierten dsDNA-Stränge wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C lichtgeschützt gelagert. Aufgrund des empfindlichen Fluoreszenzlabels wurden die Arbeiten mit markierten Oligonukleotiden unter Grünlicht durchgeführt.

3. Material und Methoden

Für den eigentlichen Bindungsassay wurden in einem 10 µL Ansatz in EMSA Puffer (Tab. 3.14) 2 nmol einer DNA-Sonde mit steigender Konzentration an *Mm*CPDII (0, 5, 10, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 800, 1000 nmol) versetzt und unter Lichtausschluss über 30 min auf Eis inkubiert. Der Kofaktor der Photolyase lag dabei im voll oxidierten Zustand vor und sollte somit keine CPD-Reparaturaktivität vermitteln. Trotzdem wurden die Arbeiten mit IRD-T\diamondT und Photolyase unter schwachem Rotlicht durchgeführt, um jegliche Möglichkeit der Photoreduktion oder Reparatur auszuschließen. Die Exposition wurde dabei so kurz wie möglich gehalten, um ein mögliches Bleichen der Fluoreszenzmarkierung zu verhindern. Die Proben wurden im Anschluss in einer nativen 5%igen PAGE in 0.25x TBE-Puffer bei 4 °C analysiert und die erhaltenen Banden mit einem Odyssey Imaging System quantifiziert.

$$(A) \quad \theta = \frac{[DNA]^n}{K_D^n + [DNA]^n}$$

$$(B) \quad \theta = 0.5 \cdot \left(\frac{[DNA]}{K_{D,S} + [DNA]} + \frac{[DNA]^n}{K_{D,NS}^n + [DNA]^n} \right)$$

Gleichung 1: Verwendete Gleichungen mit Dissoziationskonstante (K_D), Bindungsanteil (θ) und DNA Konzentration ($[DNA]$). A) Hill-Gleichung für ein Bindungsmodell mit n Bindungsstellen. B) Bindungsmodell mit gemittelter Gewichtung zwischen einem spezifischem Bindungsterm (S) und einem zweitem unspezifischen Bindungsterm (NS) mit n Bindungsstellen.

Jeder Messpunkt wurde dreimal gemessen und die erhaltenen Daten in Origin 7.0 mit der Hill-Gleichung¹⁴ oder einem gemischten Bindungsmodell mit spezifischem und unspezifischem Term angenähert um die Dissoziationskonstanten zu bestimmen (siehe Gleichung 1 A und B).

3.5. Ultrakurzzeitspektroskopie *time correlated single photon counting* (TCSPC)

Prozesse, die in chemischen Molekülen zu Fluoreszenz führen, erfolgen auf einer solch schnellen Zeitskala, dass die transienten Zustände in klassischen Messaufbauten nicht auflösbar sind. Diese Prozesse können daher nur mit kurzzeitaufgelösten Methoden untersucht werden. Da der benötigte Aufbau in Marburg nicht verfügbar war, wurden die Experimente in

Kooperation mit Prof. Maria-Elisabeth Michel-Beyerle, Dr. Reinhardt Haselsberger sowie Christoph Hartlmüller an der Nanyang Technological University, School of Physical and Mathematical Sciences in Singapur durchgeführt.

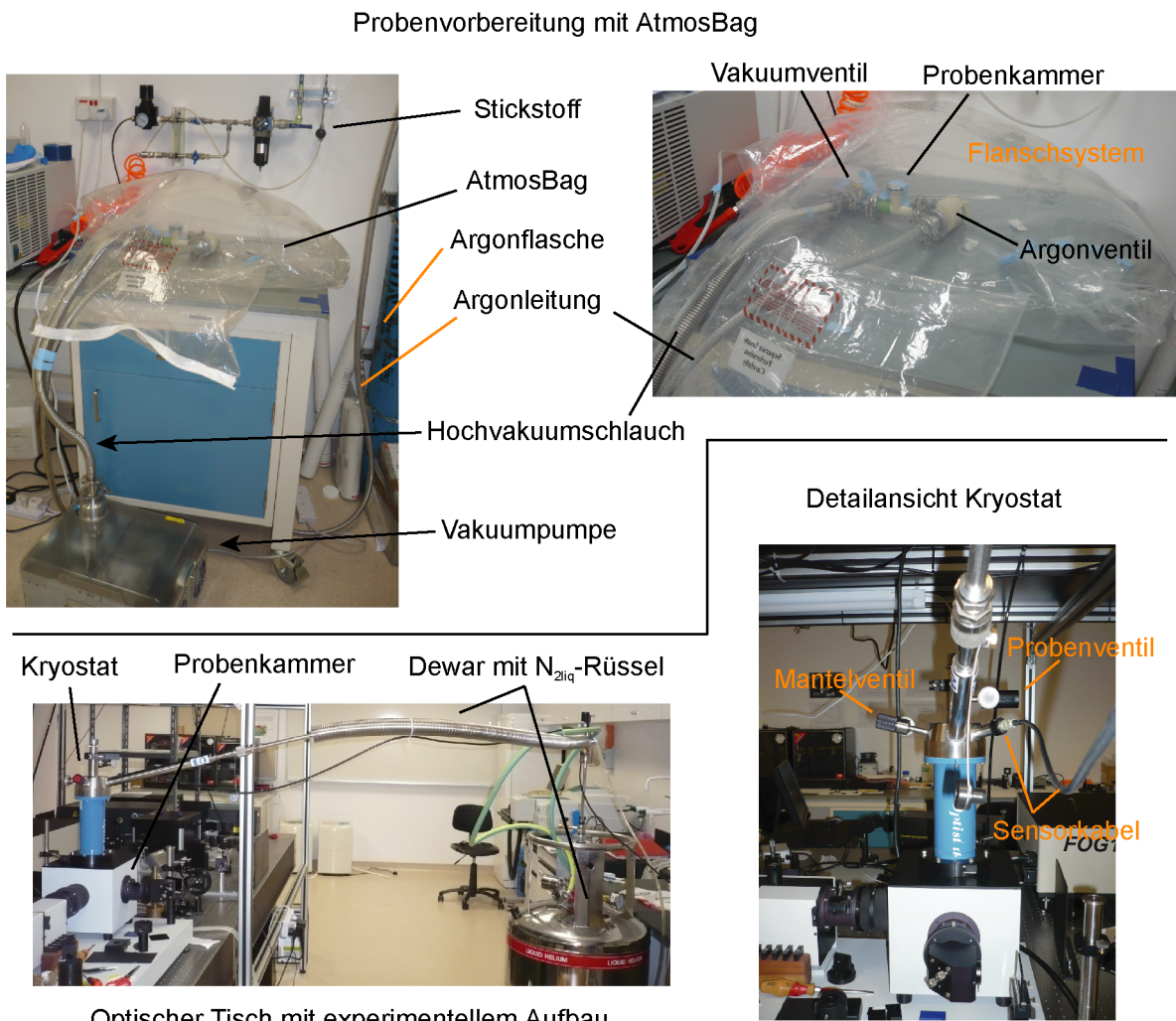
3.5.1. Die Probenvorbereitung

Die Klasse II Photolyase aus *Methanosarcina mazei* wurde auf Trockeneis nach Singapur gesendet und dort bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert (siehe 3.3.5.). Da das Protein im voll reduzierten Zustand untersucht werden sollte, musste gelöster Sauerstoff aus der Probe entfernt werden, um eine mögliche Rückoxidation während des Experiments zu verhindern. Dies erfolgte durch wiederholte Evakuierung der Probe mit einer Vakuumpumpe (Varian Vacuum Technologies, Turin, Italien) und anschließenden Druckausgleich durch Argon (Gasaustausch) in einer Flansch Apparatur. Diese Apparatur befand sich AtmosBag von SigmaAldrich, welche mit einem kontinuierlichen Stickstoffstrom gespült wurde, um die Probenküvette nach dem Gasaustausch verschließen zu können. Der Sauerstoffgehalt wurde dabei mit kommerziell erhältlichen Teststreifen („Anaerobe Indicator Test“, SigmaAldrich) überprüft.

3.5.1.1. Vorbereitung von Experimenten im Peltier-Element-Setup

Die Probe wurde außerhalb der AtmosBag in eine rührbare Quarzglas-Küvette überführt und in die vorbereitete AtmosBag eingeschleust. Nach einem ersten Gasaustausch mit mindestens 30 Wiederholungen, wurde die Probenküvette mit einem Teflonstopfen und Parafilm verschlossen. Beim Gasaustausch musste unbedingt darauf geachtet werden, das Pumpenvakuum nicht zu lange wirken zu lassen, da die Probe ansonsten, aufgrund des reduzierten Drucks, zu sieden begann. Im Anschluss wurde die Probe ausgeschleust und auf Eis durch 30-minütige Belichtung mit einer 450 nm High-Power LED vollständig reduziert. Danach wurde die Küvette wieder in die sauerstofffreie Atmosphäre eingeschleust und wiederum 30 mal evakuiert und mit Argon begast. Die Probe verschloss man anschließend wieder mit Teflonstopfen und Parafilm und konnte sie für ca. 3 h in den Experimenten verwenden, bevor die Sauerstoffkonzentration im Inneren der Küvette ausreichte, um den Flavin Kofaktor zu oxidieren.

3. Material und Methoden



Optischer Tisch mit experimentellem Aufbau

Abbildung 3.1: Experimentelles setup für Probenvorbereitung und TCSPC an der NTU in Singapur. Oben: In einer mit Stickstoff gespülten AtmosBag kann über das Flanschsystem eine Probenküvette abwechselnd mit Argon begast oder evakuiert werden, um gelösten Sauerstoff zu vertreiben. Die Küvette kann in der AtmosBag verschlossen werden und die Messung Die Probe konnte im Anschluss in einem Peltierelement (Temperaturbereich 0 °C – 100 °C) vermessen werden Unten: Das Peltierelement im Probenraum konnte durch einen Kryostaten für tieftemperatur Messungen bis 80 K ausgetauscht werden. Durch Anschluss des oben gezeigten Flanschsystems an das Probenventil kann der Probenraum des Kryostaten ebenfalls mit Argon begast bzw. evakuiert werden. Die Temperierung erfolgte durch das Steuergerät ITC503 und mit flüssigem Stickstoff als Kühlmittel.

3.5.1.2. Vorbereitung von Experimenten im Kryostat

Für Messungen bei tiefen Temperaturen stand ein Kryostat (Optistat CF) von Oxford-Instruments mit dem passenden Steuergerät ITC 305 zur Verfügung. Die Messung musste hierbei in PMMA-Küvetten (Plastibrand, Brand GmbH&Co KG Wertheim) erfolgen, da Glasküvetten bei den gewünschten tiefen Temperaturen, bis 80 K, Schaden nehmen

könnten. Zunächst wurde der Kryostat, dessen Mantel über Nacht evakuiert wurde, an das Flanschsystem angeschlossen und mehrmals vollständig evakuiert und unter Argon gesetzt. Die AtmosBag war bei diesem Setup nicht nötig.

Man füllte maximal 700 μL der Probe in eine passende Küvette und verschloss diese mit einem gelochten Plastikdeckel, für einen schnelleren Gasaustausch, und schleuste die Probe in den vorbereiteten Kryostaten im Argonstrom ein. Anschließend erfolgte die wiederholte Evakuierung und Begasung mit Argon zum Entfernen des gelösten Sauerstoffs, hierbei waren ebenfalls 30 Wiederholungen ausreichend. Im Anschluss daran konnte die Probe im Inneren des Kryostaten zur Reduktion bestrahlt werden, wobei das Flavin nach ca. 60 min vollständig reduziert war. Die längere Reduktionszeit erklärte sich dabei durch erhöhte Reflektion an den Trennscheiben des Kryostaten, so dass die eingestrahlte Nettoenergie wesentlich geringer als im Peltier-Setup war. In diesem Setup war die Probe für mehrere Stunden im voll reduzierten Zustand stabil.

3.5.2. Das experimentelle Setup

Die Experimente erfolgten an einem im Bereich von 705 nm – 900 nm justierbaren, mit 10 MHz gepulsten Chameleon Ti:Saphir Laser (Fa. Coherent), welcher durch Frequenzverdopplung der Basiswellenlänge auf die gewünschten Wellenlängen von 365 nm oder 400 nm eingestellt wurde. Die Intensität des Strahls wurde vor der Probenkammer durch einen Graufilter auf 1 mW herabgesetzt und im Inneren der Probe durch ein in den Probenraum integriertes Linsensystem fokussiert. Die Messung der Fluoreszenz erfolgte in einem Winkel von etwas größer als 90° , um direkte Reflektionen in den Photomultiplier zu vermeiden. Die Rohdaten wurden durch die Steuersoftware PicoHarp aufgenommen und mittels PicoFit auf bis zu vier exponentielle Zerfälle angenähert.

3.6. Kristallisation von Proteinen und Röntgenstrukturanalyse

Die Kenntnis der dreidimensionalen Struktur eines Proteins ist in der heutigen Biochemie von großem Wert. So erlaubt sie, Aussagen über Struktur-Funktionsbeziehungen zu treffen, mögliche Bindungsstellen von Kleinmolekülen zu identifizieren oder hilft dabei Reaktionsmechanismen aufzuklären. Während Methoden wie Röntgenkleinwinkelstreuung¹¹⁵ (SAXS) oder Kryoelektronenmikroskopie¹¹⁶ nur die Oberfläche eines Makromoleküls erfassen

3. Material und Methoden

können, erlauben NMR-Methoden die Aufklärung der atomaren Struktur von Proteinen¹¹⁷. Mittlerweile können über NMR Proteine nahe 100 kDa¹¹⁸ strukturell charakterisiert werden, allerdings ist dies durch die Verwendung von isopenmarkierten Aminosäuren sehr aufwendig, so dass diese Methode in der weltweiten Proteindatenbank¹¹⁹ (wwPDB) mit gut 10% aller Einträge (Stand 05.12.2012) unterrepräsentiert ist. Mit knapp 89% aller PDB-Einträge (71175) ist die Röntgenstrukturanalyse die Standardmethode zur Bestimmung der dreidimensionalen Struktur von Proteinen.

3.6.1. Initiales Auffinden und Optimierung von Kristallisationsbedingungen

Da bis in die heutige Zeit keine Systematik gefunden wurde nach der eine geeignete Kristallisationsbedingung für ein Protein aufgrund dessen Primärsequenz bestimmt werden kann, ist die Kristallisation immer noch eine empirische Methode. So gibt es jedoch Bedingungen, welche bereits zur erfolgreichen Kristallisation geführt haben und in sogenannten *sparse-matrix-screens*¹²⁰ kommerziell erhältlich sind. In Verbindung mit Kristallisationsrobotern kann so das Auffinden einer initialen Kristallisationsbedingung weitgehend automatisiert werden.

Proteine wurden vor dem Kristallisationsexperiment über die beschriebenen Methoden gereinigt, konzentriert und über Zentrifugenfilter (0.22 µm) von Aggregaten befreit. Für ein initiales *screening* wurden Proteinkonzentrationen von etwa 10 mg/mL gewählt. Konzentrationen in Optimierungen richteten sich nach den Erfahrungen des initialen Experiments. Zum Auffinden einer ersten Kristallisationsbedingung wurden die vorhandenen Kristallisationsscreens eingesetzt. Dies waren die Screens JCSG I - IV, Classics, ClassicsLite, MBCI, MBCII, Anions, Cryos, alle kommerziell erhältlich von der Fa. Qiagen. Die Experimente wurden in 96-well Platten vom Typ MRC-2 durch ein Cartesian 4-Kanal Kristallisationsroboter angesetzt. Dabei betrug das Volumen des Reservoirs 80 µL und dass des Tropfens 600 nL, bestehend aus 300 nL Bedingung sowie dem gleichen Volumen an Proteinlösung. Pro Vertiefung der Platte konnten dabei 2 Tropfen gesetzt werden, wobei im zweiten Tropfen die Konzentration des Proteins halbiert wurde. Falls die Proteinmenge limitierend war, wurde alternativ der zweite Tropfen als Kontrollexperiment verwendet und nur mit Puffer versetzt. Bei lichtempfindlichen Proben, wurden die Platten unter Sicherheitsrotlicht pipettiert und mit Aluminiumfolie verschlossen. Die Platten wurden erschütterungsfrei in Inkubatoren (18 °C), dem Kristallisationslabor (18 °C) oder einem

eigens eingerichteten Kühlraum (4 °C) gelagert und unter dem Lichtmikroskop in wachsenden Abständen, gegebenenfalls unter Sicherheitslicht (Rotlicht ab 650 nm), dokumentiert.

Bei erfolgreicher Kristallbildung wurde die gefundene Bedingung in einem Raster optimiert wobei, zunächst auch 96-*well* Platten mit einem Roboter und in weiteren Optimierungsschritten auch 24-*well* Platten per Hand pipettiert wurden. Bei Experimenten im 24-*well* Maßstab wurde zudem auch die Tropfengröße variiert, um Einfluss auf die Geschwindigkeit des Kristallwachstum nehmen zu können. Durch *microseeding* mit Kristalltrümmern aus vorhergehenden Generationen wurde versucht, die Qualität der entstehenden Kristalle zu verbessern.

3.6.2. Microseeding

Das Einbringen von Kristallisationskeimen in einen frischen oder bereits äquilibrierten Tropfen kann das Wachstum von Kristallen hervorrufen. Von Vorteil ist hierbei vor allem, dass wesentlich geringere Übersättigungen des Tropfens erreicht werden müssen, da die kritische Phase der Nukleation umgangen wird.^{121,122}

Die Seedinglösung wurde hergestellt, indem ein oder mehrere Kristalle aus ihrer Bedingung entnommen und in 50 µL der zugehörigen Kristallisationsbedingung überführt wurden. Durch Vortexieren im einem 1.5 mL Reaktionsgefäß mit zwei Stahlkugeln (1 mm Durchmesser) wurden die Kristalle zerkleinert. Mit einem Katzenhaar konnten nun Kristallite aus dieser Suspension in einen neuen Kristallisationstropfen eingebracht werden und so eine geordnete Kristallisation hervorrufen.

3.6.3. Vorbereitung von Kristallen für Röntgenbeugungsexperimente

Die Entscheidung, ob ein Kristall aus Protein oder Salz bestand, konnte im Rahmen dieser Arbeit durch die Färbung des Kristalls unter Weißlicht geklärt werden. Sämtliche kristallisierten Proteine trugen FAD als Chromophor, so dass nur gelblich gefärbte Kristalle Proteinkristalle sein konnten. Gleichwohl wurde, bei einer ausreichenden Anzahl an Kristallen, stets ein *crush test* durchgeführt, um die Proteinidentität bestätigen zu können. Kristalle, welche für Röntgenbeugungsexperimente geeignet schienen, wurden mit Loops (Durchmesser 100-200 µm) oder Micromounts (20 µm, 50 µm, 100 µm), nötigenfalls unter

3. Material und Methoden

Sicherheitslicht, aus dem Kristallisationstropfen extrahiert, kurz in einem geeigneten Kryopuffer gesoakt und anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren, gelagert sowie in Trockendewar-Gefäßen bei 78 K transportiert.

3.6.4. Datensammlung in Röntgenbeugungsexperimenten

Röntgenbeugungsexperimente wurden an der *European Synchrotron Radiation Facility*, ESRF in Grenoble, Frankreich, durchgeführt. Der Aufbau der verwendeten Experimentalkammern (*beamlines*) ist im Folgenden tabellarisch (Tab. 3.19) aufgeführt.

Tab. 3.19: *Verwendete Beamlines am ESRF.*

Beamline	Detektor	Besonderheit
MX-ID14-1	Q210 CCD ADSC	<i>online microspectroscopy</i>
MX-ID14-4	Q315r ADSC	<i>tuneable</i> zwischen 19.6 - 14.5 keV
MX-ID23-2	225 mm MarMOSAIC	Mikrofokus
MX-ID29	Pilatus 6M	<i>tuneable</i> zwischen 6.0 - 20.0 keV

Während der Messungen wurde der Kristall durch einen Stickstoffstrom auf 100 K gekühlt. Die Datensammlung bei tiefen Temperaturen erlaubt es, die empfindlichen Kristalle viel höheren Strahlungs Dosen auszusetzen, da die Erwärmung durch die Röntgenstrahlung effizient abgeführt werden kann und schädliche Reaktionen wie z.B. durch erzeugte Radikale nur sehr langsam ablaufen oder vollkommen unterdrückt werden¹²³.

Zunächst wurde der Kristall auf einen Goniometerkopf montiert und zwei Testbilder, bei späteren Softwaregenerationen des ERSF, im Winkel von 90° aufgenommen. Bei ausreichender Qualität der Diffraktionsbilder konnten diese mit der ESRF-eigenen Software EDNA¹²⁴ oder iMOSFLM^{94,95} indiziert, die Raumgruppe und Zellparameter bestimmt und eine Strategie für die folgende Datensammlung erstellt werden, bei der auf höchstmögliche Auflösung und Multiplizität bei niedrigster Strahlenbelastung optimiert wurde. Primäre Variablen sind hierbei die Dauer der Belichtung sowie der Drehwinkel des Kristalls während der Messung. Besonders bei Kristallgittern mit einer langen Raumachse, von welcher der Punktabstand des inversen Gitters antiproportional abhängt, muss darauf geachtet werden,

einen möglichst kleinen Drehwinkel zu benutzen (0.06° , sog. *fine slicing*), damit die beobachteten Reflexe nicht ineinander laufen. Nach der Messung kann der Kristall prinzipiell wieder eingefroren werden und im Labor für *seeding* Experimente weiter verwendet werden.

3.6.5. Strukturlösung aus Röntgendaten

Um die dreidimensionale Struktur des kristallisierten Moleküls bestimmen zu können, benötigt man die Elektronendichte im Kristall, um die einzelnen Monomere des Proteins, Kofaktoren sowie Wasser und gebundene Puffermoleküle in diese zu modellieren. Diese gesuchte Elektronendichteverteilung lässt sich mit einer Fouriersumme der Strukturformfaktoren F_{hkl} beschreiben.

$$\rho_{(x,y,z)} = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l F_{hkl} e^{-2\pi i(hx+ky+lz)}$$

Gleichung 2: Elektronendichteverteilungsfunktion ($\rho_{(x,y,z)}$) mit: Volumen der Einheitszelle (V), Strukturformfaktor (F), Millerindizes (h,k,l).

Jeder Strukturformfaktor beschreibt dabei einen Punkt im Ewaldraum und stellt eine Wellenfunktion dar, welche sich allgemein durch Frequenz, Amplitude und Phase beschreiben lässt. Die Frequenz ist dabei gegeben durch die Wellenlänge der verwendeten Röntgenstrahlung und die Amplitude $|F_{hkl}|$ ist proportional zur Wurzel der Intensität der aufgenommenen Reflexe. Beide Größen sind somit experimentell direkt zugänglich. Allein die Phase geht systematisch durch die Detektion verloren und muss auf anderem Wege rekonstruiert werden¹²⁵. Dafür stehen in der modernen Kristallstrukturanalyse mehrere Verfahren zur Verfügung¹²⁶⁻¹²⁹, wobei in dieser Arbeit zwei verwendet wurden. Die initiale Strukturlösung von RsCryB erfolgte durch SAD (*single wavelength anomalous dispersion*). Später erhaltene Datensätze mit anderen Raumgruppen konnten durch molekularen Ersatz gelöst werden.

3.6.5.1. Lösen des Phasenproblems durch *single wavelength anomalous dispersion* (SAD)

Sind in einem Protein neben den Leichtatomen HCNO(S) auch Schweratome wie zum Beispiel Eisen gebunden, kann die anomale Dispersion des Schweratoms genutzt werden, um die Phasen experimentell zu bestimmen.¹²⁶ Die anomale Dispersion beruht dabei darauf, dass

3. Material und Methoden

das Schweratom Röntgenstrahlung geeigneter Wellenlänge absorbiert und mit einer Phasenverschiebung wieder emittiert (Röntgenfluoreszenz). Abhängig von der Position des Schweratoms in der Einheitszelle erhalten dadurch alle Reflexe eine Verschiebung in Phase und Intensität, jedoch nicht um den gleichen Betrag, wodurch das Friedelsche Gesetz, welches besagt, dass die Reflexe hkl und $-h-k-l$ die gleiche Intensität besitzen, gebrochen wird. Durch Patterson-Methoden^{130,131} kann daraus die Position des Schweratoms in der Einheitszelle bestimmt werden und damit der anomale Beitrag zu jedem Reflex berechnet werden. In einer analogen Harker-Konstruktion¹³¹ können nun mit den anomalen Streubeiträge ΔF_r und ΔF_i sowie $|F_{hkl}|$ eines Reflexes hkl zwei mögliche Phasen α_{hkl} bestimmt werden. Im Fall von SAD müssen die beiden erhaltenen möglichen, gespiegelten Elektronendichteverteilungen visuell examiniert werden, um die richtige Händigkeit zu bestimmen.

3.6.5.2. Lösen des Phasenproblems durch molekularen Ersatz (MR)

Beim molekularen Ersatz werden die bekannten Phasen eines Suchmodells auf die experimentellen Daten angewendet.¹³² Das Modell wird dabei entlang seiner drei Rotations- und drei Translationsfreiheitsgraden im dreidimensionalen Raum bewegt und die beste Position durch *maximum-likelihood* Algorithmen bestimmt. Molekularer Ersatz ist besonders hilfreich wenn ein bereits strukturell charakterisiertes Protein in einer neuen Raumgruppe kristallisiert oder in die Struktur eingebrachte Liganden untersucht werden sollen. Das große Problem bei dieser Methode ist, dass in der Phase wesentlich mehr Information steckt als in der Amplitude. Einer möglichen verfälschenden Einflussnahme des Suchmodells muss also durch ausreichende Validierung entgegengewirkt werden.

3.6.5.3. Strukturlösung von *R*sCryB

Zunächst wurden mit XDS⁹⁸ sämtliche Reflexe auf den Einzelbildern eines Datensatzes integriert, wobei die jeweilige Position (hkl) sowie die Intensität I_{hkl} ausgelesen wurde. Dabei konnten weitere Parameter wie Strahlposition, Zellparameter, Mosaizität des Kristalls oder auch der Detektorabstand optimiert werden. Als Qualitätsparameter für den Datensatz wurden dabei seine Vollständigkeit, der Wert R_{merge} , welcher den Intensitätsunterschied zwischen theoretisch gleichen, symmetrieverwandten Reflexen angibt und das Signal-zu-Rauschen-Verhältnis ($I/\sigma(I)$) bestimmt. In XSCALE⁹⁸ wurde die Datenmenge durch *mergen*, das

Zusammenfassen aller symmetrieverwandten Reflexe, reduziert und anschließend skaliert. Dieser Datensatz wurden anschließend mit IMPORT⁹² in das CCP4⁹² kompatibles „.mtz“-Format importiert und durch SCALA⁹² ohne erneute Skalierung analysiert.

Für RsCryB wurden die initialen Phasen der Struktur mit dem Autosol-Modul von Phenix⁹⁶ (Version 1.7-650) durch SAD-Phasierung erhalten. Dabei war entscheidend den *cut off* für die Entfernung zwischen zwei anomalen Streuern auf 3.25 Å herabzusetzen, damit die Software die Positionen der Eisenatome im FeS-Cluster bestimmen konnte. Die Positionen der Schweratome wurde mit dem Phaser-EP-Modul weiter verbessert und ein erstes Strukturmodell konnte mit dem Autobuild-Modul in die Elektronendichte modelliert werden. Die Struktur wurde zunächst iterativ mit Coot⁹⁰ und dem Modul phenix.refine¹³³ modelliert und abschließend mit REFMAC5^{134,135} aus dem CCP4-Paket⁹² nach der *maximum-likelihood* Methode auf die Werte R_{work} und R_{free} verfeinert, bis bei visueller Begutachtung der Elektronendichte keine unerklärbare Restelektronendichte mehr auftrat, der Konturierungsgrad wurde dabei auf 3.5σ gesetzt.

3.6.6. Strategien zur Entwicklung von Ligandenbibliotheken für REFMAC5

Zur Verfeinerung von Strukturdaten auf die kristallographische Zielfunktion (Gleichung 3) benötigen alle verwendeten Programme Referenzbibliotheken, in denen alle Moleküle der Struktur mit ihrem Typ, Atomanzahl und -verknüpfung, Bindungslängen und -ordnung sowie bevorzugten Bindungs- und Torsionswinkeln definiert sind um den korrekten Ausdruck für E_{chem} zu finden.^{135,136}

$$E_{\text{total}} = E_{\text{chem}} + WA \cdot E_{\text{xray}}$$

Gleichung 3: Die kristallographische Zielfunktion E_{total} die während der Verfeinerung minimiert werden soll. E_{chem} stellt die Abweichungen der Bindungslängen, Bindungswinkel, Torsionswinkel etc. von den chemischen Idealwerten, die z.B. aus Kleinmolekülstrukturen erhalten wurden, dar. Die Funktion E_{xray} stellt die Abweichung zwischen den experimentellen und berechneten Diffraktionsdaten des Modells dar. Die beiden Terme werden über den Gewichtungsfaktor WA miteinander verknüpft.

Durch solch eine vollständige Beschreibung des Moleküls werden die Freiheitsgrade der Atome innerhalb der Struktur erheblich eingeschränkt, so dass das Verhältnis zwischen Information (Reflexe) zu Parameter (Freiheitsgrade) größer wird. Für alle bereits

3. Material und Methoden

kristallographisch beschriebenen Moleküle muss solch eine Bibliothek angelegt werden und sollte auch in offenen Datenbanken wie der PDB mit der zugehörigen Struktur hinterlegt werden. Viele Kleinmoleküle wie alle Aminosäuren oder Puffersubstanzen sind bereits in den verwendeten Software-Paketen zur Strukturlösung integriert. Wird jedoch in der experimentellen Elektronendichte ein Ligand entdeckt oder wesentlich zuvor in den Kristall eingebracht, muss für die Verfeinerung der Struktur eine eigene Bibliothek für den neuen Liganden geschrieben werden.

Für einfache Moleküle, das heißt ohne Metallatome und komplexere Makrozyklen kann der PRODRG¹³⁷ Server verwendet werden. Dieser erzeugt aus der chemischen Struktur des Moleküls sehr zuverlässige Bibliotheken für diverse Programme, unter anderem auch für Molekulardynamik-Simulationen sowie passend benannte Atomkoordinaten im .pdb Format.

Für komplexere Moleküle gibt es keine Patentlösung. Als allgemeines Prinzip kann hier *divide et impera* angeführt werden. Ein komplexer Ligand kann meist durch strategische Bindungsbrüche in wesentlich einfachere Teilmoleküle aufgetrennt werden, welche in einer Bibliothek zusammengeführt und verknüpft werden können. Als sehr hilfreich hat sich das Tool Sketcher aus dem CCP4-Paket⁹² erwiesen. Mit dessen Hilfe können Liganden aus den zugehörigen Bibliotheken in eine graphische Oberfläche geladen werden und in dieser verändert oder sogar von vorneherein gebaut werden. Moleküle können anschließend in REFMAC5¹³⁴ in ihrer Geometrie optimiert werden und als Bibliothek ausgegeben werden. Am Wertvollsten ist dieser Weg jedoch in der Validierung einer selbst geschriebenen Bibliothek, da der Effekt einer Änderung sehr schnell erfasst werden kann. Als Ausgangspunkt für das Schreiben einer solchen Bibliothek kann ein erster Verfeinerungszyklus in REFMAC5 empfohlen werden, da als Ausgabe des fehlschlagenden Programmlaufs eine rudimentäre und meist fehlerhafte Bibliothek erzeugt wird. Dessen ungeachtet kann aus dieser die Atombezeichnung sowie der von Hand sehr schwer zu erzeugende Verknüpfungsbaum ohne Bedenken übernommen werden.

4. Ergebnisse

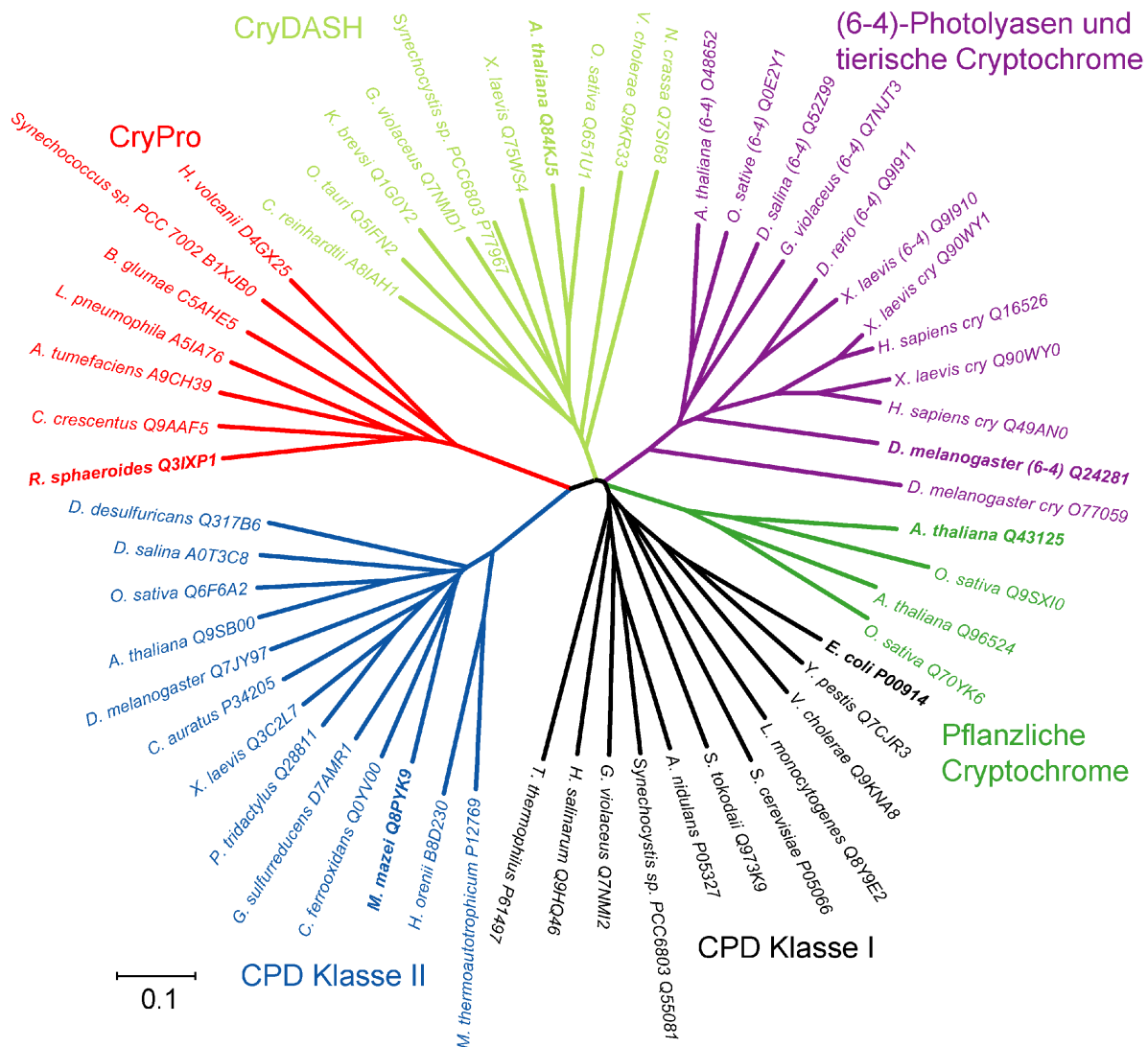


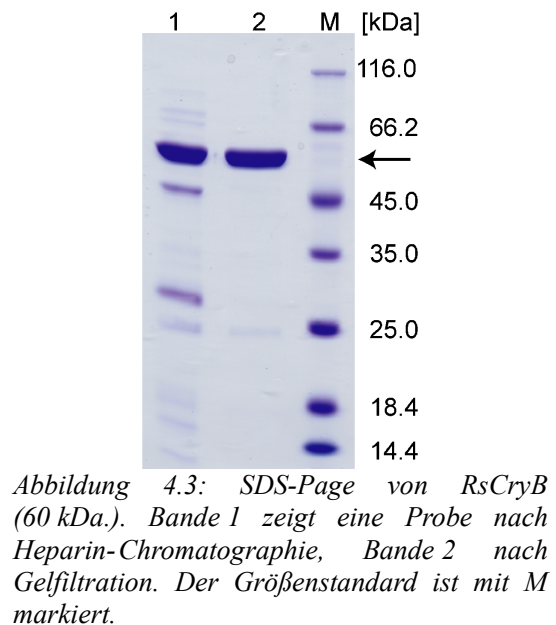
Abbildung 4.2: Phylogenetischer Baum der Photolyase/Cryptochrom-Superfamilie. Strukturell charakterisierte Vertreter sind fett hervorgehoben. Die neu eingeführte CryPro-Familie (rot) bildet einen distinkten Cluster wie die anderen, bereits bekannten Vertreter. Der phylogenetische Baum wurde aus einem Alignment der angegebenen Sequenzen mit ClustalW2¹¹ und Mega4¹³ erstellt.

4.1.2. Erzeugung des Expressionsplasmids sowie Produktion von rekombinantem RsCryB

Das Gen *cryB*⁸⁸ (RSP3077) aus *Rhodobacter sphaeroides* wurde bereits von der Arbeitsgruppe um Gabriele Klug, Justus-Liebig Universität Giessen in den Vektor pQE60 kloniert.⁸⁸ Dieser ist allerdings nicht kompatibel mit dem T7-Expressionssystem, weshalb das Gen mit den in Tab. 3.5 angegebenen Primern amplifiziert und in den pET-28a-Vektor kloniert wurde, wobei die Fusion mit einem N-terminalen His₆-Tag erfolgte. Das Konstrukt wurde durch eine Sequenzierung der Fa. Qiagen bestätigt. Die Genexpression erfolgte durch die Methode der

Autoinduktion in TB-Medium in *E. coli* Rosetta. Das Genprodukt wurde in einem Westernblot mit einem gegen das His₅-Epitop gerichteten Antikörper der Fa. Qiagen nachgewiesen. Zusätzlich wurde die Identität von RsCryB massenspektrometrisch bestätigt.

Dafür wurde eine Gelbande aus der SDS-PAGE ausgeschnitten, das Protein extrahiert, mit Trypsin spezifisch hydrolysiert und anhand des „Fingerabdrucks“ der Peptidfragmente identifiziert. Die säulenchromatographische Reinigung von RsCryB wurde optimiert, wobei die Ni-NTA-Chromatographie und Heparin-Chromatographie mit den entsprechenden Puffern zum Einsatz kamen. Die Heparin-Chromatographie war dabei ein wesentlicher Schritt zur stabilen Lagerung des Proteins, da Nukleinsäuren durch IMAC nicht abgetrennt werden konnten, was zur raschen



Aggregation des Proteins führte. Für Kristallisationsexperimente wurde ein Gelfiltrationsschritt zur höchstmöglichen Reinigung der Präparation angeschlossen. Das rekombinante Protein konnte in guter Reinheit mit Ausbeuten von 12 mg/L Zellkultur erhalten werden und zeigte in der SDS-PAGE ein apparentes Molekulargewicht von 60 kDa (siehe Abbildung 4.3). Durch die Gelfiltration konnte aufgrund des Elutionsvolumens bestätigt werden, dass das Protein in Lösung als Monomer vorliegt. Das gereinigte RsCryB wies in Lösung eine gelbliche Färbung auf, die mit höheren Konzentrationen mehr und mehr ins orange bis braune umschlägt.

4.1.3. Photochemische Analyse von RsCryB

Das in dieser Arbeit angefertigte Konstrukt von RsCryB weist im Vergleich zu der Veröffentlichung von Hendrischk *et al.* 2010⁸⁸ einen durch den His₆-Tag verlängerten N-Terminus auf. Daher wurden die spektralen Eigenschaften erneut analysiert. RsCryB zeigt nicht das typische Absorptionsspektrum von Photolyase/Cryptochrom gebundenem Flavin.²⁵

4. Ergebnisse

Die beobachtete Absorption ist vielmehr von anderen überlagert, welche bereits einem möglichen Antennenchromophor von *RsCryB* zugeschrieben wurde.⁸⁸ In vorhergehenden Arbeiten konnte dieser zusätzliche Chromophor jedoch nicht identifiziert werden.

RsCryB ließ sich in Anwesenheit von DTT reduzieren, wobei die für oxidiertes FAD (FAD_{ox}) typische Absorption bei 450 nm mit zunehmender Reaktionszeit abnahm. Dabei fällt auf, dass während der Photoreduktion nur ein sehr geringer Teil des Flavins in die neutrale semichinoide Form übergeht, da die Absorptionsänderungen im Bereich zwischen 500 nm-700 nm geringfügig sind. Nach einem gewissen Punkt ändert sich das Spektrum nicht mehr, was auf eine vollständige Reduktion des Kofaktors hinweist (Abbildung 4.4).

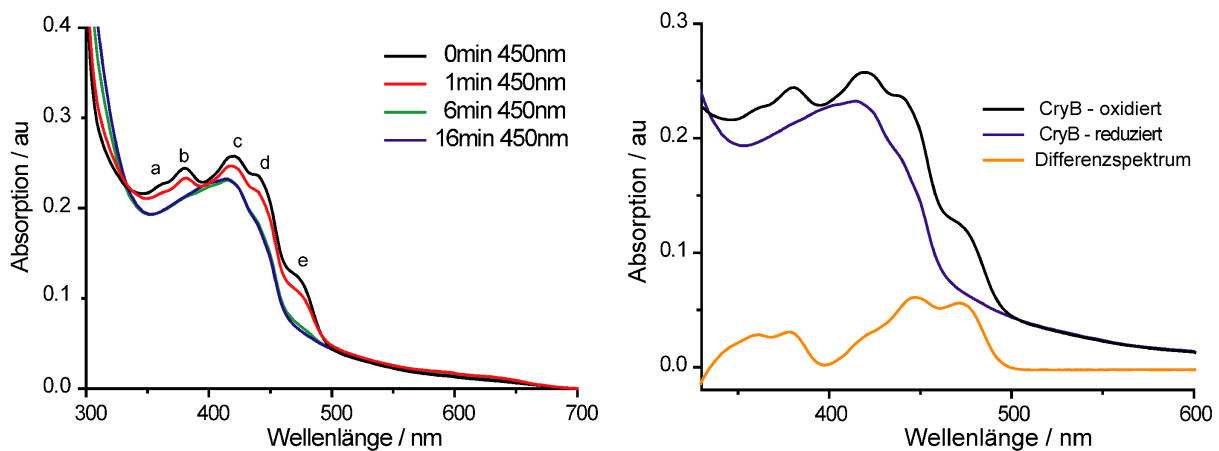


Abbildung 4.4: Spektroskopische Analyse von *RsCryB*. Links: Rekombinantes *RsCryB* weist fünf charakteristische Absorptionsmaxima auf: (a) 363 nm, (b) 380 nm, (c) 420 nm, (d) 438 nm, (e) 470 nm. Im Photoreduktionsassay nimmt die Absorption in diesem Bereich ab. Nach 16 min bleibt eine breite Bande mit einem Maximum bei 415 nm bestehen. Rechts: Das Differenzspektrum aus oxidiertem und reduziertem Form zeigt das typische Spektrum des Photolyase/Cryptochrom gebundenen FAD_{ox} . Das Protein lässt sich somit vollständig reduzieren.

4.1.4. Ein möglicher Antennenchromophor von Cryptochrom B

Bereits in der Erstcharakterisierung von Cryptochrom B aus *Rhodobacter sphaeroides* wurde neben FAD die Anwesenheit eines zweiten Chromophors durch UV/Vis- und Fluoreszenzspektren gezeigt, der allerdings nicht identifiziert werden konnte. Der Chromophor wies ein Absorptionsmaximum bei 420 nm auf, konnte jedoch kein Deazaflavin sein, da die heterologe Produktion im Deazaflavin-defizienten Organismus *E. coli* ebenfalls zur holo-Form von *RsCryB* führte. Eine weitergehende Analyse erfolgte in dieser Arbeit durch Abtrennung der Kofaktoren aus heterolog produziertem Protein, durch Denaturierung des Polypeptids und anschließender Isolierung der Chromophore durch HPLC mit gekoppelter

massenspektrometrischer Analyse im positiv-Modus. Dabei werden die getrennten Neutalmoleküle protoniert, um sie nach der HPLC im Massenspektrometer analysieren zu können.

Die hochauflösende Analyse wurde freundlicherweise von der massenspektrometrischen Analyseabteilung der Philipps-Universität Marburg unter Leitung von Dr. Uwe Linne durchgeführt. Die HPLC zeigt das Signal eines Chromophors bei einer Elutionszeit von 16.9 min der im UV/Vis Bereich absorbierte (Abbildung 4.5). Das erwartete FAD konnte im UV-Signal kaum beobachtet werden, wurde jedoch in der Masse detektiert.

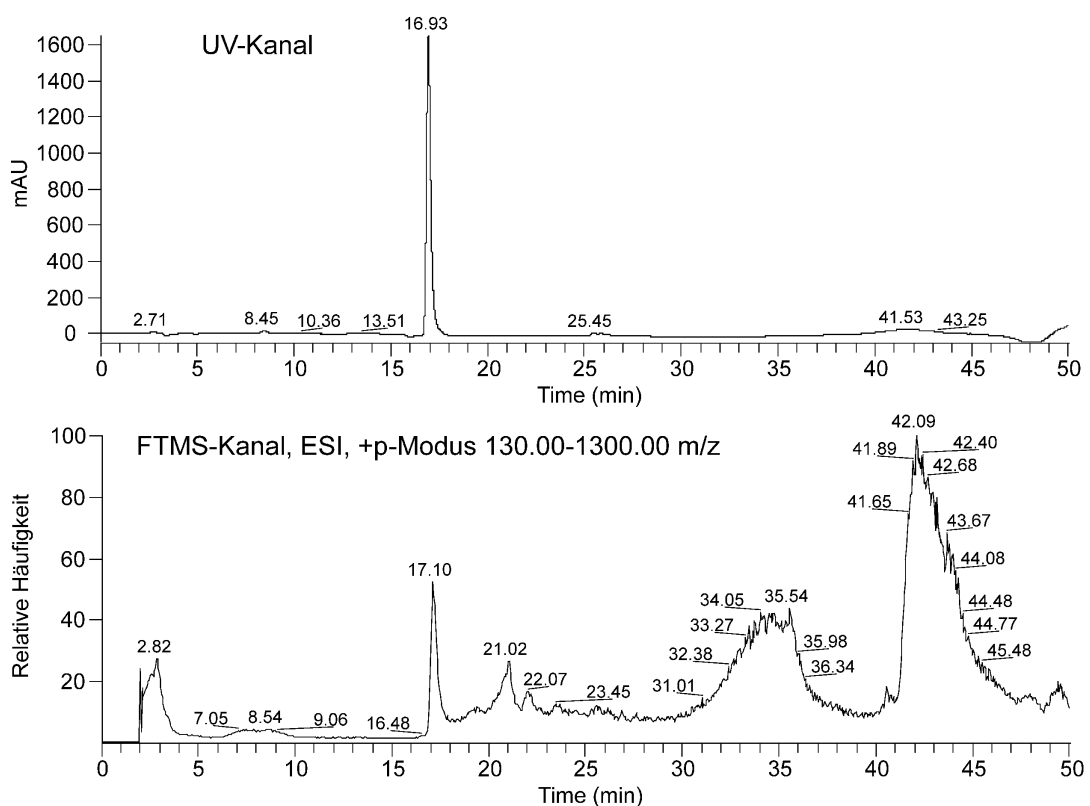


Abbildung 4.5: Analyse der isolierten Chromophore aus heterolog produziertem RsCryB. Oben: UV Chromatogramm des HPLC-Laufs, bei 16.93 min ist eine starke Absorption zu erkennen. Zwischen 35 und 48 min zeigt das Chromatogramm eine schwächere, sehr breite Absorptionsbande. Unten: Massensignal des HPLC Laufs im Bereich zwischen 130.00 und 1300.00 m/z. Die Bereiche erhöhter Absorption decken sich mit detektierten Ionen im untersuchten Massen-Ladungsbereich, wobei bei 17.1 min ein deutliches Signal zu erkennen ist.

4. Ergebnisse

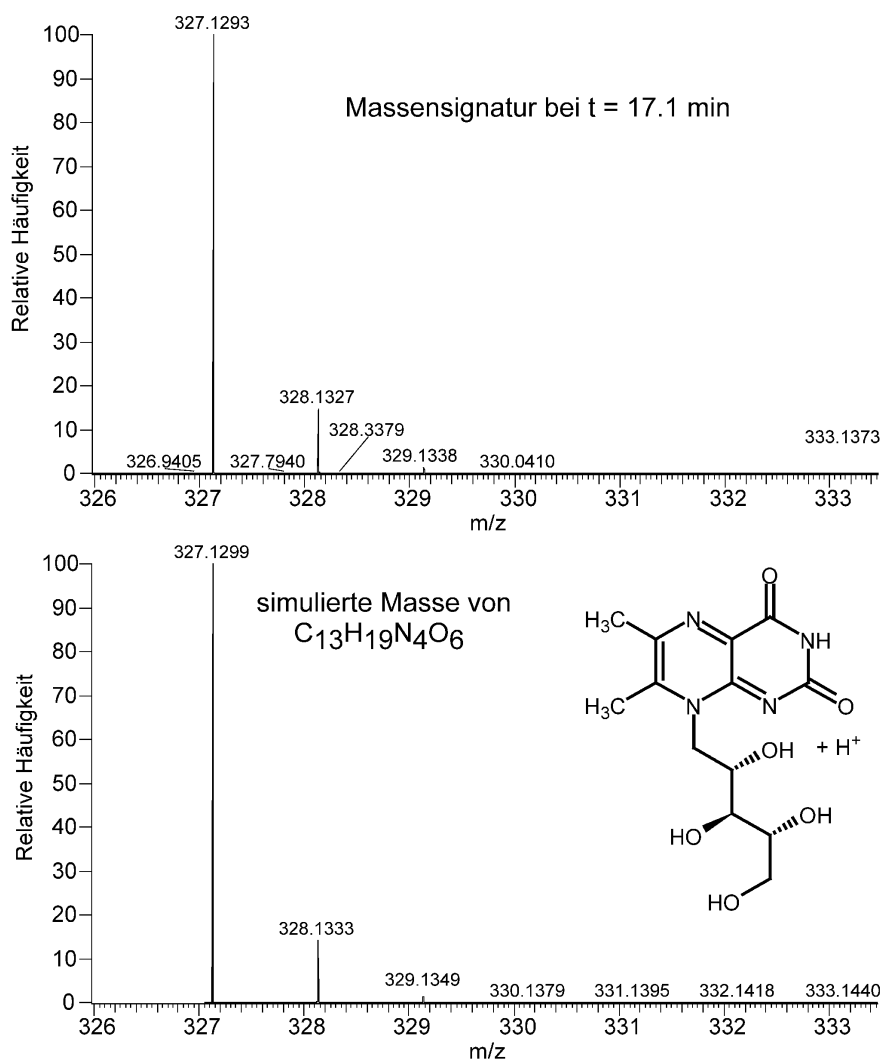


Abbildung 4.6: Analyse des Massensignals bei 17.1 min aus Abbildung 4.5. Oben: Hochauflösendes Massenspektrum des Signals. Neben dem Hauptsignal bei 327.1293 m/z sind Isotopensignale bei 328.1327 m/z und 329.1338 m/z deutlich zu erkennen. Unten: Theoretisches Massenspektrum ($z = 1$) der Summenformel $C_{13}H_{19}N_4O_6$, welche protoniertem 6,7-Dimethyl-8-ribyllumazin entspricht.

Die aus diesem Peak identifizierte Hauptmasse betrug 327.1293 m/z mit kleineren Peaks bei 328.1327 m/z und 329.1338 m/z, bei welchen es sich höchstwahrscheinlich um ^{13}C Isotopensignale der Hauptmasse handelt. Die Masse lässt sich mit dem Molekül $C_{13}H_{19}N_4O_6$ erklären, wobei zu beachten ist, dass dies die protonierte Masse ist. Ein Molekül welches plausibel zu der neutralen Masse von 326.1 g/mol und zu den spektroskopischen Daten passt ist 6,7-Dimethyl-8-ribyllumazin (DLZ) (Abbildung 4.6). Dieses Molekül wird nahezu ubiquitär in Mikroorganismen als letzte Vorstufe in der Riboflavinsynthese^{138,139} produziert und ist somit auch in *R. sphaeroides* und *E. coli* zugänglich.

4.1.5. *RsCryB* enthält einen [4Fe-4S] konfigurierten Eisen-Schwefel-Cluster

Eine Sequenzanalyse der *CryPro*-Familie zeigte in der C-terminalen Sequenz eine Signatur von vier konservierten Cysteinen, wobei zwei in einem CXXC-Motiv vorliegen (Abbildung 4.1), welches auf die Anwesenheit eines Eisen-Schwefel-Clusters hinweisen kann.¹⁴⁰ Gebundene Eisen-Schwefel-Cluster können qualitativ und bei guter Kalibrierung der einzelnen Assays auch quantitativ durch Bestimmung von gebundenem Eisen bei gleichzeitiger Anwesenheit von säurelabilem Schwefel identifiziert werden. Bei *RsCryB* wurden pro Mol Protein 4 mol säurelabiler Schwefel sowie 3.5 mol Eisenionen

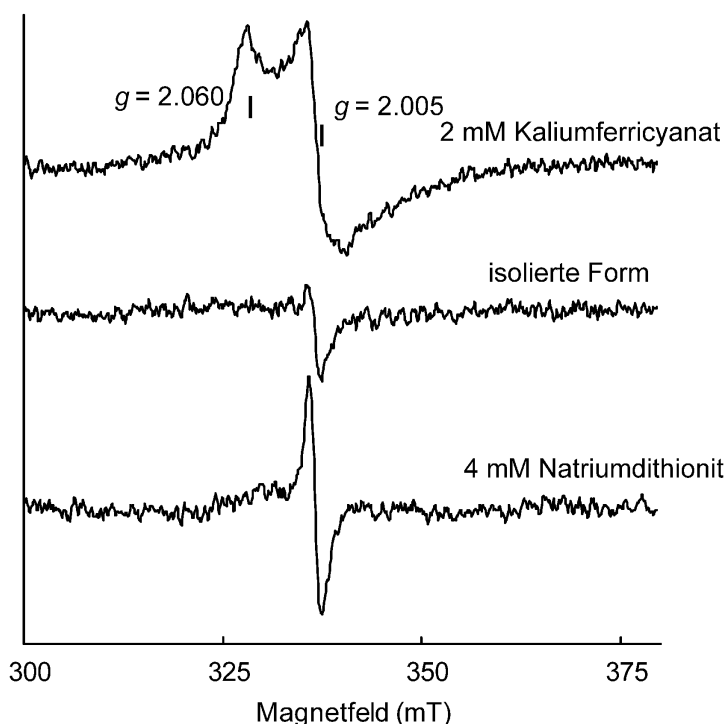


Abbildung 4.7: EPR-spektroskopische Untersuchung von *RsCryB* in drei verschiedenen Zuständen. Nur in der durch 2 mmol/L Kaliumferricyanat oxidativ behandelten Form ist ein für paramagnetische Ionen typisches Signal zu erkennen. Die isolierte Form, sowie der durch 4 mmol/L Natriumdithionit reduzierte Zustand zeigen Signale, die für organische Radikale typisch sind.

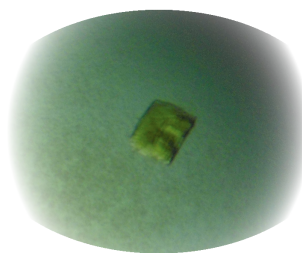
nachgewiesen. Das gefundene Verhältnis von etwa 1:4:4 spricht für einen gebundenen [4Fe-4S]-Cluster pro Polypeptidkette. Um den Cluster weiter zu charakterisieren, wurde von Dr. Antonio Pierek, Philipps-Universität Marburg EPR-Spektroskopie angewendet. Dabei wurden Experimente mit unbehandeltem, mit Natriumdithionit (4 mmol/L) behandeltem und mit Kaliumferricyanat (2 mmol/L) behandeltem durchgeführt (Abbildung 4.7). Dabei zeigte sich in der durch Eisen(III) oxidierten Probe ein breites, axial anisotropes Signal, charakteristisch für Spin gekoppelte paramagnetische Ionen mit g-Werten von 2.060 und 2.005, welches oberhalb von 40 K durch Verbreiterung verschwand. Dieses Signal resultiert höchstwahrscheinlich von Spin-gekoppelten Eisen(II)- und Eisen(III)-Ionen welche aus einem diamagnetischen Cluster in unbehandeltem *RsCryB* durch Oxidation entstanden sind. Das Signal im reduzierten Zustand entsprach einem für organische Radikale typischen, welche durch Reduktion des gebundenen Flavins in einen radikalischen Zustand entstehen können.

4. Ergebnisse

Obwohl das Signal substöchiometrisch war, was neben einer unvollständigen Besetzung entweder für ein sehr hohes Redoxpotential oder einen schnellen oxidativen Abbau des Cluster spricht, unterstützt es die Anwesenheit eines [4Fe-4S]-Cluster in nativem *RsCryB*. Dieser wandelt sich durch Oxidation in eine Struktur mit paramagnetischen Eigenschaften (Spin $S = 1/2$, $g_{\text{average}} > 2$) um, welche [3Fe-4S]⁺ aus Aconitase oder [4Fe-4S]³⁺ aus Eisen-Schwefel Proteinen mit hohem redox Potential (HiPIP, *high potential iron-sulphur proteins*) ähnelt. Ähnliche Ergebnisse wurden für die [4Fe-4S]²⁺ Cluster der AddAB helicase¹⁴¹ bzw. Primasen aus *Sacharomyces cerevisiae*¹⁴² oder *Homo sapiens*¹⁴³ publiziert.

4.1.6. Kristallisation und Strukturlösung von *RsCryB*

Die Kristallisation des Proteins erfolgte im Vorfeld dieser Arbeit durch Dr. Claudia Schröder, wobei das Protein nicht in der AG Essen produziert wurde, sondern freundlicherweise von der Gruppe um Prof. Dr. Gabriele Klug von der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Verfügung gestellt wurde. Das *screening* erfolgte mittels eines Cartesian Kristallisationsroboter. Als initiale Bedingung wurde Nr. 53 aus dem MBClass-Screen (0.3 M MgCl₂, 0.1 M



Bedingung:
0.3 M MgCl₂
0.1 M Bicine, pH 8.5
29.5% PEG2000
17.5% Glycerin

Bicine pH 9.0, 25% PEG2000, 15% Glycerin) gefunden. *RsCryB* Kristalle

Abbildung 4.8: Typischer RsCryB Kristall aus der Kristallisationsbedingung, die den Datensatzkristall hervorbrachte.

(Abbildung 4.8) traten stets als orange-gelb gefärbte Platten auf, welche oft miteinander verwachsen waren. Die Optimierung der Kristalle im 24-*well* Format führte zu der finalen Bedingung (3 mol/L MgCl₂, 0.1M Bicine pH 9.0, 29.5% PEG2000, 17.5% Glycerin), aus welcher der Kristall für die anschließende Datensammlung stammte (Abbildung 4.8). Der Kristall wurde im Cryopuffer (0.3 M MgCl₂, 0.1 M Bicine pH 9.0, 25% PEG2000, 30% Glycerin), welcher zusätzlich 100 mM GdCl₂ enthielt, für 30 min inkubiert, anschließend in Cryopuffer ohne Gadoliniumsalz gewaschen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Da zu diesem Zeitpunkt die Anwesenheit des FeS-Clusters noch nicht bekannt war, sollte der Zusatz von Gadolinium die Strukturlösung über SAD oder MAD ermöglichen. Die Datensammlung erfolgte an der ID14-4 des ESRF, Grenoble, Frankreich.

Tab. 4.1: Statistiken der Datensammlung. Prozessierung sowie Verfeinerung von RsCryB.

Datensammlung und Prozessierung	RsCryB P6_s22, 3ZXS	RsCryB C121
Röntgenquelle	ESRF, Grenoble, Frankreich, ID14-4	ESRF, Grenoble, Frankreich, ID29
Detektor	ADSC Quantum Q315r	Pilatus 6M
Wellenlänge (Å)	1.319	0.96865
Raumgruppe	P6 _s 22	C121
Zelldimensionen (a,b,c (Å)) α,β,γ (°)	137.8, 137.8, 521.9 90.0, 90.0, 120.0	112.9, 170.2, 105.7 90.0, 118.4, 90.0
Auflösung (Å)	25.0 – 2.7	25.0 – 3.3
Gesamte Reflexe	1239850	89360
Multiplizität	15.2 (15.2)	3.4 (3.3)
Einzigartige Reflexe	81535	26048
R_{merge} (%)	0.100 (0.563)	0.171 (0.485)
Vollständigkeit (%)	99.8 (99.8)	98.8 (98.9)
$I/\sigma(I)$	26.9 (5.4)	7.5 (2.6)
Wilson B-Faktor (Å ²)	48.5	63.2
Verfeinerungsstatistiken		*vorläufige Daten
Auflösung (Å)	25.0 – 2.7 (2.77 – 2.70)	24.82 – 3.30 (3.385 – 3.30)
R_{work} , R_{free} (%)	19.9, 22.8	28.5, 39.9*
Reflexanzahl (Arbeitssatz; Testsatz)	78535; 2000	24750, 1298
Vollständigkeit des Bereichs	100.0	99.1
Atomanzahl	12513	12081
Mittlerer B-Wert	32.2	26.9*
Mittleres Wurzelabstandsquadrat von den Idealwerten		
Bindungslänge Auflösung (Å)	0.016	0.013*
Bindungswinkel (°)	1.55	1.50*

4. Ergebnisse

Der Datensatz, mit einer Auflösung von 2.7Å wurde mit dem anomalen Signal des enthaltenen Eisen-Schwefel-Clusters durch *single-anomalous-dispersion* (SAD) in Phenix¹⁴⁴ gelöst. Ein erstes Modell wurde durch das Phenixmodul Autobuild¹⁴⁴ in die experimentelle Elektronendichte gebaut. Das Strukturmodell wurde zunächst iterativ in Phenix¹⁴⁴ und Coot⁹⁰, später in Refmac5¹³⁴ und Coot⁹⁰ gegen die experimentelle Elektronendichte verfeinert (vergleiche 3.6.5.3). Die finalen Statistiken sowie die Statistiken der Datensammlung können Tab. 4.1 (*RsCryB* P6₅22) entnommen werden. Die Koordinaten des verfeinerten Modells sowie die experimentellen Daten wurden in der *protein database*¹¹⁹ (PDB) unter dem Code **3ZXS** hinterlegt.

Die Strukturlösung erfolgte mit einem Kristall, der vor dieser Arbeit durch Dr. Claudia Schröder erhalten wurde. Dabei wurde das Protein von der Gruppe um Prof. Dr. Klug nach der von Hendrischk *et al.* 2009 veröffentlichten Methode produziert und gereinigt⁸⁸ und für die Kristallisation zur Verfügung gestellt. Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde versucht, das Protein erneut zu kristallisieren und durch eine verbesserte Kristallqualität die Auflösung zu verbessern. Zunächst wurde dabei Protein von den Kooperationspartnern zur Verfügung gestellt, die Kristallisation ließ sich jedoch nicht reproduzieren. Durch den Wechsel des Expressionsstamms und des Vektorsystems konnte die Ausbeute und Qualität an löslichem Protein deutlich erhöht werden (siehe 4.1.2), was auch für die spektroskopischen Assays und Mutagenesestudien von Vorteil war. Während bei Hendrischk *et al.* der pQE60 Vektor zusammen mit *E. coli* JM109 Zellen verwendet wurde,⁸⁵ lieferte der Expressionsstamm *E. coli* Rosetta(DE3) zusammen mit dem pET28a-System höhere Proteinausbeuten (12 mg/L zu vorher ~1 mg/L). Durch die Etablierung der Heparin-Chromatographie konnte zudem die Proteinqualität noch weiter gesteigert werden, so dass zum ersten mal reproduzierbar Kristalle aus jeder Charge *RsCryB* erzeugt werden konnten. Alle untersuchten Kristalle zeigten die gleiche Raumgruppe und Zellparameter wie der gelöste Datensatz, allerdings bei einer schlechteren Auflösung von meist 4 Å. Die Qualität des vermessenen Kristalls konnte jedoch trotz des verbesserten Verhaltens nicht reproduziert werden. Daher wurde versucht, durch Kokristallisation mit Kleinmolekülen aus dem Hampton SilverBulletscreen das Kristallisationsverhalten generell zu verbessern (siehe Anhang 7.4). Mit (0.2%) Kongorot in der Bedingung SB1 (0.1 mol/L HEPES pH 7.5, 0.1 mol/L AmSO₄, 30% (v/v) PEG 400) wurden Kristalle in einer neuen Kristallform erhalten, von denen einer ausreichende Streuqualität zur Aufnahme eines Datensatzes aufwies (Anhang 7.4). In dieser Bedingung

kristallisierte *RsCryB* in der Raumgruppe C121 mit den Zellparametern $a=112.9$, $b=170.2$, $c=105.7$, $\alpha=\gamma=90^\circ$ sowie $\beta=118.4^\circ$ und der Datensatz konnte bis zur Auflösung von 3.3 \AA verwendet werden. Auch in diesem Fall enthielt die asymmetrische Symmetrieeinheit drei Moleküle. Zwar bildeten diese andere Kristallkontakte aus, die Struktur des Proteins zeigte aber keine bemerkenswerten Veränderungen, so dass auf eine finale Verfeinerung zunächst verzichtet wurde. Die vorläufigen Statistiken nach drei Refmac5-Cyclen sind in Tab. 4.1 (*RsCryB* C121) aufgestellt.

4.1.7. *In crystallo* Spektroskopie

An der Beamline ID14-1 des ESRF bestand in Zusammenarbeit mit der CryoBench¹⁴⁵ des ESRF die Möglichkeit parallel zur Bestrahlung eines Kristalls mit Röntgenstrahlung (0.934 \AA), UV/Vis-Spektren unter cryogenen Bedingungen von diesem aufzunehmen. Der Kristall wurde der Bedingung

(0.3 mol/L MgCl_2 , 28 % PEG2000, 0.1 mol/L Bicine pH 8.5, 15 % Glycerin) entnommen, im passenden Cryopuffer (0.3 mol/L MgCl_2 , 28 % PEG2000, 0.1 mol/L Bicine pH 8.5, 30 % Glycerin) *gesoakt* und in flüssigen Stickstoff schockgefroren. An der Beamline

wurde der Kristall (Abmessungen ca. $80 \mu\text{m} \times 80 \mu\text{m} \times 30 \mu\text{m}$) per Hand auf den Goniometerkopf montiert und in den Brennpunkt

eines Linsensystems, welcher passend zum Röntgenstrahl ausgerichtet war, zentriert. Dort konnte er mit dem Licht aus einer DH2000 Deuterium/Wolfram Lichtquelle (OceanOptics) bestrahlt werden, wobei die Lichtleitung über Glasfaserkabel von OceanOptics erfolgte. Als Detektor wurde ein HR2000 CCD-Detektor (OceanOptics) verwendet. Mit diesem Setup konnten Absorptionen im Wellenlängenbereich zwischen 215 nm - 1000 nm aufgezeichnet werden.⁶⁰ Der Kristall wurde vor dem Experiment spektroskopisch untersucht, anschließend

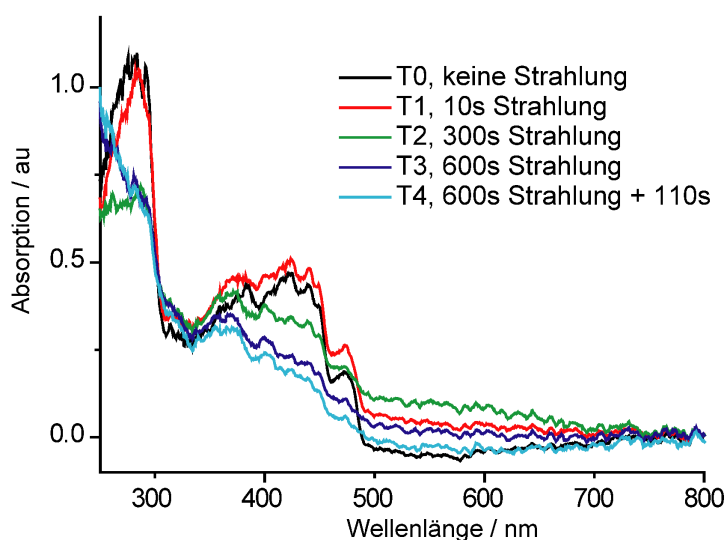


Abbildung 4.9: Online Mikrospektroskopie an *RsCryB*. Gezeigt sind die vier Messpunkte T0 bis T4, wobei die Reduktion des FAD mit fortdauernder Röntgenexposition (0.934 \AA) zu erkennen ist. Die starke Schulter zwischen 390 und 450 nm zum Zeitpunkt T3 kann auf einen weiteren Chromophor hinweisen.

4. Ergebnisse

10 s bestrahlt und das Spektrum nochmals examiniert. Die Abmessungen des Röntgenstrahls wurden dabei so gewählt, dass der Kristall vollständig bestrahlt wurde. Anschließend erfolgte eine kontinuierliche Bestrahlung über 600 s, wobei über einen Softwareschalter alle 10 s ein Absorptionsspektrum aufgenommen wurde. Der Kristall wurde während des Experiments nicht bewegt, so dass veränderte Reflexionen am Kristall die Spektren nicht beeinflussen konnten. Während des Experiments betrug der Photonenfluss des Röntgenstrahls durchschnittlich $4.7 \cdot 10^{10}$ -Photonen/s. Die gezeigten Spektren wurden mit Origin 7.0 durch Glättung über 10 nebeneinander liegenden Punkten (entsprechend 4 nm) aufbereitet und die Spektren bei 800 nm auf die Absorption 0 gebracht. Das *in crystallo* Spektrum von RsCryB zeigt gegenüber dem in Lösung keine besonderen Auffälligkeiten. Die beobachteten Maxima decken sich gut mit denen in Lösung (Abbildung 4.9, T0, vergleiche mit Abbildung 4.4). Nach einer Exposition von 10 s ist eine generelle Zunahme der Absorption zu sehen, vor allem im Bereich zwischen 500 nm und 700 nm, in dem die neutrale semichinoide Form des Kofaktors FAD absorbiert (Abbildung 4.9, T1). Im weiteren Verlauf des Experiments tritt die Absorption in diesem Bereich immer deutlicher hervor, allerdings ohne erkennbare Feinstruktur; wobei die Absorption des oxidierten Flavins bei 450 nm abnimmt (Abbildung 4.9, T2). Nach Ende der Bestrahlung mit Röntgenstrahlen ist die Absorption im grüngelben Spektralbereich wieder verschwunden und man kann die typische Absorptionsbande des vollständig reduzierten FADs bei 365 nm erkennen. Interessanterweise zeigt sich jedoch eine starke Schulter die zwischen 400 nm und 500 nm näherungsweise linear abfällt (Abbildung 4.9, T3). Dies kann auf die Anwesenheit eines weiteren Chromophors hinweisen, oder auf die Anwesenheit von oxidiertem FAD, welches noch nicht reduziert wurde. Das Spektrum wurde für eine kurze Zeitspanne weiter beobachtet. Nach weiteren 110 s zeigte sich keine Reversion zurück zum Ausgangsspektrum (Abbildung 4.9, T4), so dass die beobachteten Veränderungen zumindest temporär nicht reversibel sind.

4.1.8. Die Struktur von RsCryB und der Vergleich mit den kanonischen Mitgliedern der PCSf

Das Protein kristallisierte in der Raumgruppe $P6_522$ mit $a=b=137.84 \text{ \AA}$, $c=521.84 \text{ \AA}$, $\alpha=\beta=90^\circ$ und $\gamma=120^\circ$, mit drei Molekülen pro asymmetrischer Symmetrieeinheit (asu). Alle weiteren strukturellen Beschreibungen beziehen sich, falls nicht anders angegeben, auf Molekül A (Abbildung 4.10).

RsCryB zeigt die bilobale Faltung, die für die Mitglieder der PCSf typisch ist (Abbildung 4.11). N-terminal faltet sich die Polypeptidkette in fünf Helices und ein fünfzähliges, paralleles β -Faltblatt (AS 1-123). Die Proteintopologie ähnelt dabei der Rossmannfaltung für Nukleotidbindungsdomänen.¹⁴⁶ Diese ist mit der C-terminalen α -helicalen katalytischen

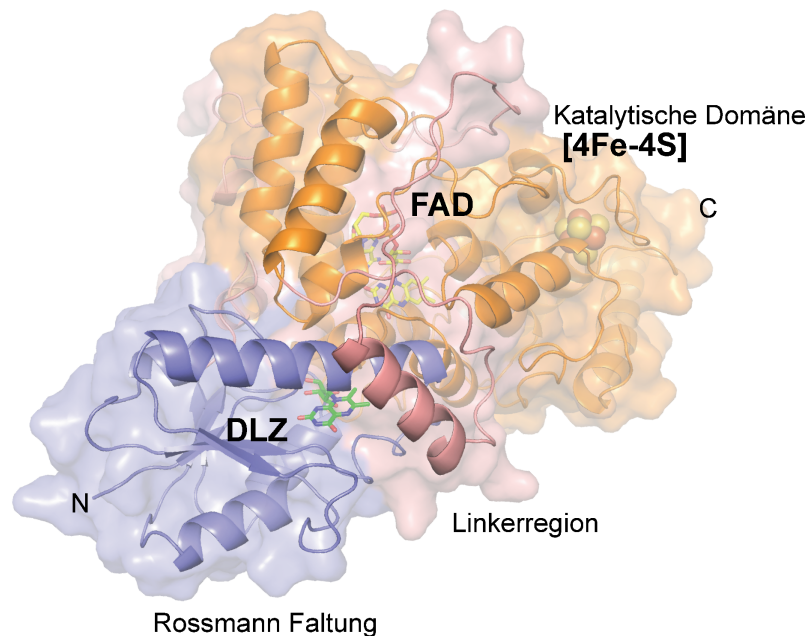
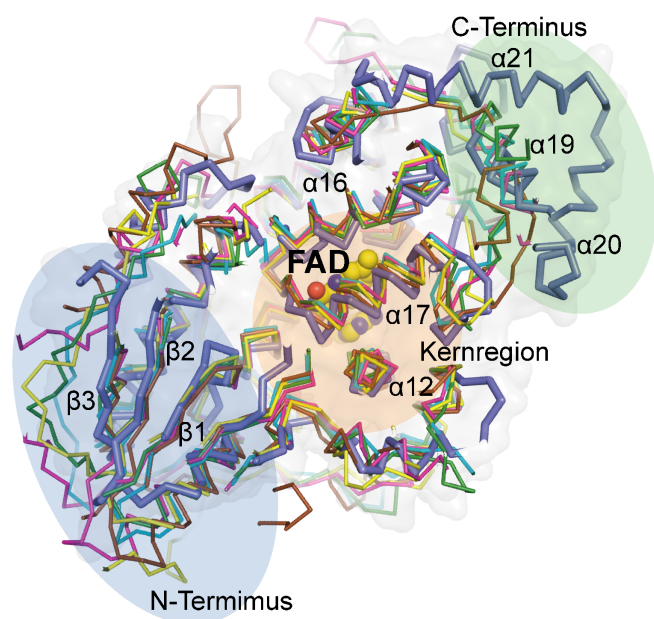


Abbildung 4.10: Übersicht über die dreidimensionale Faltung von *RsCryB* (3ZXS). Das Protein zeigt den typischen bilobalen Aufbau der PCSf. N-terminal faltet sich das Polypeptid in eine Rossmannfalte (blau) in welcher das Nukleotid 6,7-Dimethyl-8-ribityl-lumazin (DLZ) bindet. Das katalytische Flavin-Adenin-Dinukleotid bindet in der helikalen C-terminalen katalytischen Domäne (orange), in welcher auch der gefundene [4Fe-4S]-Cluster gebunden wird. Beide Domänen sind über eine Linkerregion (lachsfarben) miteinander verknüpft, die sich einmal um das ganze Protein windet.

Abbildung 4.11: Überlagerung der Struktur von *RsCryB* (blau, dicke Linien) mit anderen Vertretern der PCSf: *EcCPDI* (türkis, 1DNP, 2.9 Å), *Dm(6-4)* (magenta, 3CVU, 3.1 Å) *AtCry3* (gelb 2J4D, 3.0 Å) *AtCry1* (grün, 1U3C, 3.0 Å) *MmCPDII* (braun, 2XRY, 2.6 Å).. Die farbigen Markierungen verdeutlichen im Text besprochene Regionen. Die N-terminale Domäne ist blau, die Kernregion der C-terminalen katalytischen Domäne ist orange und die endständige dachartige Faltung in grün hinterlegt. Die Faltung der gezeigten kanonischen und nicht kanonischen Vertreter ist im wesentlichen gleich. Die größten Unterschiede finden sich in den jeweils letzten Helices des C-Terminus. Die angegebenen Entfernungen entspricht der Wurzel der mittleren Abstandsquadrate zwischen den C_{α} -Atomen der jeweiligen Polypeptidkette zu *RsCryB*.



4. Ergebnisse

Domäne über einen 102 Aminosäure langen „Linker“ (AS 124-226) verbunden, der sich einmal um das ganze Protein windet. In der C-terminalen Domäne (AS 227-508), welche aus 18 Helices aufgebaut ist, ist das katalytische Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD) gebunden, sowie in einer bisher nicht beobachteten dachartigen Subdomäne (AS 431-508) ein Eisen-Schwefel-Cluster, welcher durch die Elektronendichte eindeutig als [4Fe-4S]-Cluster identifiziert werden kann. Ein dritter Kofaktor befindet sich in der N-terminalen Domäne. Durch Elektronendichte und vorhergehende Analysen konnte er als 6,7-Dimethyl-8-ribitylumazin (DLZ) identifiziert werden.

Das gebundene FAD liegt innerhalb der C-terminalen Domäne am Grunde eines Kanals, welcher von einer stark basischen Oberfläche umgeben ist, wodurch vermutlich eine Bindung von Nukleinsäuren ermöglicht wird. Der Kofaktor liegt in der für Photolyasen und Cryptochrome typischen U-Form³⁰ vor. Der Isoalloxazinring bildet dabei viele Wechselwirkungen mit sowohl Aminosäureseitenketten als auch dem Peptidrückgrat aus. Die Verwandtschaft zur PCSf wird dabei vor allem durch die Salzbrücke zwischen D393 und R365 und die Faltung der Polypeptidkette um den Flavinchromophor hervorgehoben. Gleichwohl fallen auch gravierende Unterschiede zu den bisher untersuchten Mitgliedern der Superfamilie auf. So liegt in der direkten Umgebung des FAD kein Tryptophan wie in anderen strukturell charakterisierten Vertretern (W382 *EcCPDI* 1DNP³⁰, W407 *Dm(6-4)* 3CVU³⁸, W432 *AtCry3* 2J4D³⁵, W400 *AtCry1* 1U3C³⁴). An der strukturell äquivalenten Position steht in *RsCryB* T403 in van-der-Waals Kontakt mit dem FAD. An der Position, welche der Indolring des besprochenen Tryptophans einnimmt, findet sich stattdessen Y387 (Abbildung 4.12 A). In direkter Nachbarschaft ist ein konserviertes Leucin (L370 *EcCPDI* 1DNP³⁰, L395 *Dm(6-4)* 3CVU³⁸, L420 *AtCry3* 2J4D³⁵, L388 *AtCry1* 1U3C³⁴) ebenfalls durch ein Tyrosin ersetzt. Somit befinden sich zwei potentiell redoxaktive, aromatische Aminosäuren in direkter Umgebung zum FAD (siehe Abbildung 4.12), wobei sich die centroid-centroid Abstände mit 7.1 Å (Y387) und 7.2 Å (Y391) nur unwesentlich unterscheiden.

Ausgehend von diesen beiden Tyrosinen lässt sich über Tryptophan W386 zu dem oberflächenexponierten Tryptophan W338 eine Reduktionskaskade postulieren, da die kanonische Triade bestehend aus W306, W359 und W362 (*EcCPDI* 1DNP, stellvertretend für den kanonischen Typ der PCSf) in *RsCryB* nicht vorhanden ist (Abbildung 4.12 B).

Eine weitere Neuheit ist das Fehlen einer Aminosäureseitenkette, welche eine Wechselwirkung mit dem N5-Stickstoff des Flavins eingeht (N378 *EcCPDI* 1DNP³⁰, N402

*Dm(6-4) 3CVU*³⁸, N428 *AtCry3 2J4D*³⁵, N396 *AtCry1 1U3C*³⁴, C416 *DmCry1 4GU5*³⁷). Stattdessen befindet sich ein Wassermolekül, welches sich in allen drei Molekülen der Kristallpackung findet, an einer analogen Position (siehe Abbildung 4.12). Die Seitenkette von Glutamat E399 ist prinzipiell in der Lage den N5-Stickstoff zu koordinieren, dreht sich aber von diesem weg und geht eine polare Wechselwirkung mit Histidin H384 ein, welches sich an der Proteinoberfläche befindet.

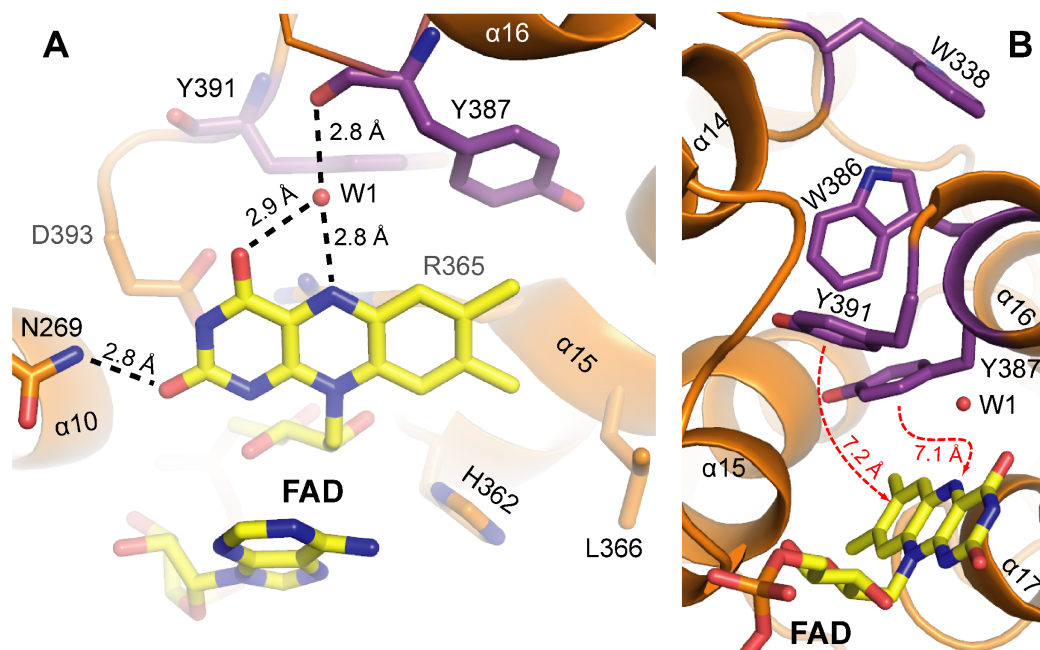


Abbildung 4.12: Unterschiede von *RsCryB* zur PCSf. A) Der katalytische Kofaktor FAD bindet in der C-terminalen Domäne in der typischen U-Form. Wie in allen bisher strukturell charakterisierten Vertretern ist eine Salzbrücke zwischen R365 und D393 in *RsCryB* vorhanden. Neuartig ist dagegen die Anwesenheit des Wassers W1 in der Bindungstasche, welches sich im H-Brücken Abstand zum N5-Stickstoff und O4-Sauerstoff des Flavins und dem Rückgrat-Carbonyl von Y387 befindet. Die beiden Tyrosine Y387 und Y391 wurden bisher noch nicht beobachtet. B) Ausgehend von den beiden Tyrosinen in direkter Umgebung des Flavins lässt sich eine Reduktionskaskade über die Reste W386 und W338 postulieren.

Der Adeninanteil des FAD definiert das obere Ende der putativen katalytischen Tasche. Substrate haben über den oben beschriebenen Kanal Zugang zur Tasche, deren Wände Charakteristika von allen Vertretern der PCSf zeigen und somit *RsCryB* weiter von den strukturell bekannten Vertretern absetzt. So formen in allen Photolyasen zwei Tryptophane die Seitenwand der katalytischen Tasche (W277 und W384 *EcCPDI 1DNP*³⁰, W302 und W409 *Dm(6-4) 3CVU*³⁸). Das untere der beiden (W306) ist auch in *RsCryB* konserviert, wohingegen das andere durch M406 substituiert ist, das außer in der CryPro-Familie in keiner anderen Klasse der PCSf gefunden wird. Die Verwandtschaft zu den Cryptochromen wird durch L366 (V363 *AtCry1 1U3C*³⁴) und die Ähnlichkeit zu (6-4)-Photolyasen durch die Anwesenheit eines

4. Ergebnisse

Histidins (H362) in der katalytischen Tasche (H365 *Dm*(6-4) 3CVU³⁸) verdeutlicht, wobei diese Merkmale auch in der CryPro-Familie konserviert sind. Diese Mischung aus den verschiedenen bekannten Klassen der PCSf setzt die neuartige CryPro-Klasse weiter deutlich von den bekannten strukturellen Vertretern ab.

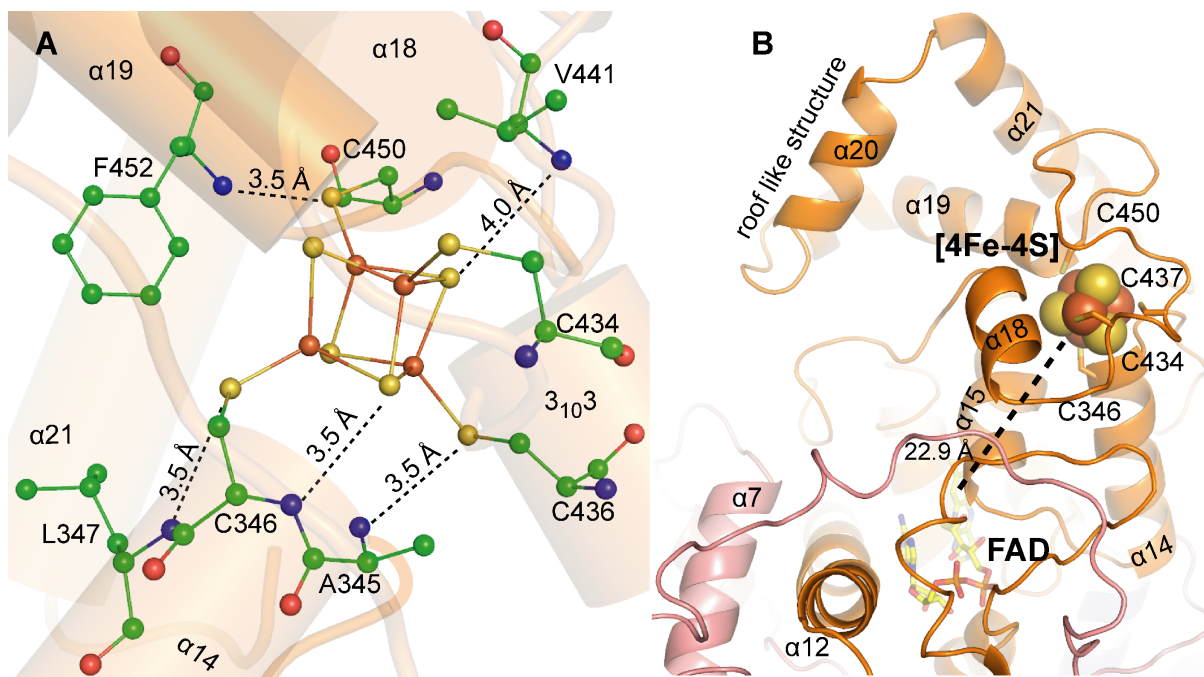


Abbildung 4.13: Einblick in die direkte Umgebung des [4Fe-4S]-Clusters. **A)** Das Wasserstoffbrückennetzwerk ausgehend von amidischen Stickstoffen ist mit Entfernungsangaben hervorgehoben. **B)** Der Eisen-Schwefel-Cluster bindet in der C-terminalen Domäne in einer Entfernung von 22.9 Å zum katalytischen FAD. Die vier Eisenatome werden von den konservierten Cysteinen der CryPro-Familie koordiniert. Die letzten drei Helices $\alpha 19$, $\alpha 20$ und $\alpha 21$ bilden eine dachartige Struktur aus.

Die letzten drei Helices in der Struktur von *RsCryB* ($\alpha 19$, $\alpha 20$, $\alpha 21$) bilden eine neuartige Faltung, verglichen mit den anderen strukturell charakterisierten Vertretern. Diese dachartige Faltung, gebildet von den Aminosäuren 424-509, wird unter anderem durch den [4Fe-4S]-Cluster strukturell organisiert, da die Eisenatome durch die vier Cysteine C346, C434, C437 und C450 koordiniert werden (siehe Abbildung 4.13 B). Der Cluster befindet sich in einem Zentroidabstand von 22.9 Å zum Flavin, was für mögliche Elektronenübertragungen sehr weit erscheint. Zusätzlich ist der Raum zwischen den beiden Kofaktoren von der Helix $\alpha 15$ blockiert, die sich zwischen FAD und dem Eisen-Schwefel-Cluster zu einer π -bulge aufweitet. Neben der direkten Bindung der Thiolgruppen an die Eisenatome kann ein Polypeptid vor allem durch Wasserstoffbrückenbindungen einen solchen Cluster noch fester binden. In der Struktur von *RsCryB* fallen fünf Stickstoffatome ins Auge, welche eine solche Aufgabe übernehmen könnten, da sie alle im passenden Abstand von

3.5-4 Å zu den Schwefelatomen sind. Dabei wechselwirken die amidischen Stickstoffe der Aminosäuren A345, L347 und F452 mit den Thiolgruppen von C436, C346 und C450, jeweils mit einem Abstand von 3.5 Å. Zwei weitere Bindungen erfolgen zu den Schwefelatomen des eigentlichen Cubans und zwar V441 im Abstand von 4 Å, sowie C346 (3.5 Å), welches auch durch seine Seitenkette den Cluster bindet (siehe Abbildung 4.13 A).

In der N-terminalen Domäne, in welcher bei anderen Vertretern ein Antennenchromophor bindet, wurde ein dritter Kofaktor in *RsCryB* lokalisiert. Durch die Form der Elektronendichte und die Hinweise aus den massenspektrometrischen Untersuchungen wurde er als 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin (DLZ) identifiziert. Das Pterinnukleosid wird von der Proteinumgebung spezifisch erkannt. Die Alkoholgruppen des Ribitylrests bilden alle Wasserstoffbrückenbindungen zu den Aminosäuren des Polypeptids, wobei Aspartat D10 zwei Wechselwirkungen ausbildet und Glutamat E37 sowie Tyrosin Y40 jeweils eine Brücke eingehen. Der Pterinanteil tritt hauptsächlich durch hydrophobe Wechselwirkungen und π -stacking mit der Proteinumgebung in Kontakt. Nur zwei polare Wechselwirkungen konnten in der Struktur gefunden werden. Der N5-Stickstoff bildet, in Analogie zum katalytischen Flavin, eine Wasserstoffbrücke zu einem Wassermolekül aus, welches wiederum mit der *backbone* Carbonylgruppe von Valin V34 wechselwirkt. Der N3-Stickstoff ist in Wasserstoffbrückendistanz zur *backbone* Carbonylgruppe von Alanin A32. Die strukturelle Übersicht der Tasche sowie ein Bindungsschema ist in Abbildung 4.14 zu finden.

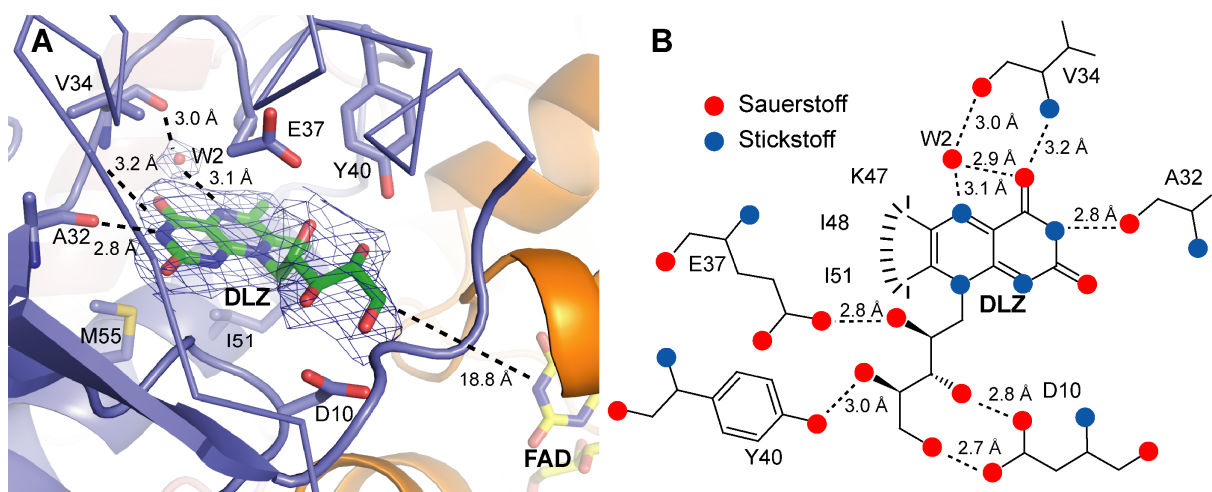


Abbildung 4.14: Übersicht der Bindungstasche von 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin (DLZ) in *RsCryB*. A) Der Chromophor ist durch die Elektronendichte ($2F_{obs}-F_{calc}$, konturiert bei 1σ) gut definiert. Die polare Wechselwirkung des N5-Stickstoffs, bereits beim FAD beschrieben, wiederholt sich auch hier. Der Ribitylrest bildet Wasserstoffbrücken zu den angegebenen Resten aus, wohingegen das Folatringssystem durch polare und hydrophobe Wechselwirkungen gebunden wird. B) 2D-Schema der Bindungstasche. Polare Wechselwirkungen sind durch gestrichelte Linien und unpolare durch dicke kurze Linien gekennzeichnet.

4. Ergebnisse

4.1.9. Untersuchung zur möglichen (6-4)-Photolyase Aktivität

Im Vorfeld dieser Arbeit wurde bereits durch Hendrischk *et al.* ausgeschlossen, dass *RsCryB* den CPD-Schaden als Substrat erkennt.⁸⁸ Im Zusammenhang mit diesen Experimenten wurde weiterhin gezeigt, dass *RsCryB* eine höhere Affinität zu einzelsträngigen als zu doppelsträngigen Nukleinsäuren hat. Aufgrund der in der Struktur gefundenen Ähnlichkeit mit (6-4)-Photolyasen (siehe 4.1.8) wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Carell an der Ludwig-Maximilians-Universität München ein Assay auf Reparaturaktivität hinsichtlich des

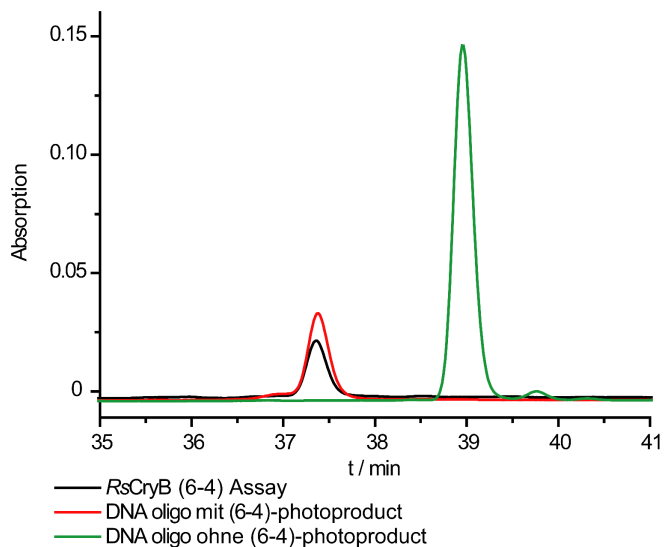


Abbildung 4.15: Assay zur Reparaturaktivität des (6-4)-Pyrimidinpyrimidon-Photoproducts von *RsCryB*. In dem Ausschnitt des analytischen HPLC-Laufs zeigt der Assay mit *RsCryB* (schwarz) kein repariertes Oligonukleotid.

(6-4)-Schadens durchgeführt. Dabei wurde der von Maul *et al.* etablierte Assay verwendet³⁸. In mehreren unabhängigen Versuchen konnte dabei gezeigt werden, dass auch der (6-4)-Schaden kein Substrat von *RsCryB* ist (Abbildung 4.15). Eine durch *RsCryB* katalysierte Reparaturaktivität von UV-induzierten Läsionen kann somit ausgeschlossen werden.

4.1.10. Funktionelle Analyse der postulierten Reduktionskaskade durch ortsgerechte Mutagenese

In der direkten Nachbarschaft zum katalytischen FAD finden sich zwei Tyrosine, Y387 und Y391. Der zentroidale Abstand zwischen ihnen und dem Flavin betragen 7.1 Å bzw. 7.2 Å. Die Seitenkette von Y387 nimmt dabei eine analoge Position ein, wie das flavinständige Tryptophan der kanonischen Reduktionskaskade in den meisten bisher strukturell untersuchten Photolyasen und Cryptochromen. Das Tyrosin ist, von der Sequenz her betrachtet, jedoch vollkommen unabhängig positioniert. Beachtet man den Umstand, dass *RsCryB* sich *in vitro* bereitwillig photoreduzieren lässt, muss auch in diesem neuen Vertreter eine Reduktionskaskade vorhanden sein (Abbildung 4.16).

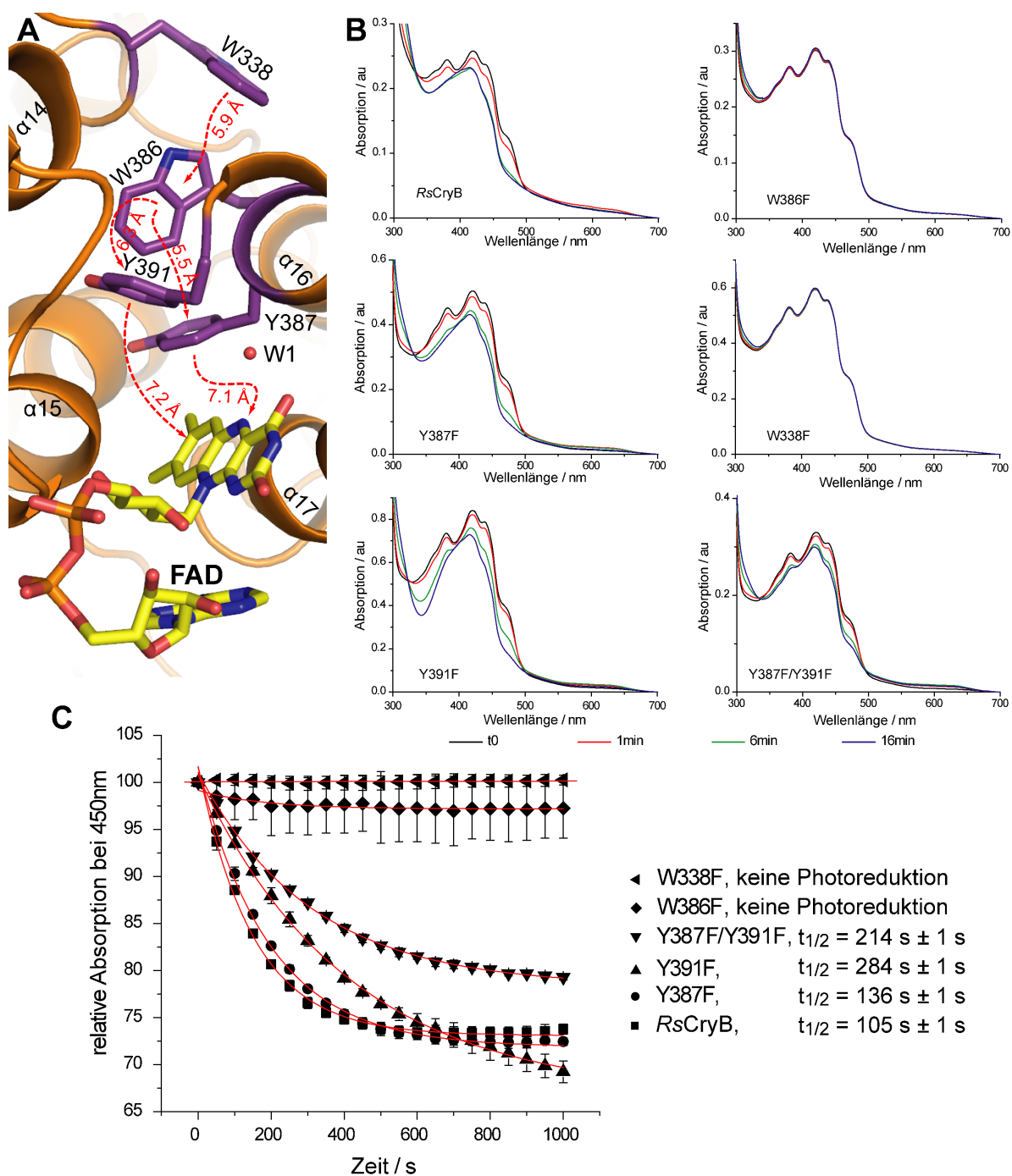


Abbildung 4.16: Analyse der postulierten Reduktionskaskade in *RsCryB*. A) Strukturelle Anordnung der involvierten, redoxaktiven Aromaten zum katalytischen Flavin mit zentroid-zentroid Abständen. B) UV/Vis-Spektren der Photoreduktionsassays. C) Verlauf der Absorption bei 450 nm über die Zeit. Während W338 und W386 essentiell für die Photoreduktion sind, haben die beiden Tyrosine Y387 und Y391 nur verlangsamenden Einfluss.

Eine Sequenzanalyse der CryPro-Familie zeigt in der C-terminalen Domäne zwei hochkonservierte Tryptophane. Diese entsprechen in *RsCryB* W386 sowie W338, welche auch in der Struktur durch ihre Nähe zu den bereits beschriebenen Tyrosinen (W386-Y387: 5.5 Å, W387-Y391: 6.3 Å) und dem geringen Abstand von 5.9 Å untereinander als potentielle

4. Ergebnisse

Kandidaten für eine solche Kaskade identifiziert wurden. Die Funktionalität der hier postulierten Reduktionskaskade wurde durch ortsgerichtete Mutagenese, nach 3.2.5 mit den in Tab. 3.5 beschriebenen Primern, untersucht. Dabei wurden die zu untersuchenden Aminosäuren W338, W386, Y387, Y391 durch Phenylalanin substituiert, sowie eine Y387F/Y391F Doppelmutante hergestellt. Phenylalanin ist in den zu erwartenden Redoxreaktionen während der Photoreduktion inert und unterbindet diese somit, falls ein beteiligter Rest ausgetauscht wurde. Die Mutanten wurden analog zum Wildtyp produziert und isoliert. Sie ließen sich alle in ausreichender Menge produzieren, so dass die Photoreduktion durch den etablierten Reduktionsassay¹⁰ nach 3.4.7 untersucht werden konnte. Dabei zeigte sich, dass der Austausch eines der beiden Tryptophane die *in vitro* Photoreduktion komplett unterbindet. Der Austausch der Tyrosine und deren Doppelmutante verlangsamte die Photoreduktion dagegen, was durch die berechneten Halbwertszeiten verdeutlicht wird. Eine graphische Zusammenfassung der Ergebnisse ist in Abbildung 4.16 gegeben.

4.1.11. Einflussnahme auf das Reduktionsverhalten durch Mutagenese an den Positionen H384 und E399

Glutamat E399 befindet sich strukturell in der analogen Position wie die funktionell wichtigen Asparagine in den Photolyasen^{10,15,30,38}, Aspartate in pflanzlichen Cryptochromen³⁴ bzw. Cysteine in tierischen Cryptochromen³⁷ (Abbildung 4.17 A). Durch gezielte Mutagenese sollte die Relevanz dieser Aminosäure für die Photoreduktion von *RsCryB* untersucht werden.

Ein weiterer interessanter Rest in diesem Zusammenhang ist Histidin H384, das eine polare Wechselwirkung mit E399 eingeht. Diese Anordnung hat Ähnlichkeit mit Protonen „pumpenden“ Anordnungen in anderen Proteinen, wie zum Beispiel die katalytische Triade von Serinproteasen¹⁴⁷, weshalb untersucht wurde, ob dies auch in *RsCryB* der Fall sein kann. Dadurch könnte zum ersten Mal in einem Mitglied der PCSf gezeigt werden, woher das Proton stammt, welches zur Protonierung des intermediären anionischen radikalischen Flavins während der Photoreduktion benötigt wird.

Um diese verschiedenen Punkte zu untersuchen, wurde Glutamat E399 durch Aspartat, Asparagin und Glutamin sowie Histidin H384 durch Phenylalanin substituiert. Der Einfluss der ausgetauschten Aminosäure wurde durch den etablierten Photoreduktionsassay analysiert.

Die angegebenen Halbwertszeiten der Photoreduktionskinetiken sind nicht als absolute Werte zu verstehen, sondern dienen vielmehr dazu die Experimente, die unter den gleichen Lichtbedingungen und ähnlichen Proteinkonzentrationen aufgenommen wurden, qualitativ vergleichen zu können (Abbildung 4.17 B). Als Grundlage für die Untersuchung diente die photochemische Analyse aus Abschnitt 4.1.3. Die Abnahme der Absorption bei 450 nm (Reduktionskinetik), als Maß für die Abnahme des oxidierten Zustandes, ließ sich für den Wildtyp durch eine monoexponentielle Zerfallsfunktion mit einer Halbwertszeit von 105 s

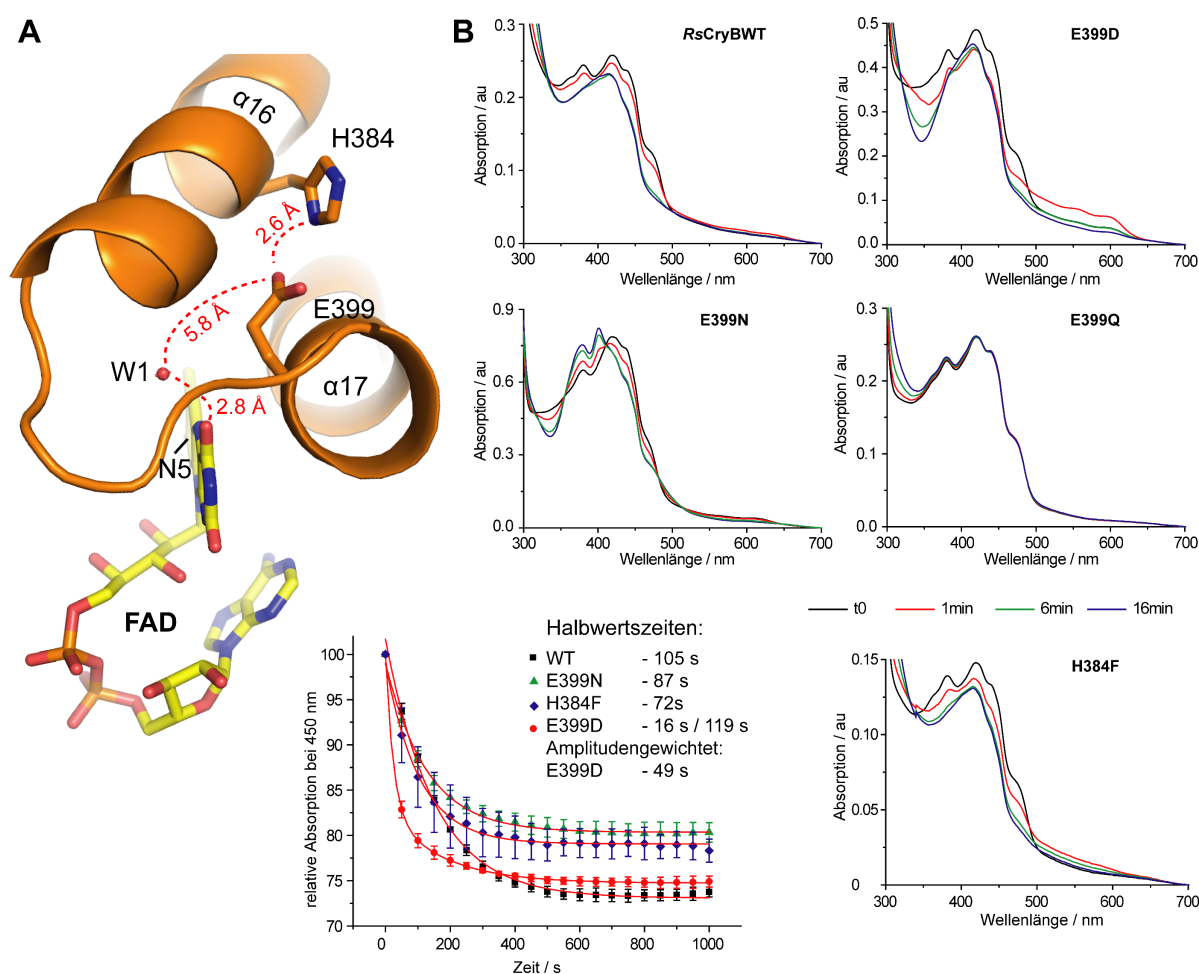


Abbildung 4.17: Übersicht des postulierten Protonenleitweges und Analyse der Mutanten im Photoreduktionsassay. A) H384 und E399 könnten als Protonenleitweg vom umgebenden Lösungsmittel über W1 zum N5-Stickstoff des Flavins fungieren. B) Analyse des RsCryB Wildtyps und der Mutanten E399D,N,Q und H394F. Alle Aminosäuresubstitutionen haben einen Einfluss auf die Photoreduktion. Wo möglich wurde die Absorptionsabnahme bei 450 nm mit einem exponentiellen Abfall genähert. Die Mutante RsCryBE399D konnte dabei nur mit zwei exponentiellen Abfällen angenähert werden. Die gefundenen Halbwertszeiten sind rechts unten angegeben. Im Fall von RsCryBE399D wurde ebenfalls eine Amplitudengewichtete mittlere Halbwertszeit berechnet.

4. Ergebnisse

annähern. Weiterhin blieb das Wildtypenzym im reduzierten Zustand stabil, so dass bei einer Inkubation über eine halbe Stunde im Dunkeln keine nennenswerte Reversion in den oxidierten Zustand beobachtet werden konnte.

Im Vergleich zum Wildtyp zeigt die Mutante, in der E399 durch Aspartat ersetzt wurde (*RsCryB*-E399D), während der Photoreduktion nach 1 min eine ausgeprägte intermediäre Absorptionzunahme mit Maxima bei 550 nm und 650 nm, was die Bildung der semichinoiden Form anzeigt. Die Kinetik der Reduktion ließ sich durch einen biexponentiellen Abfall mit Halbwertszeiten von 16 s und 119 s nähern. Das Enzym kehrte zudem rasch in höher oxidierte Zustände zurück, so dass das UV/Vis-Spektrum nach 30 min dem Spektrum vor Reduktion glich (nicht gezeigt). Die Mutante E399N zeigte im Gegensatz dazu keine vollständige Reduktion des Flavins, sondern konnte im Experiment nur bis zur anionischen-radikalischen Form des Kofaktors, mit sehr geringen Anteil des protonierten semichinoiden Zustandes, reduziert werden. Der Kofaktor kehrte in 30 min nicht wieder vollständig in die vollständig oxidierte Form zurück. Die Reduktionskinetik zeigte Merkmale eines monoexponentiellen Zerfalls mit einer Halbwertszeit von 125.7 s. Als letzte Mutante dieser Reihe wurde *RsCryB* E399Q untersucht, welche keinerlei Aktivität im Photoreduktionsassay zeigte.

Da in *RsCryB* Glutamat E399 eine polare Wechselwirkung mit Histidin H384 eingeht sollte auch untersucht werden, ob diese Aminosäure einen Einfluss auf die Photoreduktion hat. Interessanterweise konnte durch die Substitution des Histidins zu Phenylalanin (H384F) die Halbwertszeit von 105 s auf 72 s gesenkt werden. Bei genauer Betrachtung ist ebenfalls nach 1 min eine leicht erhöhte Absorption im Bereich zwischen 500 nm und 600 nm zu sehen, was ein Hinweis auf einen geringen Anteil an FADH^{\bullet} spricht.

4.1.12. Analyse der elektrostatischen Oberfläche hinsichtlich DNA-Bindung

Die putative DNA-Bindungsstelle von *RsCryB* ist durch einen Graben in der Proteinoberfläche mit positiver elektrostatischer Oberfläche gekennzeichnet, in dessen Mitte sich ein Kanal bis zum katalytischen Kofaktor erstreckt. Der Graben wird begrenzt durch die Helices $\alpha 17$ bis $\alpha 20$ der C-terminalen Domäne und durch die Helix $\alpha 7$ des Linkers sowie den hauptsächlich basischen und aromatischen Seitenketten dieser Strukturelemente. Durch die Partizipation des Linkers an der DNA-Interaktionsfläche und der dachartigen Struktur (Helix $\alpha 19/\alpha 20$) an der DNA-Interaktionsfläche wird diese und somit auch der Zugang zum FAD sterisch eingengt. Zusätzlich verläuft die Interaktionsfläche über den [4Fe-4S]-Cluster, wodurch dieser in die unmittelbare Nähe möglicher Nukleinsäure-Bindungspartner gebracht wird (siehe Abbildung 4.18). Der sterische Anspruch der Bindungsstelle erschwert möglichen UV-Läsionen den Zugang zum katalytischen Zentrum und hebt somit, zusammen mit den nicht beobachtbaren Reparaturen von (6-4)-Photoprodukten als auch CPD-Schäden, die Funktion als bakterielles Cryptochrom hervor.

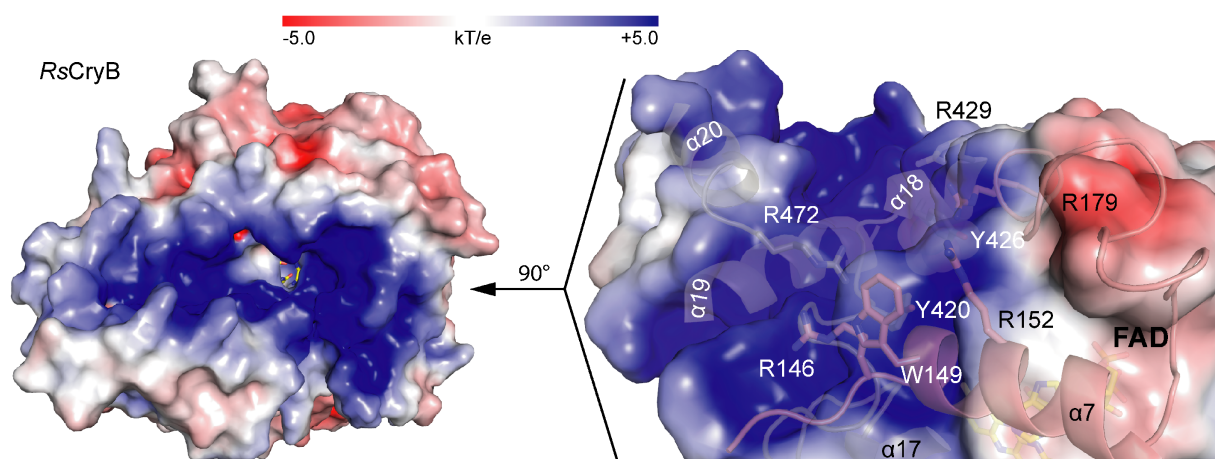


Abbildung 4.18: Ansicht des putativen DNA/RNA-Bindungsgrabens von *RsCryB*. Links: Der Kanal zum FAD sowie die basische Oberfläche ($kT/e > 0$) des Grabens ist deutlich zu erkennen. Das dachartige Strukturelement begrenzt den Graben an der unteren, linken Seite. Zusammen mit der Linkerregion (rechter Rand) engen beide Strukturelemente die Oberfläche stark ein. Rechts: In einer um 90° nach links gedrehten Ansicht sind die teilnehmenden Strukturelemente sowie einige ihrer Reste dargestellt. Im Querschnitt tritt die Verengung durch die Linkerregion ($\alpha 7$ und Umgebung) und die Helices $\alpha 19/\alpha 20$ der dachartigen Substruktur nochmals deutlich hervor.

4.2. Untersuchungen an der Klasse II CPD Photolyase aus *Methanosarcina mazei*

Der Klasse II Subtyp der CPD Photolyasen ist weit verbreitet in eukaryotischen Organismen. Allerdings ist er nicht auf diese Domäne beschränkt, sondern ist auch in Bakterien und Archaeen verbreitet. Bei einem phylogenetischen Vergleich dieser Klasse fällt auf, dass die archaealen Proteine aus dem Genus der *Methanosarcina* einen hohen Grad an Sequenzidentität zu den pflanzlichen Orthologen aufweisen.¹⁰ Daher können diese als Modellenzyme für die experimentell schwerer zugänglichen, pflanzlichen Proteine verwendet werden.¹⁰ Im Rahmen dieser Arbeit wurde zunächst die Affinität dieses Subtyps an geschädigte sowie ungeschädigte dsDNA bestimmt. Später wurde an der Etablierung eines Systems gearbeitet, dass die CPD II Photolyase aus *Methanosarcina mazei* (*MmCPDII*) zuverlässig und haltbar in den vollständig reduzierten Zustand bringt und die Proteinprobe anschließend mit der Methode des *time correlated single photon countings* (TCSPC) auf ihre photochemischen Eigenschaften hin untersuchen lässt. Die Etablierung der experimentellen Vorgehensweise sowie erste Messungen dienen als Grundlage für weitergehende Experimente, in welchen die Reparaturaktivität an komplexeren Systemen, wie z.B. Nucleosom-verpackter DNA, im Vordergrund steht.

4.2.1. Studien zur Bindung von geschädigter und intakter doppelsträngiger DNA

Die Bestimmung der Dissoziationskonstante erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. Richard Pokorny aus der Gruppe von Prof. Dr. Batschauer, FB Biologie, Philipps-Universität Marburg, welche freundlicherweise Räumlichkeiten und Gerätschaften zur Durchführung dieser Experimente zur Verfügung stellten. Im Experiment wurde fluoreszenzmarkierte dsDNA mit oder ohne zentralen CPD-Schaden¹⁴ mit verschiedenen Proteinkonzentrationen zusammengegeben. Die sich bildenden DNA-Photolyase-Komplexe wurden in einem nativen Polyacrylamidgel elektrophoretisch getrennt, wobei sich im Idealfall je nach Komplexgröße distinkte Banden ausbilden (*electrophoretic mobility shift assay*, EMSA). In der Analyse stellte sich heraus, dass die *MmCPDII* CPD-geschädigte dsDNA mit höherer Affinität bindet als ungeschädigte dsDNA (Abbildung 4.19). Die Daten wurden mit Hillmodellen¹¹⁴ angenähert. Dabei zeigte sich, dass die Bindungskurve für die unspezifische Bindung am besten mit einem Modell für vier unspezifische, kooperative Bindungsstellen

($K_{D,ns} = 455 \pm 7$ nmol/L; $n = 3.9 \pm 0.2$) angenähert werden konnte. Die spezifische Bindung dagegen ließ sich am besten nach einem gemischten Modell mit einer spezifischen Bindungsstelle und mehreren unspezifischen Bindungsstellen ($K_{D,s} = 44 \pm 12$ nmol/L; $n = 1$ sowie $K_{D,ns} = 305 \pm 27$ nmol/L; $n = 3.7 \pm 0.9$) beschreiben. Bei einer einfachen Annäherung der spezifischen Bindung erhält man eine kombinierten Dissoziationskonstante von $K_{D,s} = 141 \pm 15$ nmol/L ($n = 1.4 \pm 0.2$).

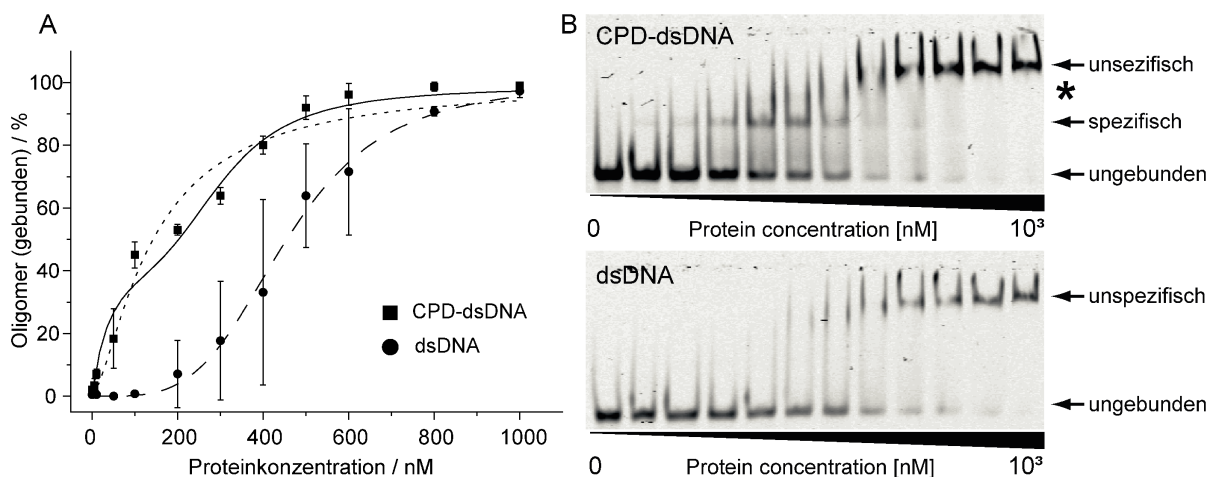


Abbildung 4.19: Übersicht zur DNA-Affinität der *MmCPDII*. *A*) Die experimentellen Daten zur Bindung ungeschädigter DNA lassen sich gut mit einer sigmoidalen Hill Funktion mit $n \sim 4$ erklären (gestrichelte Linie), während die Daten zur spezifischen Bindung mit zwei verschiedenen Modellen gut annäherbar sind. Lässt man außer Acht, dass auch bei spezifischer Bindung unspezifische Komplexe gebildet werden können, lässt sich eine Gesamtdissoziationskonstante mit einer Hill-Gleichung mit $n \sim 1$ (gepunktete Linie) bestimmen. Zieht man diese Tatsache in Betracht, lässt sich ein gemischtes Bindungsmodell anwenden und eine spezifische Dissoziationskonstante, sowie unter der Berücksichtigung eine Dissoziationskonstante des unspezifischen Komplexes bestimmen (durchgezogene Linie). *B*) Exemplarische Dokumentation eines EMSA's. Während man bei ungeschädigter DNA die kooperative Entstehung eines hochmolekularen Komplexes beobachten kann (unten), tritt bei Verwendung CPD-geschädigter DNA ein spezifischer DNA*Photolyase-Komplex auf (oben). Dieser geht mit zunehmender Proteinkonzentration in den unspezifischen Komplex über. Dabei ist die Bildung eines Zwischenkomplexes im mittleren Konzentrationsbereich sichtbar (Sternchen).

4.2.2. Rekombinante Produktion und Lagerung der *MmCPDII*

Die Klasse II CPD Photolyase aus *Methanosarcina mazei* wurde nach dem von Dr. Stephan Kiontke etablierten Protokoll rekombinant in *E. coli* überproduziert und durch IMAC und Gelfiltration isoliert¹⁰. Da die geplanten Experimente nicht im Marburger Labor, sondern an der Nanyang Technological University in Singapur durchgeführt werden sollten, wurde die Photolyase auf dem Luftweg dorthin verschickt. Um eine ausreichend lange Kühlung der Proteinproben zu gewährleisten, musste die Versendung auf Trockeneis erfolgen, weshalb das Protein in ein geeignetes Puffersystem überführt werden musste. Als beste Option stellte sich

4. Ergebnisse

der Zusatz von 50% (v/v) Glycerin heraus. Um die Pufferkapazität nicht unnötig weit herabzusetzen und das Protein erst kurz vor dem Einfrieren mit Glycerin in Kontakt zu bringen, wurde die Gelfiltration mit der doppelten Pufferkonzentration durchgeführt. Das Protein wurde anschließend äquivoluminar mit Glycerin versetzt und in flüssigen Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung bis zur Versendung erfolgte bei -80 °C.

Die *MmCPDII* wurde nach Erhalt der Proben in Singapur hinsichtlich ihres Spektrums und Reduktionsverhaltens untersucht (Abbildung 4.20). Dabei sollte vor allem sichergestellt werden, dass der vollständig reduzierte Zustand des Flavins zuverlässig erreicht werden konnte. Spektroskopisch zeigte die Photolyase nach dem Transport keinerlei Auffälligkeiten, so dass sie direkt für die weiteren Untersuchungen eingesetzt werden konnte.

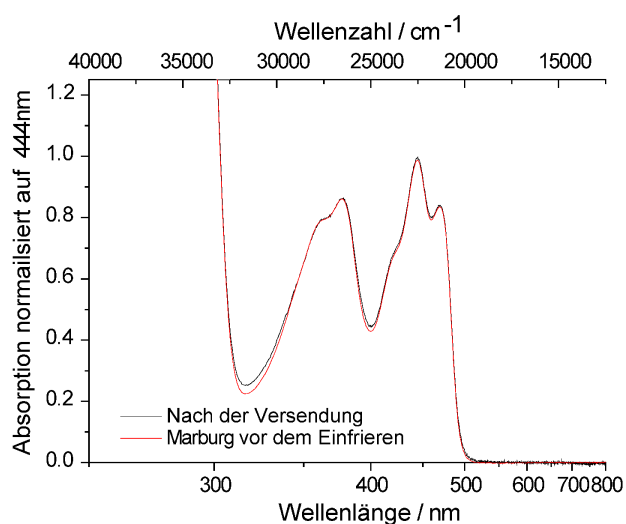


Abbildung 4.20: Vergleich des *MmCPDII* Absorptionsspektrums vor und nach dem Transport nach Singapur. Im Bereich um 300 nm ist eine minimale Zunahme der Absorption zu erkennen. Dies ist jedoch auf normale Alterung der biologischen Probe zurückzuführen und stellt keine Beschädigung durch den Transport dar. Die Probe konnte ohne Bedenken für die geplanten Experimente verwendet werden.

4.2.3. Untersuchung des vollständig reduzierten Zustandes mittels *time correlated single photon counting*

In Kooperation mit dem Labor von Prof. Maria-Elisabeth Michel-Beyerle wurden an der Nanyang Technological University (NTU) in Singapur kurzzeitspektroskopische Experimente mit der *MmCPDII* im vollständig reduzierten Zustand durchgeführt. Dabei sollte zunächst die Methodik der Probenvorbereitung optimiert und im Weiteren zwei Hauptfragestellungen experimentell beantwortet werden: Zum Einen, sollte *MmCPDII* im Temperaturbereich von 313 K – 80 K spektroskopisch charakterisiert werden. Zum Zweiten wurde die Wellenlängenabhängigkeit der Fluoreszenzemission untersucht. Die Experimente und deren

Auswertung wurden in enger Zusammenarbeit mit Dr. Reinhard Halselsberger, NTU Singapur durchgeführt. Die Werte aus den jeweiligen Näherungen sind der Übersicht halber am Ende dieses Kapitels gesondert in tabellarischer Form aufgelistet.

4.2.3.1. Ergebnisse der temperaturabhängigen Experimente

Aufgrund der großen Temperaturdifferenz, die während des Experiments überbrückt werden musste, erfolgten die Experimente für den Temperaturbereich zwischen 278 K und 80 K in einem Kryostaten, welcher durch flüssigen Stickstoff bis auf 80 K abgekühlt werden konnte. Für den Bereich von 313 K – 273 K wurde ein Aufbau mit Peltierelement gewählt. Die beiden Messbereiche überlappten sich somit bei 273 K – 278 K, wodurch die Messungen gegenseitig validiert werden konnten. Aus dem Experiment wurden die Zeitkonstanten sowie die Amplituden der zum Fluoreszenzabfall beitragenden exponentiellen Komponenten bestimmt. Die Anregungswellenlänge musste in diesem Experiment auf 400 nm festgelegt werden, da die verwendeten PMMA-Küvetten (Plastibrand, Brand) im Kryostaten bei kleineren Wellenlängen bereits eine erhebliche Absorption zeigten. Die Fluoreszenzemission wurde bei 580 nm gemessen. Während der Messungen zeigte sich, dass beim längeren Verweilen im Temperaturbereich zwischen 220 K und 180 K die Probenlösung opaque wurde, was auch beim weiteren Abkühlen bestehen blieb. Dieser Effekt ließ sich durch rasches Durchschreiten dieses Temperaturfensters beim Abkühlen umgehen, die Kühlfähigkeit des Kryostaten innerhalb von 30 min von RT auf 80 K (Herstellerangaben) zu kühlen war dabei ausreichend.

4.2.3.1.1. Ergebnisse aus dem Peltierelement-Setup

Die exponentiellen Zerfälle zeigten bei einer triexponentiellen Näherung der Messungen eine Komponente mit langer Halbwertszeit bei hoher Amplitude, eine sehr schnelle Halbwertszeit im Bereich der Instrumentenfunktion, welche mit ihrer Amplitude um $\pm 20\%$ konstant blieb, sowie eine Komponente mit mittlerer Halbwertszeit, deren Amplitude sich mit der Temperatur veränderte.

Die Lebensdauer im Zeitbereich der Instrumentenfunktion bleibt bei den betrachteten Messungen konstant und zeigt keine Temperaturabhängigkeit. Anders bei der Komponente mit der längsten Halbwertszeit. Diese zeigt einen starken Einfluss der Temperatur, so wird sie zwischen 275 K und 313 K um 29% schneller, während der Anteil an der Gesamtamplitude

4. Ergebnisse

um 20% abnimmt. Die mittlere Funktion zeigt in ihrer Lebensdauer keine Temperaturabhängigkeit, allerdings steigt der Anteil an der Gesamtamplitude von 12% auf 35% an. Im Temperaturbereich ab 298 K zeigten sich starke Sprünge in den Lebensdauern, die entgegen den vorher beobachteten Trends verliefen. Daher wurde für die folgenden, wellenlängenabhängigen Experimente eine Temperatur von 278 K gewählt. Dadurch war die Probe ausreichend stabil und es konnte das wesentlich einfachere Peltierelement-Setup verwendet werden. Die Ergebnisse sind detailliert in der oberen Hälfte von Tab. 4.2 aufgeführt.

4.2.3.1.2. Ergebnisse aus dem Kryostat-Setup

Bei Temperaturen unter 275 K wurde das Kryostatsetup verwendet. Es stellte sich heraus, dass für eine vernünftige Messreihe die Probe bis auf die tiefste Temperatur abgekühlt werden musste, um die einzelnen Messpunkte durch langsames Erwärmen zu erreichen. Auch in diesem Teil des Experiments zeigte sich eine Komponente mit langer Halbwertszeit, welche bei tiefen Temperaturen immer länger wurde. Die beobachtete mittlere Komponente fluktuierte stark, zeigte aber bei tiefen Temperaturen eine um gut 100% verlängerte Lebensdauer. Die schnelle Kinetik im Bereich der Instrumentenfunktion wies immer noch keine Temperaturabhängigkeit auf, zeigte allerdings in diesem Setup eine negative Amplitude über den gesamten Temperaturbereich. Die Ergebnisse sind detailliert in Tab. 4.2 aufgeführt und durch eine graue Hinterlegung in der Temperaturspalte gekennzeichnet.

4.2.3.2. Ergebnisse der wellenlängenabhängigen Experimente

Aufgrund der Ergebnisse aus den temperaturabhängigen Messungen wurde die Temperatur für die wellenlängenabhängigen Messung auf 278 K festgelegt. Die Probe wurde im Peltierelement-Setup mit einer Wellenlänge von 365 nm angeregt und die Fluoreszenzemission im Bereich von 430 nm - 600 nm aufgenommen. Die Näherung der experimentellen Daten wurde mit globalen Werten durchgeführt, das heißt die verwendeten Zeitkonstanten wurden für alle Messpunkte festgehalten, so dass die Modulation nur durch die Amplituden erfolgte. Als Lebensdauern der vier Komponenten wurden 3.05 ns, 0.99 ns, 0.11 ns und 0.015 ns gefunden. Die Amplituden der Lebensdauern verliefen dabei gegenläufig. Während die fraktionelle Amplitude der langlebigsten Spezies hin zum roten Bereich des Spektrums (bei längeren Wellenlängen) immer größer wurde, verkleinerten sich

die Amplituden der drei kürzerlebigen Spezies entsprechend. Die beiden mittleren Komponenten (0.99 ns und 0.11 ns) verhielten sich dabei ähnlich und ihre Amplituden sanken kontinuierlich. Die Komponente mit der kürzesten Lebensdauer, welche im blauen Bereich des Spektrums (bei kürzeren Wellenlängen) die dominierende Spezies ist (vor allem zwischen 430 nm und 470 nm), zeigte ab 500 nm eine immer stärker werdende negative Amplitude. Zur näheren Ansicht sind die Ergebnisse tabellarisch in Tab. 4.3 aufgelistet.

Zum Vergleich wurde auch eine Probe ohne Glycerin im Puffer vermessen. Auch dieses Experiment konnte mit vier exponentiellen Abfällen gefittet werden. Allerdings waren alle vier Zeiten kürzer als in der Probe mit 50 % Glycerin (2.64 ns, 0.64 ns, 0.08 ns, 0.009 ns). In diesem Experiment blieb der generelle Verlauf der Amplitudenverhältnisse gleich, allerdings zeigte sich keine negative Amplitude. Zudem wurde die Qualität des Fits bei höheren Wellenlängen immer schlechter, was sich im höheren χ^2 , dem durchschnittlichen Abstandsquadrat der Messpunkte von der idealisierten Exponentialfunktion, niederschlägt. Für die Auflistung der gefundenen Werte siehe Tab. 4.4.

Tab. 4.2: Temperatur abhängige Messungen, $\lambda_{ex} = 400 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 580 \text{ nm}$, 50% Glycerin

T [K]	A1	τ_1 [ns]	Fract. Int. %	Fract. Amp. %	A2	τ_2 [ns]	Fract. Int. %	Fract. Amp. %	A3	τ_3 [ns]	Fract. Int. %	Fract. Amp. %	χ^2	Datum
313	1850.3	2.38	74	48	1360.1	1.12	26	35	654	0.08	1	17	1054	10-09
308	1738.0	2.82	74	45	1349.6	1.21	25	35	769	0.07	1	20	1.008	10-09
303	2116.4	2.50	81	55	1043.5	1.16	18	27	671	0.09	1	18	0.981	10-09
298	1552.3	2.92	64	43	1580.9	1.50	34	44	481	0.11	1	13	1.006	10-09
293	2124.4	2.74	81	58	1014.1	1.32	19	28	509	0.10	1	14	1.010	10-09
288	2461.1	2.72	89	66	703.8	1.14	11	19	511	0.07	1	15	1.016	10-09
283	2627.9	2.81	93	71	545.3	1.01	7	15	503	0.08	1	14	1.000	10-09
278	2640.9	2.94	93	73	510.5	1.05	6	14	472	0.09	1	13	0.945	10-09
278	2564.2	2.99	92	71	565.5	1.07	7	16	461	0.09	1	13	0.974	10-09*
275	2434.1	3.34	94	58	516.2	0.94	6	12	1225	0.06	1	29	1.004	10-09
278	2258.7	3.32	87	56	807.6	1.26	12	20	90	0.11	1	24	1.061	14-09
278	2622.8	3.07	91	80	638.9	1.18	9	20	-6540	0.02	---	---	1.061	19-09
265	2724.2	3.38	96	81	622.4	0.66	4	19	-1748	0.03	---	---	1.022	14-09
245	2593.1	3.88	96	4	698	0.55	79	21	-213	0.03	---	---	1.02	14-09
170	2484.6	5.80	98	89	314.3	0.93	2	11	-1514	0.05	---	---	1.000	14-09
170	2478.9	5.82	96	85	448.2	1.23	4	15	-1532	0.10	---	---	1.049	19-09
141	2282.4	6.42	96	85	388.3	1.45	4	15	-1992	0.07	---	---	1.018	19-09
120	2017.0	7.62	92	77	596.3	2.18	8	23	-2025	0.07	---	---	1.037	19-09
100	2407.7	7.28	96	83	479.8	1.66	4	16	-2258	0.08	---	---	1.077	19-09
80	1930.3	9.16	93	79	515.9	2.41	7	21	-1998	0.05	---	---	1.013	14-09
80	1874.8	9.21	92	76	598	2.55	8	24	-807	0.09	---	---	0.988	19-09

Tab. 4.3: Globaler fit der wellenlängenabhängigen Messung, $\lambda_{ex} = 365 \text{ nm}$, $T = 278 \text{ K}$, 50% Glycerin

$\lambda_{em} [\text{nm}]$	A_1	$\tau_1 [\text{ns}]$	Fract. Int. [%]	Fract. Amp. [%]	A_2	τ_2 [ns]	Fract. Int. [%]	Fract. Amp. [%]	A_3	τ_3 [ns]	Fract. Int. [%]	Fract. Amp. [%]	A_4	τ_4 [ns]	Fract. Int. [%]	Fract. Amp. [%]	χ^2
430	463	3.05	63.0	4.5	552	0.99	24.4	5.3	1482	0.11	7.5	14.3	7870	0.015	5.1	75.9	1.058
440	473	3.05	62.3	4.6	580	0.99	24.8	5.7	1681	0.11	8.2	16.4	7520	0.015	4.8	73.3	1.064
450	847	3.05	66.2	11.5	1085	0.99	27.6	14.7	1662	0.11	4.8	22.5	3800	0.015	1.4	51.4	1.009
460	985	3.05	69.7	14.3	1088	0.99	25.0	15.8	1615	0.11	4.2	23.4	3220	0.015	1.1	46.6	1.049
470	1268	3.05	77.1	20.0	951	0.99	18.8	15.0	1505	0.11	3.4	23.7	2620	0.015	0.8	41.3	1.051
480	1737	3.05	83.5	33.6	905	0.99	14.1	17.5	1166	0.11	2.1	22.5	1370	0.015	0.3	26.4	1.071
490	2202	3.05	88.8	52.8	767	0.99	10.1	18.4	684	0.11	1.0	16.4	510	0.015	0.1	12.4	1.010
500	2427	3.05	92.0	67.5	586	0.99	7.2	16.3	580	0.11	0.8	16.1	-476	0.015	-100.0	-100.0	1.046
510	2574	3.05	93.1	71.2	533	0.99	6.3	14.8	506	0.11	0.7	14.0	-720	0.015	-100.0	-100.0	0.990
520	2573	3.05	93.8	72.7	464	0.99	5.5	13.1	504	0.11	0.7	14.2	-1520	0.015	-100.0	-100.0	1.026
530	2637	3.05	94.0	73.8	463	0.99	5.4	13.0	471	0.11	0.6	13.2	-1740	0.015	-100.0	-100.0	1.038
540	2723	3.05	94.3	76.1	461	0.99	5.2	12.9	396	0.11	0.5	11.1	-1210	0.015	-100.0	-100.0	1.053
570	2747	3.05	94.6	76.2	435	0.99	4.9	12.1	424	0.11	0.5	11.8	-2080	0.015	-100.0	-100.0	1.004
560	2786	3.05	94.8	78.9	431	0.99	4.8	12.2	315	0.11	0.4	8.9	-1190	0.015	-100.0	-100.0	0.982
570	2705	3.05	94.9	77.7	406	0.99	4.6	11.7	372	0.11	0.5	10.7	-1460	0.015	-100.0	-100.0	0.992
580	2746	3.05	94.7	76.2	421	0.99	4.7	11.7	438	0.11	0.6	12.2	-2150	0.015	-100.0	-100.0	1.001
600	2730	3.05	94.5	77.1	449	0.99	5.1	12.7	360	0.11	0.5	10.2	-2230	0.015	-100.0	-100.0	0.970

Tab. 4.4: Globaler fit der wellenlängenabhängigen Messung, $\lambda_{ex} = 365 \text{ nm}$, $T = 278 \text{ K}$, kein Glycerin

$\lambda_{em} [\text{nm}]$	A_1	$\tau_1 [\text{ns}]$	Fract. Int. [%]	Fract. Amp. [%]	A_2	τ_2 [ns]	Fract. Int. [%]	Fract. Amp. [%]	A_3	τ_3 [ns]	Fract. Int. [%]	Fract. Amp. [%]	A_4	τ_4 [ns]	Fract. Int. [%]	Fract. Amp. [%]	χ^2
430	275	2.67	58.8	1.4	474	0.64	24.3	2.4	568	0.08	3.8	2.9	18390	0.009	13.1	93.3	1.023
440	468	2.67	65.4	2.9	691	0.64	23.1	4.2	1126	0.08	4.9	6.9	14150	0.009	6.6	86.1	1.096
450	504	2.67	63.5	3.3	83	0.64	26.6	5.9	1185	0.08	4.6	7.9	12510	0.009	5.2	83.0	1.070
500	2421	2.67	94.3	26.8	495	0.64	4.6	5.5	293	0.08	0.4	3.2	5830	0.009	0.8	64.5	1.057
510	2508	2.67	95.0	27.6	435	0.64	4.0	4.8	272	0.08	0.3	3.0	5880	0.009	0.74	64.7	1.046
540	2784	2.67	95.5	45.7	508	0.64	4.2	8.3	27	0.08	0.03	0.5	2770	0.009	0.3	45.5	1.032
580	2758	2.67	95.9	50.9	433	0.64	3.6	8.0	251	0.08	0.3	4.6	1980	0.009	0.2	36.5	1.130

4.3. Untersuchungen zur (6-4)-Photolyase aus *Dunaliella salina*

Im Vorfeld dieser Arbeit wurden erste Arbeiten zur (6-4)-Photolyase der Grünalge *Dunaliella salina* (*Ds*(6-4)) bereits von Dr. Claudia Schröder durchgeführt. Sie konnte dabei in ihrer Dissertation zeigen, dass das Circular Dichroismus (CD) Spektrum dieser Photolyase, im fern-UV- und nah-UV-Bereich abhängig vom Oxidationszustand des katalytischen FAD ist.⁶⁸ Während die Änderung im nah-UV auf lokale Änderungen in der Chromophorumgebung, z.B. durch die Änderung des Dipolmoments in den verschiedenen Oxidationszuständen zurückzuführen ist, führte sie die Änderung im fern-UV auf eine deutliche Mobilität in der Sekundärstruktur zurück. So ändere sich im Falle der *Ds*(6-4) der α -helikale Anteil an der Gesamtsekundärstruktur. Dies lässt vermuten, dass dieses Protein zwei Funktionen haben könnte: Neben des *in vivo* gezeigten Einflusses auf die Photoreaktivierung¹⁴⁸ könne es auch Teil eines redoxpotential- oder lichtabhängigen Signalweges sein. In diesem Zusammenhang wurde von Dr. Schröder postuliert, dass der lange C-Terminus dieses Proteins für das veränderliche CD-Spektrum zu verantworten ist.

4.3.1. Identifizierung des nativen Antennenchromophors der *Ds*(6-4)

In Sequenzabgleichen der *Ds*(6-4) mit der *AnCPDI*¹⁵ fiel auf, dass Reste welche in der letzteren für die Bindung des Antennenchromophors 8-HDF zuständig sind, auch im ersteren Enzym konserviert sind. Des Weiteren wurde von Glas *et al.* 2009 veröffentlicht, dass 8-HDF der native Antennenchromophor in der *Drosophila melanogaster* (6-4)-Photolyase ist.¹⁴⁹ Ein partielles Sequenzalignment dieser drei Proteine ist in Abbildung 4.21 dargestellt. Die rekombinant in *E. coli* produzierte *Ds*(6-4) enthielt kein 8-HDF, da der Expressionsstamm dieses nicht produzieren kann. Daher wurde mittels Mikrodialyse die Bindung des Deazaflavins an rekombinant produzierte *Ds*(6-4) getestet. Dabei wurde erstens 8-HDF im Verhältnis 1.1:1 zu einer *Ds*(6-4)-Lösung gegeben und >20 h gegen Puffer dialysiert (Probe 1, Abbildung 4.22), zweitens eine *Ds*(6-4)-Lösung für 20 h gegen eine 8-HDF haltige (doppelte Proteinstoffmenge) Pufferlösung dialysiert (Probe 2, Abbildung 4.22) und drittens die daraus erhaltene Lösung wieder >20 h gegen Puffer dialysiert (Probe 4, Abbildung 4.22). Als Negativkontrolle diente dabei *Ds*(6-4) (Probe 3, Abbildung 4.22), BSA und reiner Puffer und als Positivkontrolle eine Probe der *MmCPDII*.

4. Ergebnisse

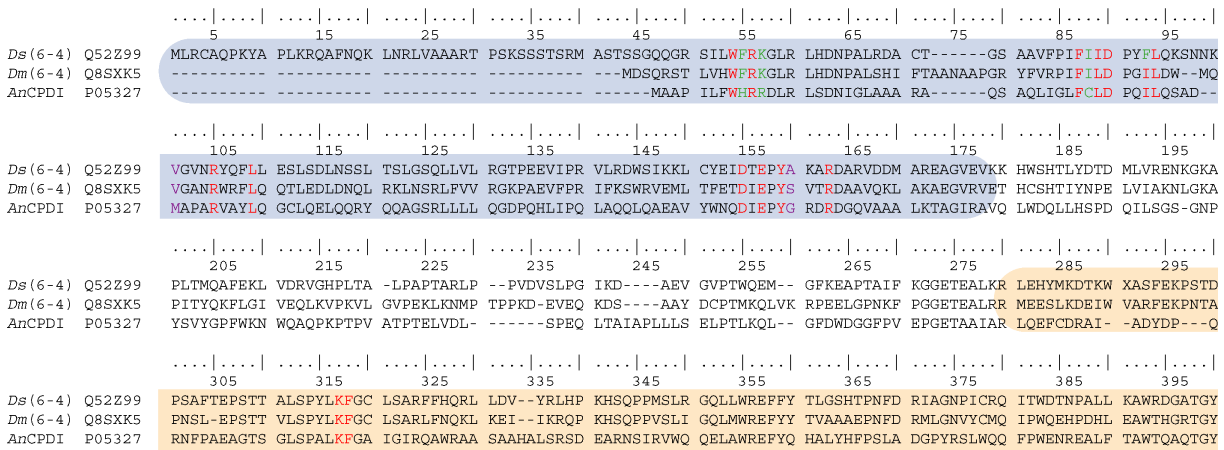


Abbildung 4.21: Paarweises Sequenzalignment der Ds(6-4), Dm(6-4) und AnCPDI. Die Zugriffs-codes für die Uniprot Datenbank, mit deren Hilfe auch das Alignment erstellt wurde, sind in der Abbildung angegeben.¹⁴ Aus der AnCPDI Kristallstruktur (1QNF) wurden an der 8-HDF Bindung beteiligte Reste identifiziert und in der Sequenz farblich markiert. Konservierte Reste wurden dabei rot, ähnliche AS grün und nicht verwandte AS violett eingefärbt. Der Großteil der Bindungstasche wird von der N-terminalen Domäne (blaue Hinterlegung) gebildet. Der für die Stabilisierung des deprotonierten 8-HDFs wichtige Rest K248, sowie die Aminosäure F249 aus der katalytischen Domäne (orange Hinterlegung) sind auch konserviert.

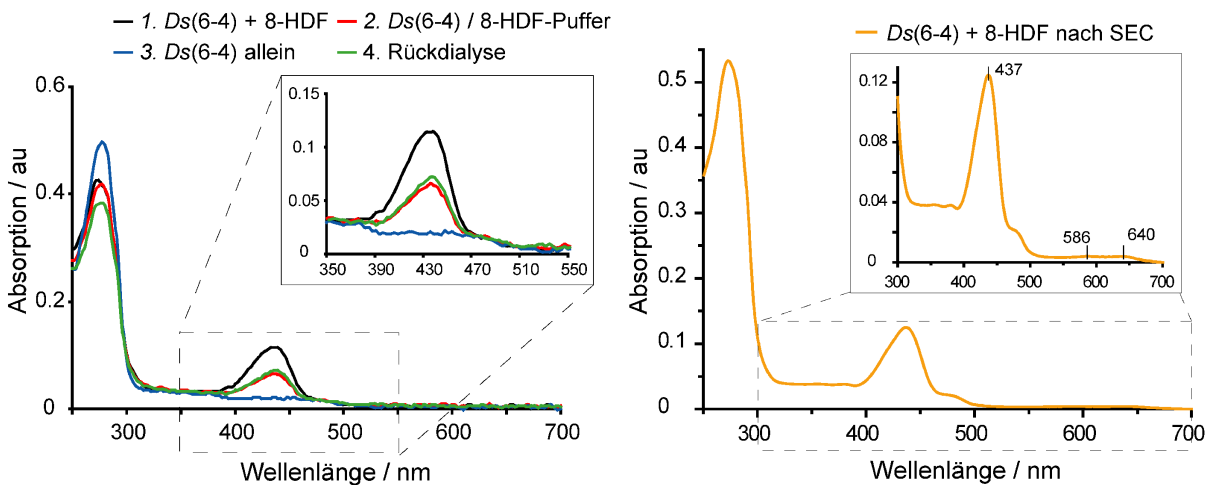


Abbildung 4.22: Spektroskopische Analyse der 8-HDF Bindung an die Ds(6-4). Rechts: In der Mikro dialyse zeigte sich die spezifische Bindung, angezeigt durch die Absorption bei 437 nm, von 8-HDF an die Ds(6-4), welche auch nach über 20 h Dialyse gegen Puffer bestehen blieb. Links: Die Ds(6-4) wurde mit dem Helferplasmid zur 8-HDF Produktion coproduziert. Nach IMAC und SEC zeigte sich eine Absorption bei 437 nm, welche die FAD-Feinstruktur überlagert. Die Absorption bei 586 nm und 640 nm weist auf FAD im semichinoiden Oxidationszustand hin. Der Peak bei 437 nm zeigt eindeutig proteingebundenes und deprotoniertes 8-HDF an.^{15,16}

In allen Experimenten konnte die Bindung des Deazaflavins durch ein spezifisches Absorptionsmaximum von proteingebundenem 8-HDF bei 435 nm gezeigt werden.¹⁶ Abschließend wurde das in der AG Essen entwickelte Helferplasmid zur Produktion von

8-HDF⁶⁹ in *E. coli* mit pET28a-*Ds(6-4)* coexprimiert. Die in diesem Experiment erzeugte *Ds(6-4)* zeigte nach IMAC und Gelfiltration immer noch ein starkes Absorptionsmaximum bei 435 nm (siehe Abbildung 4.22 rechts) wodurch die Bindung von 8-HDF an die *Ds(6-4)* auch *in vivo* gezeigt werden konnte.

4.3.2. Die *D. salina* (6-4) repariert das (6-4) Pyrimidin-Pyrimidon Photoprodukt *in vitro*

Die Reparaturaktivität der *Ds(6-4)* hinsichtlich DNA-Photoschäden konnte nur *in vivo* gezeigt werden.¹⁴⁸ Es gab zwar Hinweise auf die Reparatur des (6-4)-Schadens, dies konnte jedoch nicht zweifelsfrei bestätigt werden. Daher wurde in Zusammenarbeit mit Korbinian Heil, aus der Gruppe von Prof. Carell, LMU München der von Maul *et al.* etablierte *in vitro* Assay zur Reparatur des (6-4)-Schadens mit der *Ds(6-4)* durchgeführt.³⁸ In unabhängigen Messreihen mit passenden

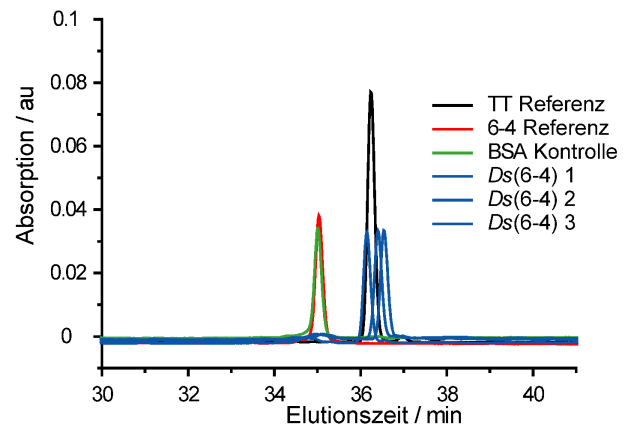


Abbildung 4.23: Analyse des (6-4)-Reparaturassays der *Ds(6-4)*. In drei unabhängigen Experimenten ist die Reparaturaktivität der *Ds(6-4)* eindeutig zu erkennen. Der Assay wurde in Kooperation mit Korbinian Heil, AG Carell, Ludwig-Maximilians-Universität München durchgeführt.

Negativkontrollen (BSA, *RsCryB*) sowie der (6-4)-Photolyase aus *Drosophila melanogaster*, produziert nach Maul *et al.*³⁸, konnte gezeigt werden, dass die *Ds(6-4)* zumindest einzelsträngige DNA mit (6-4)-Photoprodukt repariert (Abbildung 4.23) und somit funktionell als (6-4)-Photolyase einzuordnen ist. Trotzdem ist eine zusätzliche, vermutlich lichtabhängige regulatorische Funktion der *Ds(6-4)* *in vivo* nicht ausgeschlossen, zumal das Enzym homolog zum *dual function* Cryptochrom (vergleiche Abschnitt 1.6.5) *aCry* aus *C. reinhardtii* ist.

4.3.3. Optimierung des Expressionskonstruktes für die Kristallisation.

Bei einer Sequenzanalyse fällt auf, dass die *Ds(6-4)* im Vergleich zu anderen Photolyasen verlängerte N- und C-Termini aufweist. Dies kann zu Problemen bei der Kristallisation führen, wenn diese Extensionen strukturell ungeordnet bzw. flexibel sind. Im vorhergehenden Abschnitt wurde dargelegt, dass sich der Sekundärstrukturgehalt des Proteins je nach

4. Ergebnisse

Oxidationszustand des FAD ändert, was als strukturelle Flexibilität eingestuft werden kann. Aufgrund dessen wurden die Termini genauer untersucht, um verbesserte Resultate in Kristallisationsexperimenten zu erhalten.

Bei einer servergestützten Analyse des N-Terminus auf Signalpeptide zeigte die Ausgabe eine putative Lokalisierungssequenz an. Diese Sequenz erstreckte sich über die ersten 47 Aminosäuren, so dass eine Mutante geplant wurde, welche den N-Terminus bis Aminosäure G48 deletiert (*Ds(6-4)N-G48*). Der C-Terminus wurde ausgehend von einem Strukturmodell basierend auf der (6-4) Photolyase aus *Arabidopsis thaliana* (3FY4)³⁹ und dessen Vergleich mit der CPD I Photolyase aus *E. coli* (1DNP)³⁰ auf zwei verschiedene Längen gekürzt. In der längeren Variante (*Ds(6-4)S562-C*) wurde der C-Terminus in Analogie zur *At(6-4)* ab Aminosäure S562 entfernt, in der kürzeren Variante (*Ds(6-4)G540-C*) wurde das Konstrukt, in Anlehnung an die *EcCPDI*, um die C-terminale Helix des Strukturmodells gekürzt. Alle Konstrukte sind N-Terminal mit dem His₆-Tag des pET28a-Vektorsystems fusioniert.

Durch Elisabeth Ignatz konnten Reinigungsprotokolle für die Deletionsmutante *Ds(6-4)N-G48* und *Ds(6-4)G540-C* etabliert werden. Die beiden Proteine wurden mit einer Ausbeute von jeweils ca. 5 mg/L Kultur erhalten. Die biochemische Charakterisierung, Kristallisationsexperimente dieser beiden Mutanten sowie Produktion und Reinigung der *Ds(6-4)S562-C* anderen sind geplant.

5. Diskussion

5.1. Das Cryptochrom B aus *Rhodobacter sphaeroides*

Cryptochrom B aus *Rhodobacter sphaeroides* (*RsCryB*) kann eindeutig als erster strukturell beschriebener Vertreter einer neuen Klasse von bakteriellen Photorezeptoren, den proteobakteriellen Cryptochromen (CryPro), der Photolyase/Cryptochrom-Superfamilie (PCSf) zugeordnet werden. Neben den kanonischen Vertretern dieser Proteinsuperfamilie, die bereits Ende des letzten Jahrtausends strukturell charakterisiert wurden, ist mit der neuen CryPro-Familie eine weitere, unerwartet neuartige Gruppe von Blaulicht-abhängigen Signalproteinen entdeckt worden. Die strukturelle Verwandtschaft der PCSf mit Untereinheiten von eukaryontischen Primasen wird durch den in der CryPro-Familie intrinsisch gebundenen [4Fe-4S]-Cluster noch weiter verdeutlicht. Eine weiter gehende Untersuchung in diese Richtung erscheint vielversprechend, da *RsCryB* unter anderem mit einzelsträngigen Nukleinsäuren interagiert⁸⁸, dem Substrat von Primasen¹⁵⁰. Der phylogenetische Baum der PCSf lässt dabei keine besonders enge Verwandtschaft mit einer der anderen Familien erkennen, da die CryPro-Familie in etwa gleich weit von allen anderen Mitgliedern entfernt ist und ähnlich niedrige Sequenzidentitäten aufweist.

Im Folgenden soll nun detailliert auf die besonderen Aspekte der neuen CryPro-Familie, am Beispiel des hier vorgestellten *RsCryB*, seines bisher am besten charakterisierten Vertreters, eingegangen werden.

5.1.1. Cryptochrom B aus *Rhodobacter sphaeroides*, ein Repräsentant der CryPro-Familie

In der phylogenetischen Analyse zeigt sich die CryPro-Familie als distinkte Gruppe innerhalb der PCSf. In paarweisen Sequenzvergleichen stellt sich *RsCryB* dabei als typischer Vertreter der neuen Familie dar (vergleiche 4.1.1, Alignment 7.3). So weisen alle Mitglieder der CryPro-Familie den gleichen domänenartigen Aufbau, wie für *RsCryB* gefunden, auf. Dabei ist die N-terminale DPRP-Domäne (PF04244, AS L1-L123) mit einer FAD-7-Domäne (PF03441, AS R227-V508) über einen Linker (AS P124-D226) verknüpft. Die FAD-7-Domäne ist typisch für alle Mitglieder der PCSf und bindet den katalytischen

5. Diskussion

Kofaktor FAD.^{24,40} So sind auch in der CryPro-Familie für die FAD-Bindung essentielle Strukturelemente, wie die Salzbrücke zwischen R365 und D393 in *RsCryB*, konserviert. Die CryPro-Familie weist jedoch am C-Terminus gegenüber anderen Mitgliedern der Familie ein deutlich verändertes Faltungsmuster, das dachartige Strukturelement (S431-V508), auf. In diesem Strukturmotiv wird der intrinsische Eisen-Schwefel-Cluster gebunden, welcher aus keiner anderen Subklasse bekannt ist.

Die N-terminale DPRP-Domäne, welche ebenfalls für die CryPro-Familie typisch ist, weist einige hoch konservierte Bereiche auf (AS 4-12; 53-56; sowie diverse einzelne AS), die alle im Bereich der Lumazin-Bindungstasche liegen. Die N-terminale Bindung von 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin (DLZ) als Chromophor ist daher wahrscheinlich in der gesamten CryPro-Familie konserviert, was auf seine funktionelle Relevanz hindeutet, aber an späterer Stelle diskutiert werden soll. Diese konservierten Struktur motive können durch einen ConSurf-Plot¹⁵¹, welcher auf einem paarweisen Sequenzalignment der CryPro-Familie basiert, verdeutlicht werden. Die Konservierung um die drei *hot spots* herum (Antennenchromophor, katalytischer Chromophor und [4Fe-4S]-Cluster) ist dabei explizit zu erkennen (siehe Abbildung 5.1). Dabei zeigt sich vor allem im Kernbereich um das FAD und den [4Fe-4S]-Cluster die höchste Konservierung. Auch die Helices des dachartigen

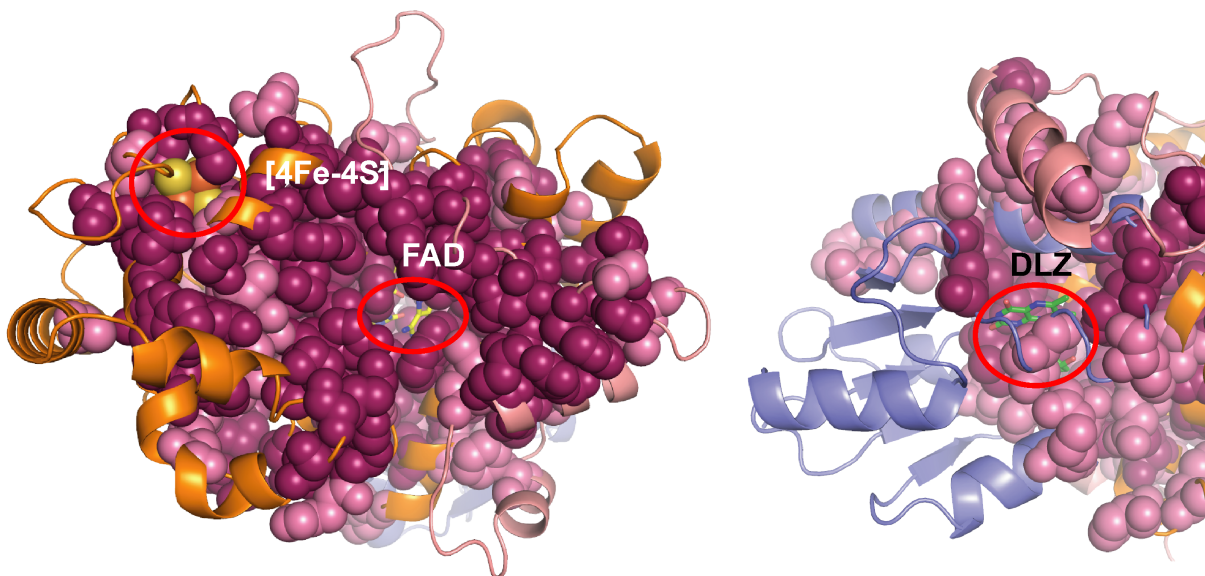


Abbildung 5.1: Die ConSurf-Analyse der CryPro-Familie projiziert auf die Struktur von *RsCryB* (3ZXS). Dabei wurden nur die beiden höchsten Konservierungsschalen der Analyse (rot höchste Konservierung, hellrot zweithöchste Konservierung) verwendet. Links: Der Kernbereich der katalytischen Domäne zeigt eine außerordentliche hohe Konservierung. Ebenso ist die direkte Umgebung des [4Fe-4S]-Clusters in der CryPro-Familie konserviert. Rechts: Im Vergleich zur katalytischen Domäne weist die DPRP-Domäne eine weniger starke Konservierung der Sequenz auf. Die Bindungstasche des DLZ ist davon jedoch ausgenommen. Ihr Konservierungsgrad ist vergleichbar mit der FeS-Umgebung.

Strukturelements um den FeS-Cluster zeigen eine signifikante Konservierung der Primärsequenz, was auf eine mögliche Funktion in der Signalrezeption, Signalverarbeitung oder Partnerinteraktion schließen lässt.

Im Laufe dieser Arbeit wurde von Oberpichler *et al.* 2011 ein weiterer Vertreter der CryPro-Familie publiziert, das PhrB aus *Agrobacterium tumefaciens* (*AtPhrB*), dessen biochemischen Charakteristika analog zu denen von *RsCryB* sind, allerdings wurde keine biologische Funktion von *AtPhrB* veröffentlicht.¹⁴⁴

In dieser Arbeit konnte die erste Struktur eines bakteriellen Cryptochroms aus der CryPro-Familie aufgeklärt und viele neuartige Eigenschaften sowie Motive dieser nicht kanonischen Familie innerhalb der PCSf abgeleitet werden.

5.1.2. Eine Tryptophandiade als Elektronentransferweg in der CryPro-Familie

RsCryB weist im Gegensatz zu allen bisher strukturell charakterisierten Mitgliedern der Cryptochrom/Photolyase-Superfamilie kein Tryptophan in unmittelbarer Umgebung zum katalytischen FAD auf (Abbildung 5.2).^{10,15,30,34,35,37-39} Vielmehr konnten zwei Tyrosine (Y387, Y391) und zwei Tryptophane (W338, W386) in direkten Zusammenhang mit der Photoreduktion von *RsCryB* gebracht werden. Dabei stellten sich die beiden Tryptophane in biochemischen *in vitro* Studien als essentiell heraus wohingegen der Austausch der Tyrosine gegen unreaktive Phenylalanine zu mehr oder weniger starken Aktivitätsverlusten in der Photoreduktion führte. In *RsCryB* liegt also eine für die Photoreduktion *in vitro* essentielle Tryptophandiade vor. Die beiden untersuchten Tyrosine stellten sich in der Mutagenesestudie dabei als Effizienzverstärker dar (siehe 4.1.10). Die Halbwertszeiten sowie die gemessene Aktivitäten sind in Tab. 5.1 dargestellt. Interessanterweise hat Y391 einen stärkeren Einfluss auf die Photoreduktion als Y387 oder die doppelte Substitution an den Positionen der beiden Tyrosine. Dies könnte an der Ausrichtung der beiden Seitenketten zum Flavin liegen, da der Winkel zwischen den an einem Elektronentransfer beteiligten Orbitale zueinander mitbestimmend für die Effizienz des Transfers ist. Die Entfernung der an dieser Reduktionskaskade beteiligten AS ist dabei vergleichbar mit den identifizierten Tryptophantriaten bzw. -diaden aus dem kanonischen Strukturtyp und der Klasse II CPD-Photolyase.

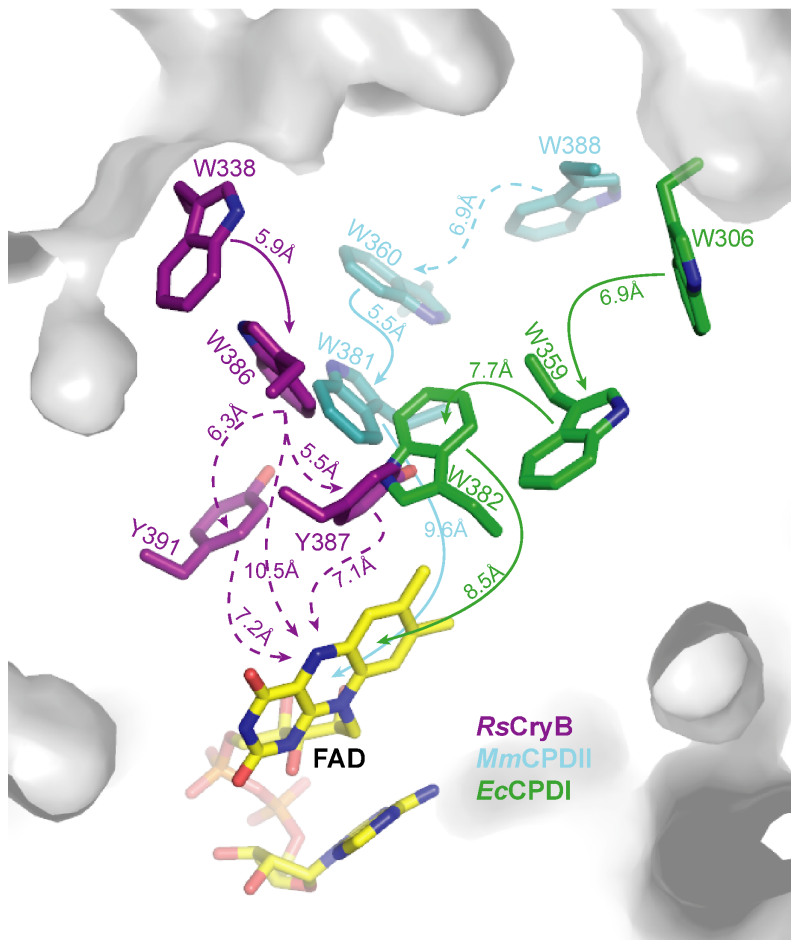


Abbildung 5.2: Die drei bekannten Reduktionskaskaden in der PCSf. RsCryB (3ZXS, violett) besitzt eine essentielle Tryptophandiade (W338, W386), die sich zum FAD hin über zwei verstärkend wirkende, jedoch nicht essentielle Tyrosine verzweigt. Auch die MmCPDII (2XRY, blau) weist eine essentielle Tryptophandiade auf (W360, W381), diese ist jedoch zur Oberfläche hin verzweigt. Ein „Zubringerrest“ (W388) ist gezeigt. Die kanonische Tryptophantriade, hier am Beispiel der EcCPDI (1DNP, grün) dargestellt, speist das FAD *in vitro* über drei konservierte Tryptophane mit Elektronen. Die gezeigten Entfernungangaben beziehen sich auf die Zentroid-Zentroid Abstände. Gestrichelte Linien weisen auf mögliche Verzweigungspunkte in der Reduktionskaskade hin.

Zusammen mit der bekannten kanonischen Tryptophantriade aus EcCPDI³⁰, AnCPDI¹⁵ oder AtCry3⁶⁵ sowie der 2011 beschriebenen Triade in der MmCPDII¹⁰, ist der hier beschriebene Weg die nun die dritte bekannte Elektronentransferroute während der Photoreduktion von Cryptochromen oder Photolyasen (Abbildung 5.2, vergleiche Abbildung 5.7 oben). Auch wenn *in vivo* Daten teilweise gegen die Verwendung dieses Weges für die Photoreduktion innerhalb der lebenden Zelle sprechen (EcCPDI¹⁵² und AtCry2¹⁵³), verdeutlicht sich die Bedeutung des Weges dadurch, dass er auf unterschiedlichen, strukturellen Elementen unabhängig voneinander bereitgestellt wird.

Tab. 5.1: Halbwertszeiten sowie Aktivität des *RsCryB* Wildtyps sowie der Mutanten in der Photoreduktionskaskade im Photoreduktionsassay.

Mutante	Halbwertszeit [s]	Aktivität
Wildtyp	105	100%
W338F	---	0%
W386F	---	0%
Y387F	136	77%
Y391F	284	37%
Y387FY391F	214	64%

5.1.3. Ein Oxo-Ligand ist für die Photoreduktion von *RsCryB* unabdingbar

In allen bisher bekannten redoxaktiven Flavoproteinen werden die Oxidationsstufen des katalytischen Kofaktors, sei es FMN oder FAD, durch spezifische Wechselwirkungen mit dem Protein stabilisiert.^{8,24} Die Wechselwirkung kann dabei über Seitenketten oder über das Peptidrückgrat realisiert werden. In den bisher bekannten Mitgliedern der PCSf erfolgt die Stabilisierung des N5-Stickstoffs durch Wasserstoffbrückenbindung zu konservierten Aminosäuren.^{10,15,30,34,35,37-39} Auch in *RsCryB* ist der N5-Stickstoff des Flavins durch Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert (Abbildung 5.3); allerdings in diesem Fall weder durch eine Seitenkette oder das Peptidrückgrat, sondern durch ein strukturell gebundenes Wassermolekül, welches durch Wechselwirkung mit dem Carbonyl von Y387 passend positioniert wird. Wasser W1 nimmt relativ zum N5-Stickstoff eine vergleichbare Position wie die Seitenketten der anderen Mitglieder der PCSf ein. Bei den zur DNA-Reparatur befähigten Mitgliedern wie CPDI-, CPDII-, (6-4)-Photolyasen sowie DASH-Cryptochromen wechselwirkt ein in der jeweiligen Klasse konserviertes Asparagin mit dem Stickstoff.^{10,15,30,35} Durch die neutrale funktionelle Gruppe wird dabei die Fähigkeit zur vollständigen Reduktion des Kofaktors sichergestellt.¹⁵⁴ In den pflanzlichen Cryptochromen hingegen ist der N5-Stickstoff durch den Säurerest eines Aspartats gebunden.³⁴ Durch diesen Liganden wird das Redoxpotential des Flavins soweit verändert, dass der radikalische Signalzustand akkumuliert werden kann und eine schnelle Deaktivierung in den oxidierten Zustand sichergestellt wird.²⁴ Im Cryptochrom aus *D. melanogaster* übernimmt die Thiolgruppe eines

5. Diskussion

Cysteins die Rolle des oben angesprochenen Asparagins/Aspartats. Dabei verbleibt das Flavin in der anionischen radikalischen Form, wobei die negative Ladung durch das neutrale Thiol stabilisiert wird.³⁷

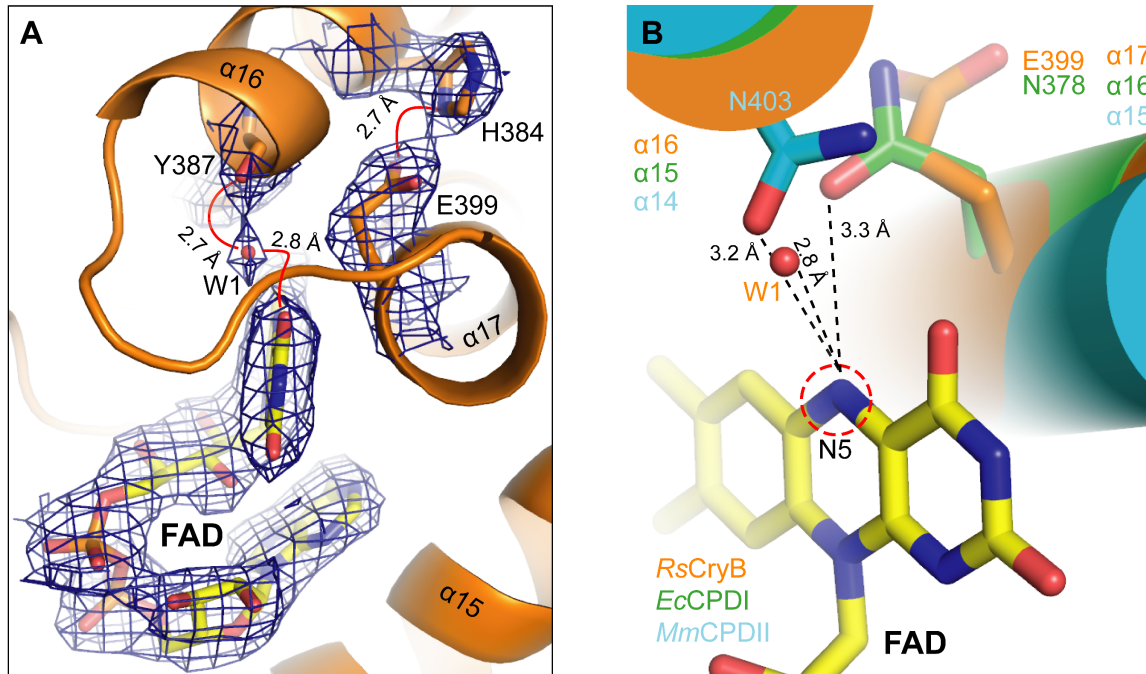


Abbildung 5.3: Der N5-Stickstoff von RsCryB wird durch ein Wassermolekül stabilisiert. A: Wassermolekül W1 ist in der 2F_o-F_c-Karte (Konturierungsgrad 1σ) gut definiert und wird durch den Carbonylsauerstoff von Y387 positioniert. Es befindet sich in Wasserstoffbrückenbindungsabständen zum N5-Stickstoff des Flavins. E399 zeigt vom katalytischen Kofaktor weg und interagiert mit dem oberflächenexponierten H384. B: Wassermolekül W1 übernimmt im Vergleich mit dem kanonischen Photolyase/Cryptochrom-Typ, stellvertretend durch die EcCPDI (1DNP, grün) dargestellt, und der MmCPDII (2XRY, blau) die Aufgabe einer Aminosäureseitenkette und interagiert polar mit dem N5-Stickstoff des katalytischen Flavins. Die Position ist vergleichbar mit denen der Sauerstoffatome der Säureamide der gezeigten Photolyasen. Glutamat E399 ist in der Struktur von RsCryB nicht richtig positioniert, um diese Aufgabe zu übernehmen.

Die Photoreduktion der Wildtypform von RsCryB ist in einer Hinsicht besonders auffällig. Es wird intermediär nahezu keine neutrale radikalische Form akkumuliert, das Protein lässt sich jedoch effizient vollständig reduzieren (siehe 4.1.11). Dies deutet auf einen raschen zweiten Elektronentransfer nach der initialen Photoreduktion hin, so dass die intermediär auftretende semichinoide Form im stationären Zustand eines UV/Vis-Spektrums nicht sichtbar wird. Durch Mutagenese an Glutamat E399 konnte dieser Vorgang stark beeinflusst werden. Der Austausch zu den Aminosäuren Aspartat, Asparagin und Glutamin zeigte, dass E399 wichtig für die Photochemie von RsCryB ist, obwohl die funktionelle Gruppe der Seitenkette, im

oxidierten Zustand von *RsCryB*, vom FAD weggerichtet ist und mit H384 interagiert. Die Halbwertszeiten sowie Aktivitäten in der Photoreduktion der einzelnen Mutanten sind zusammen mit *RsCryB* in der unten stehenden Tab. 5.2 aufgelistet.

Tab. 5.2: Halbwertszeiten sowie Aktivität des *RsCryB* Wildtyps sowie der Mutanten an Position 399 im Photoreduktionsassay.

Mutante	Halbwertszeit [s]	Aktivität
Wildtyp	105	100%
H384F	72	146%
E399N	87	121%
E399D	49*	214%
E399Q	---	0%

* Die Messwerte aus dem Photoreduktionsassay der Mutante *RsCryB-E399D* werden besser mit zwei exponentiellen Abfällen angenähert. Der angegebene Wert ist ein amplitudengewichteter Wert aus den beiden Funktionen mit Halbwertszeiten von 119 s und 17 s.

Durch den Austausch von E399 zu Asparagin ist die Proteinumgebung offensichtlich nicht mehr in der Lage, den katalytischen Kofaktor während der Photoreduktion zu protonieren, wodurch die Reduktion beim anionischen Radikal stoppt. Das Radikal kann dabei an seinen typischen Maxima im Absorptionsspektrum bei 378 nm und 401 nm identifiziert werden.¹⁴⁹ Das Auftreten von mehreren isobestischen Punkten (313 nm, 355 nm, 410 nm, 482 nm, 513 nm) deutet zusätzlich daraufhin, dass das System nur zwischen zwei distinkten spektroskopischen Zuständen wechselt (vergleiche 4.1.11). Durch ein Aspartat an Position 399 wird die semichinoide Form FADH^{\cdot} stark stabilisiert, so dass sie im Gegensatz zum Wildtyp spektroskopisch detektiert werden kann, wie durch die auftretenden Maxima bei 550 nm und 595 nm deutlich zu erkennen ist.⁷⁷ Glutamin schließlich scheint die empfindliche Anordnung um den N5-Stickstoff derart zu stören, dass überhaupt keine Photoreduktion mehr stattfindet. Durch die Substitution von Histidin H384 zu Phenylalanin wird die Interaktion mit E399 unterbunden, wodurch die Seitenkette mobiler werden sollte und durchaus mit dem N5-Stickstoff interagieren könnte. Dies könnte die Beobachtung erklären, dass sich *RsCryBH384F* ähnlich zu *RsCryBE399D* verhält. Bei beiden Mutanten wird die Reduktionsgeschwindigkeit deutlich gesteigert und FADH^{\cdot} gebildet.

5. Diskussion

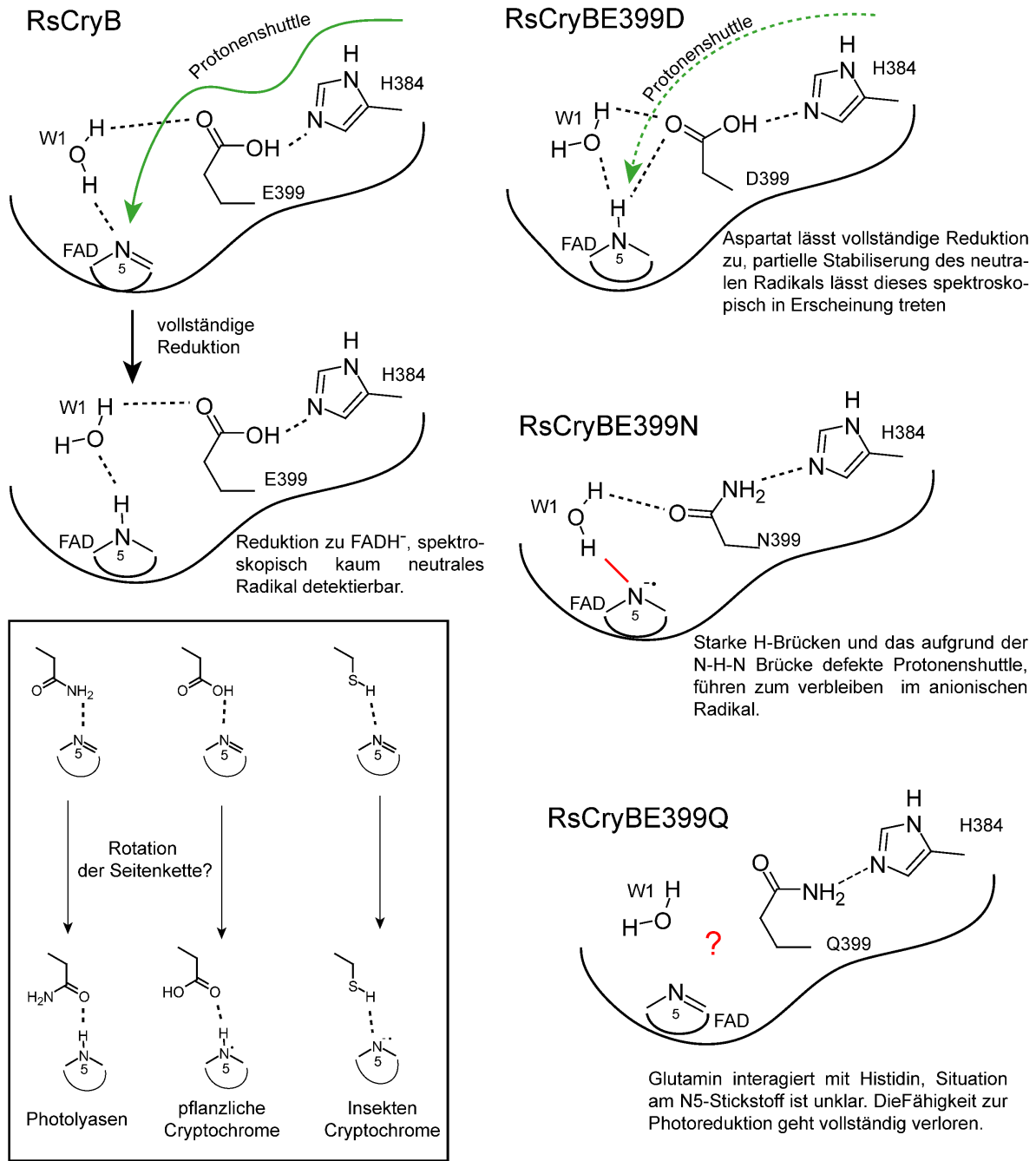


Abbildung 5.4: Schematische Übersicht von denkbaren Interaktionen zwischen FAD, AS399 und H384 während der Photoreduktion von RsCryB und den untersuchten Mutanten. Die Gedankengänge zur jeweiligen Mutante sind in die Abbildung zur besseren Übersicht eingefügt. Wasserstoffbrückenbindungen sind durch gestrichelte Linien dargestellt, potentiell „starke“ H-Brücken sind rot markiert. **Kasten:** Photolyasen können vollständig reduziert werden, wobei der N5-Stickstoff von einem Asparagin koordiniert wird. In pflanzlichen Cryptochromen wird das neutrale Radikal durch ein Aspartat stabilisiert. Die Thiolgruppe in der Nähe des N5-Stickstoffs führt in Insekten Cryptochromen zur Akkumulierung der anionischen radikalischen Form FAD⁻.

Das Verhalten des Wildtyps und der untersuchten Mutanten im Photoreduktionsassay ist nicht intuitiv in Hinsicht auf die anderen Mitglieder der PCSf. In Abbildung 5.4 sind denkbare Szenarien zur Situation am N5-Stickstoff dargestellt. Durch ein Protonenshuttle bestehend aus H384 und E399 kann das Flavin während der Photoreduktion von *RsCryB* rasch protoniert werden. Beim Austausch E399D kann die Carboxylgruppe direkt mit dem N5-Stickstoff wechselwirken und stabilisiert dadurch das intermediäre neutrale Radikal. Eine analoge Situation liegt in der Mutante *RsCryBH384F* vor, durch den Austausch des Histidins wird E399 aus der Interaktion zu diesem frei und kann mit dem N5-Stickstoff wechselwirken. Bei der Mutante E399N ist das Protonenshuttle unterbrochen und das entstehende anionische Radikal könnte durch eine „starke“ Wasserstoffbrückenbindungen¹⁵⁵ zum Wasser W1 stabilisiert werden. Die Situation in *RsCryBE399Q* ist jedoch vollkommen unklar, da keine Photoreduktion mehr stattfindet (siehe Abschnitt 4.1.11).

Auch in *RsCryB* zeigt sich, dass das spektroskopische Verhalten des katalytischen Kofaktors FAD durch den Interaktionspartner am N5-Stickstoff maßgeblich beeinflusst werden kann. Das Wassermolekül W1 ermöglicht dem Kofaktor offensichtlich den schnellen Übergang in den vollständig reduzierten Zustand, ohne lange im semichinoiden Zustand zu verweilen. Dies könnte sich durch eine besonders effiziente Protonierung des Flavins und einem sehr effizienten zweiten Elektronentransfer erklären lassen. Als möglicher Ursprungsort des zweiten Elektrons lässt sich der Eisen-Schwefel-Cluster nicht ausschließen.

5.1.4. Der [4Fe-4S]-Cluster in der CryPro-Familie

In *RsCryB* organisiert sich der C-terminal liegende Bereich der katalytischen Domäne um den FeS-Cluster. Dabei bilden die letzten Helices α_{10} , α_{19} , α_{20} und α_{21} ein dachartiges Strukturmotiv aus den AS S431-V508, welches bisher in der Proteinfamilie der Photolyasen und Cryptochrome noch nicht beobachtet wurde (Abbildung 5.5 A). Bei Austausch eines der vier, den Cluster koordinierenden, Cysteine lässt sich das Protein nicht mehr löslich produzieren (vorläufige Daten). Dies legt nahe, dass der Cluster für die strukturelle Integrität des Proteins essentiell ist. Der Cluster befindet sich in unmittelbarer Nähe des stark basischen Grabens auf der Proteinoberfläche (Abbildung 5.5 A-a1) und könnte daher durchaus das Bindungsverhalten an mögliche Nukleinsäuresubstrate beeinflussen. Die Umgebung des Clusters ist hochkonserviert (Abbildung 5.1). So können die vier Cysteine, welche den Cluster koordinieren, als Marker für die Zugehörigkeit zu der CryPro-Familie dienen.

5. Diskussion

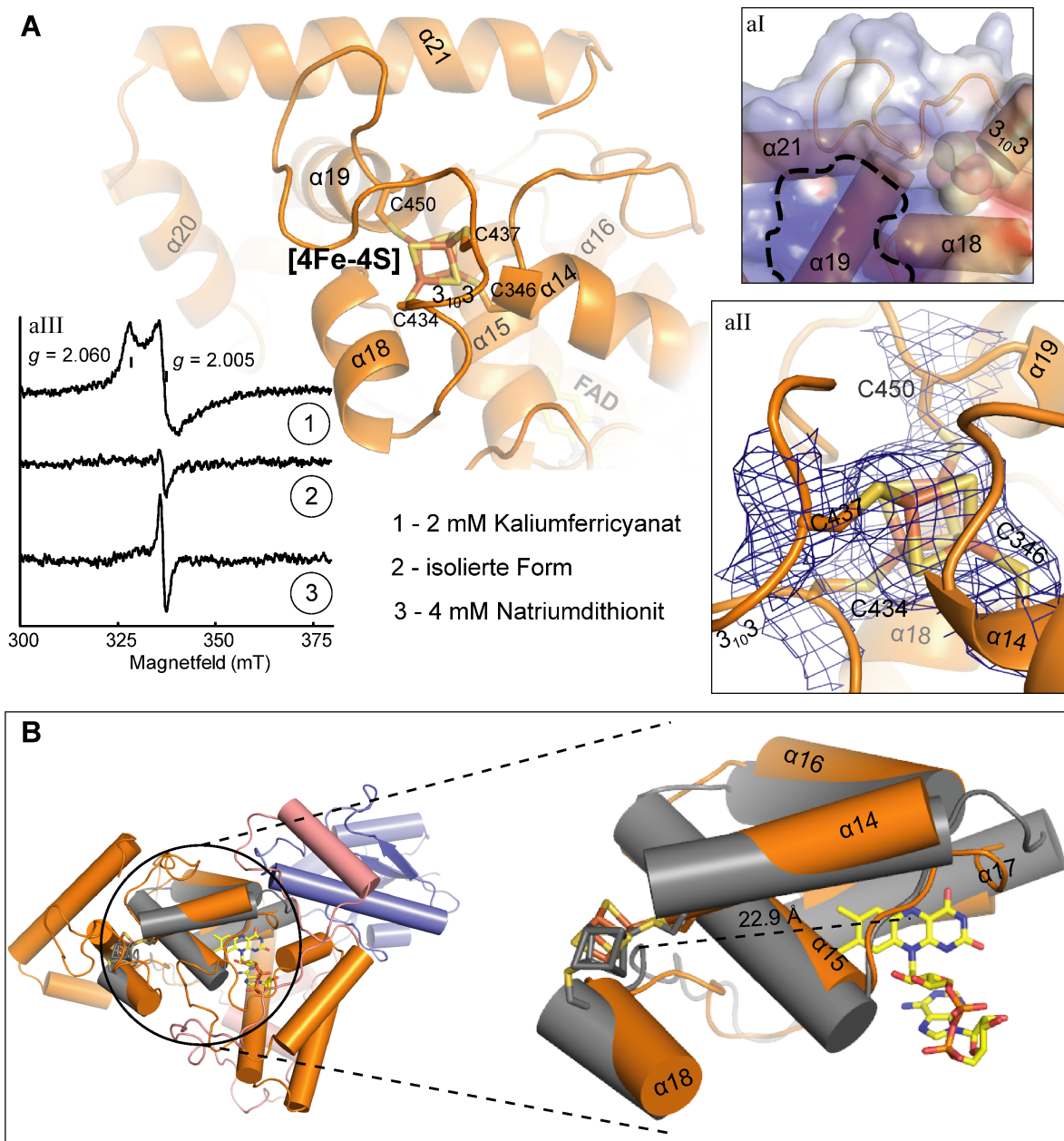


Abbildung 5.5: Übersicht über den C-terminal gebundenen [4Fe-4S]-Cluster. **A:** Der Cluster ist von vier Cysteinen gebunden und stabilisiert die Faltung der letzten Helices des C-Terminus. Helix 3₁₀₃ auf der sich C434 und C437 befinden, ist der Übersicht halber nicht als Cartoon dargestellt. **Einschübe:** aI – Der Cluster befindet sich in der Nähe des stark basischen Canyons auf der Proteinoberfläche (gestrichelte Linie), der vermutlich zur Bindung von Nukleinsäuren dient. aII – 2F_o-F_c-Karte des FeS-Clusters mit den vier koordinierenden Cysteinen. Die Elektronendichteverteilung ist bei 1σ konturiert. aIII – Zur Übersicht an dieser Stelle nochmals das gemessene EPR-Spektrum von RsCryB in drei Zuständen. **B:** Überlagerung der Struktur von RsCryB (3ZXS, orange) mit einem Teil der FeS-Domäne der DNA-Primase aus Hefe (3LGB, grau). Die Helices α14-α18 überlagern mit einem rmsd-Wert von 2.6 Å. Die beiden Eisen-Schwefel-Cluster nehmen eine vergleichbare Position im Protein ein. Das FAD von RsCryB befindet sich in einer Entfernung von 22.9 Å zum [4Fe-4S]-Cluster.

Eisen-Schwefel-Cluster spielen häufig in redoxaktiven Enzymen eine Rolle. Allerdings zeigt der Cluster erst nach Behandlung mit 2 mmol/L Eisen(III)chlorid ein paramagnetisches Verhalten. In reduzierender Umgebung durch die Behandlung mit Natriumdithionit zeigt sich keine Änderung des diamagnetischen Grundzustandes, in welchem der Cluster auch nach der Reinigung des Proteins vorliegt (Abbildung 5.5A-aIII). Das gemessene Signal bei Behandlung mit Natriumdithionit ist typisch für semichinoides FAD.¹⁵⁶ Dieses Verhalten, also einer EPR-aktive Spezies des FeS-Clusters nur im oxidativen Milieu, wurde auch bei dem [4Fe-4S]-Cluster der p58 Untereinheit der humanen DNA-Primase gezeigt.¹⁴³ Interessanterweise stimmen auch die Form des Signals und die gefundenen g-Werte mit den für *RsCryB* gefundenen überein.

Das für *RsCryB* gemessene EPR Signal war, im Vergleich zu einem internen Standard, nicht stöchiometrisch zum Proteingehalt der Probe. Die Bestimmung des Eisen- und des säurelabilen Schwefelgehalts ergaben jedoch eine vollständige Besetzung des Clusters (vergleiche 4.1.5). Auch in der C-terminalen Elektronendichte ist der Cluster eindeutig als [4Fe-4S]-Cluster definiert (Abbildung 5.5 A-aII). Das gemessene Signal im EPR könnte daher von einem oxidativen Abbauprodukt des Clusters herrühren. Solch eine empfindliche Reaktion auf oxidative Schädigung lässt neben der vermuteten photosensorischen Funktion von *RsCryB* auch eine Funktion als Redoxsensor möglich erscheinen. Es bleibt jedoch zu klären, ob dieser oxidierte Zustand - der mögliche Signalzustand des Clusters - unter physiologischen Bedingungen im Kontext der Proteinumgebung erreichbar ist.

5.1.5. Die CryPro-Familie ist ein evolutionäres Bindeglied zwischen der PCSf und eukaryotischen Primasen

Im Kontext der PCSf hat in den letzten Jahren besonders die überraschende strukturelle Verwandtschaft zwischen der C-terminalen Domäne (CTD) eukaryotischer Primaseuntereinheiten PriL aus Hefe¹⁴² bzw. der CTD der menschlichen p58 Primase Untereinheit¹⁵⁷ und einem Teil der C-terminalen Domäne der Mitglieder der PCSf gesorgt.²⁴ Dabei lässt sich die Hälfte der katalytischen FAD-7-Bindungsdomäne (Helices $\alpha 14$ - $\alpha 18$) mit der fünf Helices langen all- α -helicalen Domäne der Primasenuntereinheiten überlagern, was eine entfernte Verwandtschaft zwischen den beiden Enzymfamilien vermuten lässt. Allerdings binden die untersuchten Primaseuntereinheiten kein FAD, da die Bindungstasche im

5. Diskussion

Vergleich zu Photolyasen und Cryptochromen nur halb ausgebildet wird, und in der PCSf wurde vor dieser Arbeit kein Eisen-Schwefel-Protein in der PCSf identifiziert. Dieser Kofaktor ist jedoch für die Aktivität der Primasen essentiell.^{24,142,157}

Der C-terminal gebundene Eisen-Schwefel-Cluster der CryPro-Familie deutet zum ersten mal, neben der gefundenen rein strukturellen, auch eine funktionelle Verwandtschaft zu eukaryotischen Primasen, an.^{142,143} Damit bildet die CryPro-Familie eine evolutionäre Brücke zwischen der PCSf und eukaryotischen Primasen.

5.1.6. 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin ist der typische Antennenchromophor in der CryPro-Familie

6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin (DLZ) ist bei Mikroorganismen nahezu ubiquitär vorkommendes Molekül, da es der letzte Vorläufer in der Biosynthese von Riboflavin ist.¹⁵⁸ Bisher war DLZ als Kofaktor in Lumazin-Proteinen (LumPs) aus marinen extremophilen Organismen bekannt, die über die Fähigkeit zur Biolumineszenz verfügen, wobei die LumPs die Fluoreszenzausbeute der bakteriellen Luciferase als *sensitizer* verstärken.¹⁵⁹⁻¹⁶¹ In der veröffentlichten Struktur zum LumP aus *Photobacterium kinitashii* (3A3G¹⁶²) ist der Chromophor DLZ dabei in der Peripherie der Polypeptidkette durch spezifische H-Brücken nicht-kovalent gebunden.

DLZ wurde in *RsCryB* durch massenspektrometrische Untersuchungen und durch die Elektronendichte in der N-terminalen Domäne eindeutig als Antennenchromophor identifiziert (vergleiche 4.1.4, 4.1.8). Das Molekül ist dabei, wie bei den LumPs, nicht kovalent sondern durch spezifische Wechselwirkungen an das Protein gebunden, wie bei den anderen identifizierten Antennenchromophoren in der PCSf typisch.^{15,30,32,70} Eine Schlüsselrolle spielen bei DLZ die Interaktionen mit den Hydroxylgruppen des Ribitylrests, da jede einzelne eine Wasserstoffbrückenbindungen mit der Proteinumgebung eingeht. Die Bindungstasche ist in der CryPro-Familie stark konserviert (Abbildung 5.1), weshalb postuliert wird, das DLZ der normale Antennenchromophor dieser Untergruppe ist und die Verwendung anderer Chromophore äußerst selten sein sollte. Bestärkt wird diese Aussage, das in *AtPhrB* ebenfalls ein Antennenchromophor gefunden wurde, und das Protein spektroskopisch identische Eigenschaften zu *RsCryB* zeigt.¹⁶³ Interessanterweise befindet sich auch in dieser Bindungstasche ein Wassermolekül, in Analogie zur der des FAD, welches den N5-Stickstoff des Pterins koordiniert.

DLZ ist, wie durch sequenzvergleiche gezeigt (Alignment 7.3), in der CryPro-Familie weit verbreitet. Interessanterweise wurde von Oberpichler *et al.* neben *AtPhrB* als Mitglied der CryPro-Familie auch die CPD-Photolyase aus *Agrobacterium tumefaciens* (*AtPhrA*) identifiziert und charakterisiert. Der Antennenchromophor dieses Enzyms wurde dabei als 5,10-Methenyl-tetrahydrofolat (MTHF) identifiziert.¹⁶³ Demnach besitzen Mitglieder der PCSf aus verschiedenen Untergruppen innerhalb eines Organismus *in vivo* verschiedene Antennenchromophore und nur der katalytische Kofaktor FAD ist in allen Mitgliedern zu finden. Die Verwendung von DLZ steht daher höchstwahrscheinlich in Zusammenhang mit der regulatorischen *in vivo* Funktion von *RsCryB*, deren Mechanismus noch unbekannt ist, und stellt somit ein lohnendes Ziel für weitere Untersuchungen dar.

Ein Startpunkt dieser Untersuchung kann dabei die Eliminierung der Chromophorbindung durch Punktmutationen sein. Die Mutante *RsCryB-E37F*, welche auf die spezifische Interaktion des Proteins mit dem Ribitylrest des DLZ abzielt, zeigt ein verändertes Absorptionsspektrum, was auf den Verlust des Chromophors schließen lässt (Abbildung 5.6). Diese vorläufigen Daten müssen allerdings noch in weiteren Untersuchungen hinsichtlich der Chromophorbesetzung verifiziert werden (Massenspektrometrie, UV/Vis-Spektroskopie, Fluoreszenzspektroskopie), um die Bindung von DLZ definitiv auszuschließen.

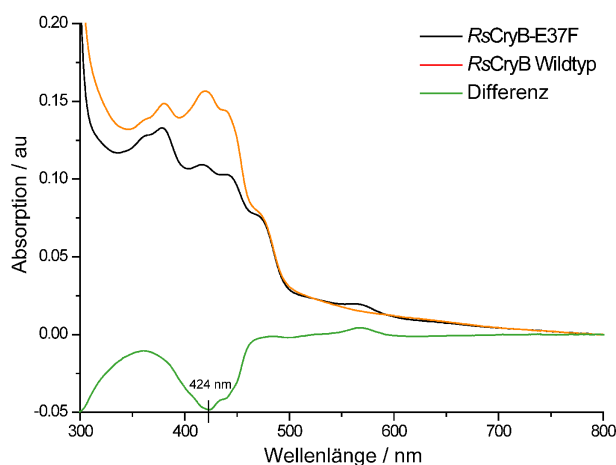


Abbildung 5.6: Konzentrationsbereinigte Absorptionsspektren von *RsCryB* und der Mutante *RsCryB-E37F* sowie das entsprechende Differenzspektrum (Mutante-Wildtyp). Die Mutante verliert in Gegensatz zum Wildtyp einen Absorptionspeak bei 424 nm, was für die Abwesenheit des Antennenchromophors 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin spricht.

5.1.7. Vergleich der CryPro-Familie mit anderen Photolyasen/Cryptochromen

In der Pfam-Datenbank weist die CryPro-Familie im Gegensatz zu den anderen Vertretern der PCSf N-terminal die DPRP-Domäne anstatt der sonst der PCSf zugeordneten DNA-Photolyase-Domäne auf.⁴⁰ Betrachtet man diese beiden Domänen jedoch strukturell und nicht auf Sequenzebene sind die beiden nahezu identisch. Die strukturelle Verwandtschaft ist

5. Diskussion

dabei mit den Klasse II CPD-Photolyasen, den CryDASH und den pflanzliche Cryptochromen mit *rmsd*-Werten der überlagerten C_α-Atomen von jeweils 1.8 am größten (Tab. 5.3). Die DPRP-Domäne der CryPro-Familie bildet wie die DNA-Photolyase-Domäne eine Rossmanfaltung aus, die befähigt ist Nukleotide zu binden. Die Orientierung der DPRP- zur C-terminalen Domäne ist zudem nahezu identisch.

Tab. 5.3: Sequenzbereich und *rmsd*-Werte der Überlagerungen mit der N-terminalen Domäne von *RsCryB* (AS 1-123) und dem Kernbereich C-terminalen Domäne (AS 226-430).

Protein	N-Terminus rmsd	C-Terminus rmsd
<i>Ec</i> CPD1 (1DNP)	2.9	2.7
<i>Mm</i> CPDII (2XRY)	1.8	3.4
<i>Dm</i> (6-4) (3CVU)	2.4	2.8
<i>At</i> Cry3 (2J4D)	1.8	3.1
<i>At</i> Cry1 (1U3C)	1.8	2.7
<i>Dm</i> Cry1 (4GU5)	3.9	4.7

Der Kernbereich der C-terminalen Domäne ist trotz der geringen Sequenzidentität (~10%, berechnet mit ClustalW¹¹ gegen eine Auswahl der PCSf) strukturell analog zu den anderen Mitgliedern der PCSf aufgebaut (Tab. 5.3). Das Flavin wird in dieser Domäne in der typischen U-Form (Abbildung 5.3) und analoger Ausrichtung gebunden. Strukturell anders ist der letzte Teil dieser Domäne, der durch den [4Fe-4S]-Cluster organisiert wird.

Durch Vergleich mit den anderen Vertretern, deren Komplexstruktur mit DNA aufgeklärt wurde, kann die Nukleinsäure-Interaktionsfläche von *RsCryB* identifiziert werden (Abbildung 5.7). Wie in den anderen Mitgliedern der PCSf formen basische Reste und orientierte Dipole eine positiv geladene Furche in der Proteinoberfläche. Zentral in diesem Canyon liegt der Zugangskanal zum katalytischen FAD. In Photolyasen wird dort das entsprechende Substrat gebundenen,^{10,28,39,76} Cryptochrome zeigen hingegen nur gering erhöhte Affinität zu den photochemisch induzierten DNA-Läsionen.⁸¹ So bindet *RsCryB* CPD-Schäden mit leicht erhöhter Affinität, zeigt aber keine Präferenz für (6-4)-Photoprodukte (siehe 4.1.9).⁸⁸ In biochemischen Analysen wurde jedoch eine erhöhte Affinität gegenüber einzelsträngigen Nukleinsäuren, sowohl RNA als auch ssDNA, im Vergleich zu dsDNA, gefunden. Dies steht

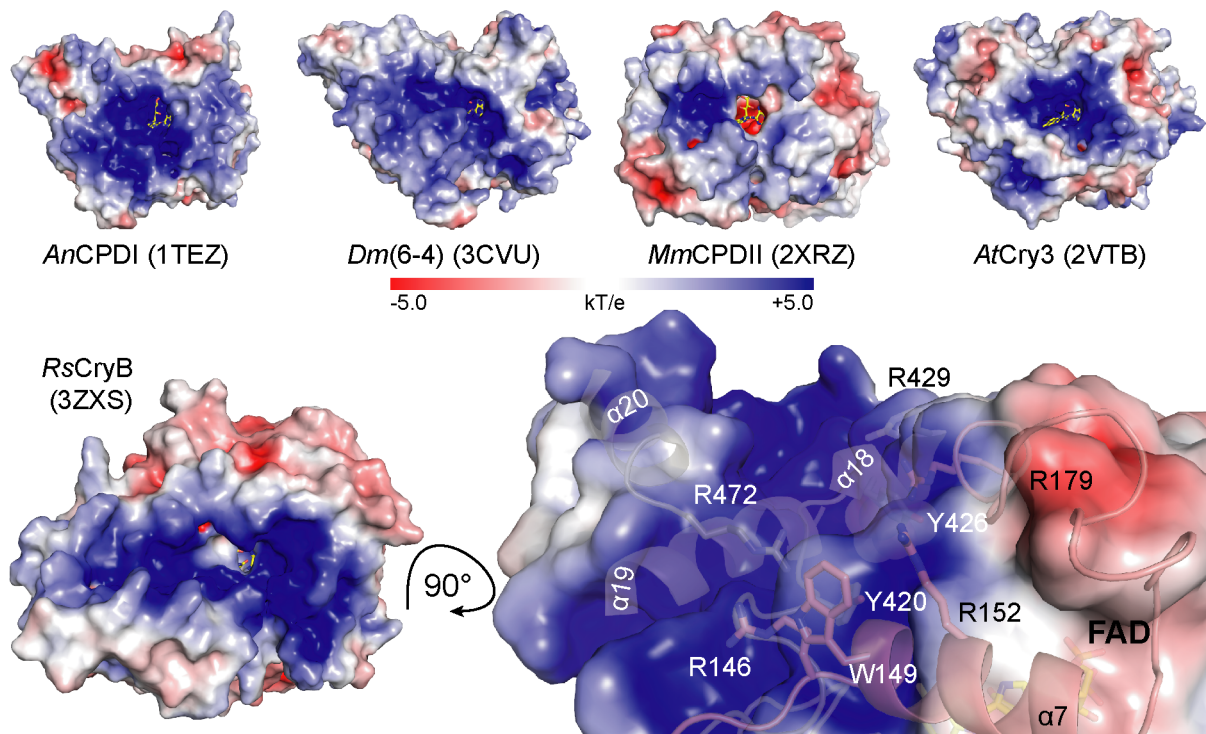
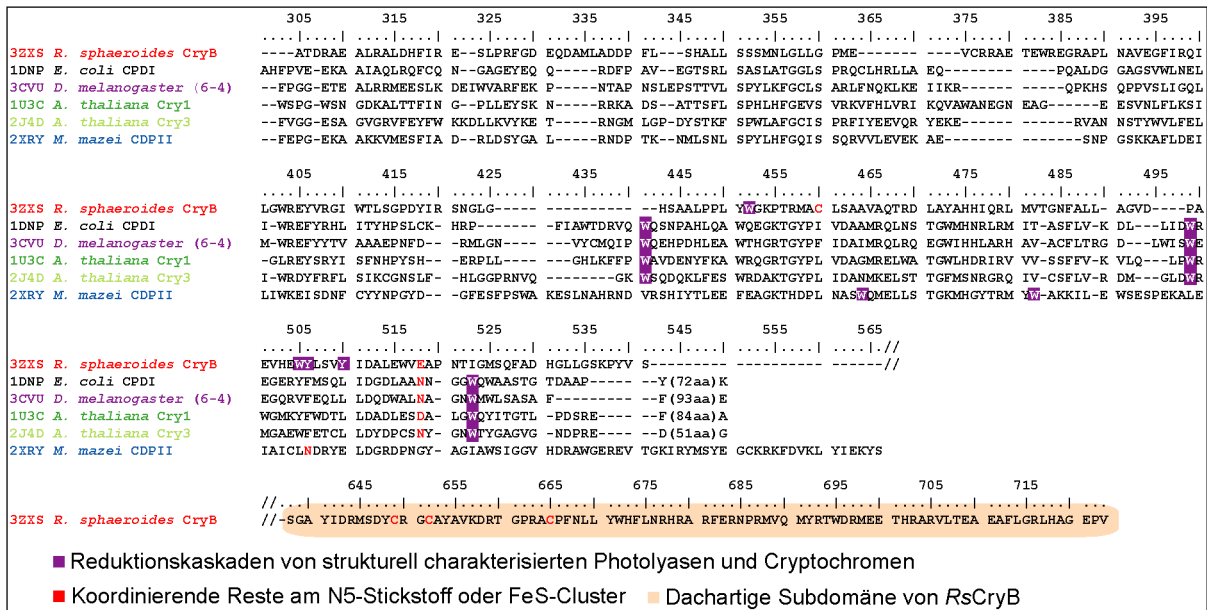


Abbildung 5.7: Vergleich zwischen RsCryB und anderen Mitglieder der PCSf. Oben: Auszug aus einem strukturellen Alignment der angegebenen Proteine. Neben konservierten Bereichen unterscheidet sich RsCryB vom kanonischen Typ (*EcCPDI*, *AtCry3*, *AtCry1*; *Dm(6-4)*) durch den komplett anders strukturierten C-Terminus (orange hinterlegt) und eine andere Reduktionskaskade (violett). Die konservierten Cysteine (rot) der CryPro-Familie existieren in den anderen Familienmitgliedern nicht. Unten: Übersicht über das elektrostatische Potential der DNA-Bindungsstelle von vier Vertretern der PCSf. Durch Kristallstrukturen konnte der gezeigte basische Bereich bei allen als DNA-Interaktionsfläche identifiziert werden. Auch der basische Canyon auf der Oberfläche von RsCryB verläuft über den Zugangskanal zum FAD. Er wird von zahlreichen Strukturelementen des C-Terminus und basischen Seitenketten aufgebaut.

5. Diskussion

im Einklang mit der im Vergleich strukturell anspruchsvolleren Oberfläche. Die Linkerregion (P124-D226) von *RsCryB* formt den basischen Kanal aktiv mit und verengt ihn, wodurch die Helix von doppelsträngiger DNA aufgrund von Platzmangel nicht mehr gebunden werden kann.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass *RsCryB* nicht in der Lage ist (6-4)-Schäden zu reparieren (siehe Abschnitt 4.1.9), obwohl die Umgebung der katalytischen Taschen sehr ähnlich zu der der *Dm(6-4)* aufgebaut ist. Allerdings ist das typische Histidin der (6-4)-Photolyasen (H369 *Dm(6-4)*³⁸) welches an der Katalyse zur Spaltung des (6-4)-Photoprodukts beteiligt ist in *RsCryB* durch ein Leucin (L366 *RsCryB*) ersetzt. Die Situation ist sehr ähnlich zu pflanzlichen Cryptochromen, in denen sich an der strukturell identischen Position ein Valin (V363 *AtCry1*³⁴) befindet. *RsCryB* ist somit ein „klassisches“ Cryptochrom, welches nur eine Signalfunktion wahrnimmt und gehört nicht zu den dual function Cryptochromen, welche unter anderem auch Reparaturaktivität gezeigt haben.⁶³

5.1.8. *RsCryB* – Erste strukturelle und funktionelle Einsichten in ein bakterielles Cryptochrom

Durch die Untersuchungen an *RsCryB* ist, neben den Klasse-II Photolyasen, ein zweiter nicht-kanonischer Typ in der PCSf gefunden worden. Neben den beiden in dieser Proteinfamilie neuen Kofaktoren [4Fe-4S] und DLZ, welche vermutlich funktionelle Relevanz aufweisen, konnte das neue dachartige Strukturmotiv am C-Terminus von *RsCryB* identifiziert werden. Dieses Faltungsmotiv beherbergt den FeS-Cluster und formt einen Teil der putativen DNA/RNA-Bindungsfläche.

RsCryB ist wie alle anderen untersuchten Photolyase und Cryptochrome photoreduzierbar, akkumuliert allerdings im Gegensatz zu CPD-Photolyasen und pflanzlichen Cryptochromen keinen semichinoiden Zustand. Der Signalzustand dieses Cryptochroms ist somit nicht durch den neutralen, radikalischen Zustand des Flavins gekennzeichnet, im Gegensatz zu den pflanzlichen Verwandten.^{164,165} Einen möglichen Signalzustand stellt aber die EPR-aktive Spezies des [4Fe-4S]-Clusters da. Dieser Zustand könnte intermolekular durch Oxidation mit z.B. reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) aus der Photosynthese erfolgen (Abbildung 5.8 A). Eine mögliche Rolle von *RsCryB* im Zusammenhang mit oxidativen Stress wurde bereits von Hendrischk et al. 2009 postuliert.⁸⁸

In weiteren Arbeiten zeigte sich, dass *RsCryB* sowohl in der Antwort der Genregulation auf oxidativen Stress als auch auf Belichtung mit Blaulicht beteiligt ist.¹⁶⁶ Dabei stellte sich heraus, dass der Großteil der Gene blaulichtabhängig von *RsCryB* beeinflusst wird, wobei die Kontrolle dabei direkt oder durch Beeinflussung anderer Signaltransduktionswege erfolgen kann.¹⁶⁶ Eine besondere Rolle kommt dabei der Interaktion von *RsCryB* mit einem weiteren Photorezeptor aus *R. sphaeroides*, dem Protein AppA zu. 2012 zeigten Metz *et al.* die lichtabhängige Interaktion von *RsCryB* mit der C-terminalen Domäne von AppA. Dadurch nimmt *RsCryB* Einfluss auf das Transkriptionslevel aller durch das AppA/PpsR-System kontrollierten (siehe 1.11.1) Photosynthesegene.¹⁶⁷ Die gezeigte Interaktion von *RsCryB* mit dem C-Terminus von AppA dient möglicherweise zum Austausch von Redoxinformationen, da AppA in diesem C-terminalen Bereich ein Häm bindet (Abbildung 5.8 B).

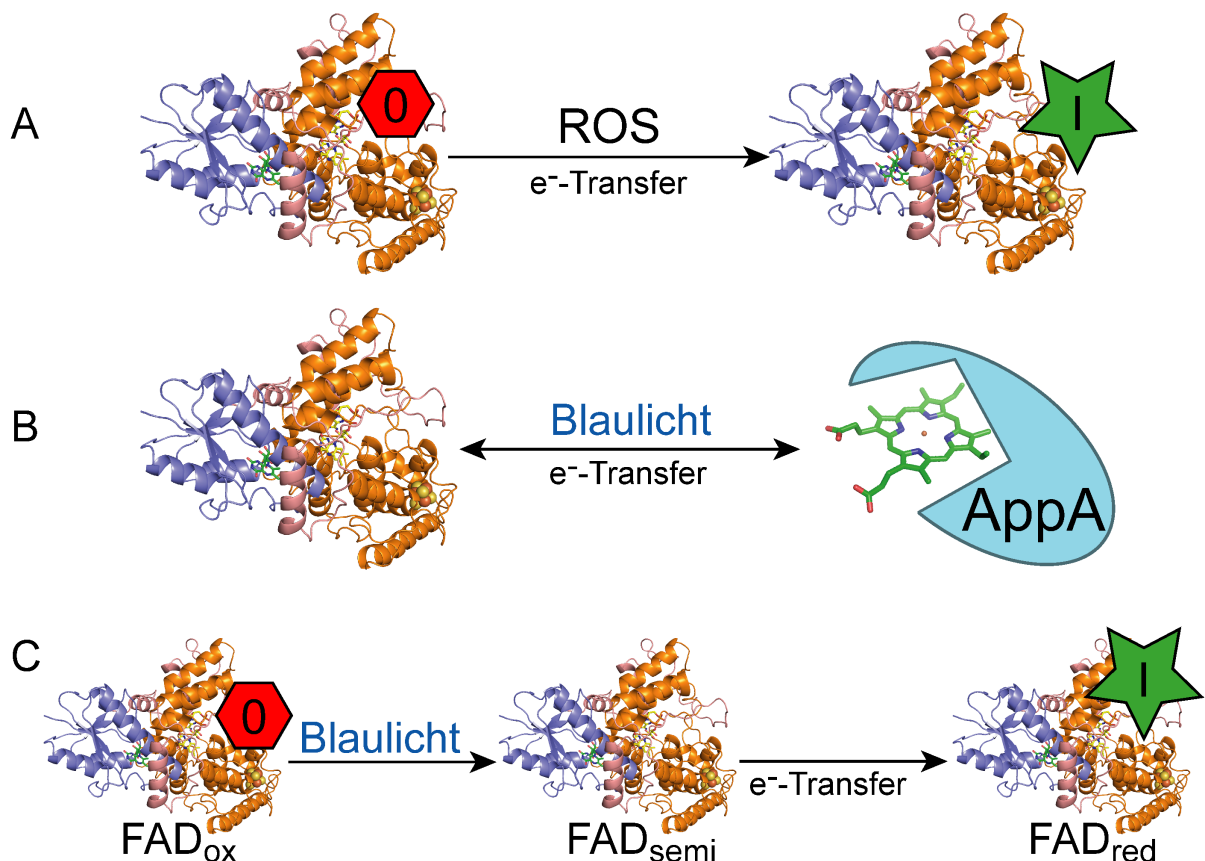


Abbildung 5.8: Graphische Darstellung der möglichen Interaktions- bzw. Aktivierungspfade von *RsCryB*. A: Der [4Fe-4S]-Cluster könnte durch ROS oxidiert und in den postulierten aktiven Zustand übergehen. B: *RsCryB* und AppA interagieren lichtabhängig miteinander. Dabei könnte es zu einem Elektronentransfer zwischen der Häm-Gruppe von AppA und dem [4Fe-4S]-Cluster von CryB kommen. C: Der Chromophor FAD_{ox} wird durch Blaulicht in die semichinoide Form überführt und könnte den FeS-Cluster oxidieren, eventuell auch lichtunabhängig. Dieser ginge dadurch in den aktiven Zustand über. Das vollständig reduzierte Flavin wird im Anschluss vermutlich in den oxidierten Zustand reuertieren.

5. Diskussion

Eine andere Möglichkeit, den EPR-aktiven Zustand des FeS-Clusters zu erreichen, stellt ein lichtinduzierter intramolekularer Elektronentransfer auf den ebenfalls redoxaktiven Kofaktor FAD dar (Abbildung 5.8 C). Dieser Transfer könnte jedoch, basierend auf den *in vitro* Experimenten, nur auf semichinoides FADH[•] erfolgen, da das Protein bei Belichtung mit Blaulicht und in Abwesenheit eines Reduktionsmittels photochemisch inaktiv bleibt. Des Weiteren dürften bei einer Elektronenübertragung des Clusters auf FAD_{ox} auch die beiden Mutanten *RsCryBW338F* sowie *RsCryBW386F* bei Bestrahlung nicht in der oxidierten Form verbleiben. Ein schneller Elektronentransfer des Clusters auf FADH[•] würde auch das Ausbleiben der prominenten Absorption des semichinoiden Zustandes während der Photoreduktion *in vitro* erklären. Diese genannten drei möglichen Aktivierungsbeziehungsweise Interaktionsmöglichkeiten, in denen *RsCryB* als eine Art lichtabhängiger Redoxschalter wirkt, sind in Abbildung 5.8 zusammengefasst.

5.2. Die (6-4)-Photolyase aus *Dunaliella salina* (*Ds(6-4)*)

5.2.1. Die *Ds(6-4)* repariert das (6-4)-Pyrimidinpyrimidon-Photoprodukt *in vitro*

Die Funktion als (6-4)-Photolyase wurde diesem Protein aufgrund von Sequenzvergleichen und seinem Einfluss auf die Photoreaktivierung zugeschrieben.^{148,168} Es ist jedoch gezeigt worden, dass auch Proteine ohne Photolyaseaktivität die Photoreaktivierung *in vivo* beeinflussen können. In dem von Maul *et al.* etablierten *in vitro* Assay³⁸ repariert *Ds(6-4)* ein acht Nukleotide langes ssDNA-Oligomer mit zentralem, chemisch synthetisierten (6-4)-Schaden (siehe 4.3.2). Sie kann damit eindeutig als funktionelle Photolyase identifiziert werden.

Die verlängerten Termini geben jedoch immer noch ein Rätsel auf und dürften mit einer Signalfunktion in Zusammenhang stehen. In zukünftigen strukturellen Untersuchungen könnte diese Fragestellung beantwortet werden. Mit der hohen Homologie zu den bifunktionellen Blaulicht/Rotlichtrezeptor *CraCry* (siehe 1.6.5) ordnet sich die *Ds(6-4)* damit in die Gruppe der *dual function* Cryptochrome aus Algen ein.⁶¹

5.2.2. 8-Hydroxydeazaflavin ist der native Antennenchromophor der *Ds(6-4)*

Durch Mikrodialyse und *in vivo* Rekonstitution der rekombinanten *Ds(6-4)* konnte die Bindung von 8-Hydroxy-5-deazaflavin (F0, 8-HDF) an die Photolyase gezeigt werden siehe (4.3.1). 8-HDF wurde schon in Photolyasen aus verschiedenen Organismen und verschiedenen Photolyasengruppen als Antennenchromophor identifiziert. So wird 8-HDF von *AnCPDI*, *Dm(6-4)* als auch von *MmCPDII* gebunden.^{15,69,149} Der experimentelle Befunde, dass auch die *Ds(6-4)* 8-HDF bindet, vermutlich als Antennenchromophor wie durch die Sequenzvergleiche gezeigt (Abbildung 5.9 oben), belegt die Promiskuität, mit welcher die Mitglieder der PCSf Antennenchromophore aquirieren. Was im jeweiligen Organismus, sei es aus dem Katabolismus, wie bei *A. nidulans*, *M. mazei* – Organismen welche 8-HDF produzieren können, da sie Gene der *cofG/cofH*-Familie besitzen – oder aus exogenen Quellen wie vermutlich bei *D. melanogaster*, zur Verfügung steht wird als Chromophor genutzt. Die Rechner-gestützte Sequenzanalyse sollte dabei die Methode der Wahl zur Vorhersage eines möglichen Antennenchromophors sein, dessen Verfügbarkeit für den jeweiligen Organismus jedoch überprüft werden muss.

Interessanterweise scheint dabei 8-HDF der bevorzugte Antennenchromophor zu sein, falls es dem Organismus zur Verfügung steht. So kann *D. salina* FMN, FAD und Methylen-THF produzieren und sollte durch die Verwandtschaft zu *C. reinhardtii*, welche ein 8-HDF-Produzent ist (F0-Synthase *phr1*¹⁶⁹), auch in der Lage sein 8-HDF zu produzieren. Bei der heterologen Produktion in *E. coli*, mit dem 8-HDF Helferplasmid, liegen auch in *E. coli* alle bekannten Antennenchromophore vor. Aus dem Pool der möglichen Antennenchromophore wird spezifisch 8-HDF als nativer Antennenchromophor in die (bifunktionelle) (6-4)-Photolyase inkorporiert.

Mit der Struktur der (6-4)-Photolyase aus *Arabidopsis thaliana* (3FY4)³⁹ als Templat konnte mit Hilfe des MODBASE⁹³ Servers ein Strukturmodell der *Ds(6-4)* generiert werden. Dieses Strukturmodell zeigt in der Überlagerung mit der Struktur der *AnCPDI*, welche nativ 8-HDF bindet,¹⁵ eine hohe Konservierung der 8-HDF Umgebung an (Abbildung 5.9 unten). Dies legt nahe, dass 8-HDF in einem analogen Modus gebunden wird und somit der native Antennenchromophor der *Ds(6-4)* ist. Von der evolutionsgeschichtlichen Einordnung betrachtet sollten Nukleosid/Nukleotidchromophore die älteren Antennenchromophore in der PCSf sein, da sie in der N-terminalen Rossmann-Faltung binden, die bei allen Mitgliedern der Familie, auch der neu beschriebenen CryPro-Klasse, vorkommt. Ging im Laufe der Zeit durch

5. Diskussion

Mutationen die Fähigkeit zur Nukleotidbindung oder die Synthesemaschinerie des Chromophors verloren, bot sich Methenyltetrahydrofolat als neuer, ubiquitär vorkommender Antennenchromophor an, um das Aktionsspektrum der Photolyase wieder zu erweitern.

	5	15	25	35	45	55	65	75	85	95
Ds(6-4) Q52Z99	MLRCAQPKYA	PLKROAFNOK	LNRLVAAART	PSKSSSTSRM	ASTSSGQOGR	SILWFRKGLR	LHDNPALRDA	CT-----GS	AAVFPIFLID	PYFLQKSNNK
Dm(6-4) Q8SXX5	-----	-----	-----	-----	-----MDSQRST	LVHWFRKGLR	LHDNPALSHI	FTAANAAPGR	YFVRPIFLD	PGILDW-MQ
AnCPDI P05327	-----	-----	-----	-----	-----MAAP	ILFWRRDLR	LSDNIGLAAA	RA-----QS	AQLIGLPCLD	PQILQSD--
	105	115	125	135	145	155	165	175	185	195
Ds(6-4) Q52Z99	VGVNRYQFL	ESLSDLNSSL	TSLSGSQLLVL	RGTPEEVI	VLRDWSIKKL	CYEIDTEPYA	KARDARVDDM	AREAGVEVKK	HWSHTLYD	MLVRENK
Dm(6-4) Q8SXX5	VGANRWRFL	QTLEDLDNQL	RKLNSRLFVV	RGKPAEVFPR	IPKSRWVEM	TFETDIEPYS	VTRDAAVQKL	AKAEGVRVET	HCSHTIYNPE	LVIAKNLGKA
AnCPDI P05327	MAPARVAYL	GCLQELQQR	QQAGSRLLLL	QGDPQHLIPQ	LAQQQAEAV	YWNQDIEPYG	RDRDGQVAAA	LKTAGIRAVQ	LWDQLLHSPD	QILSGS-GNP
	205	215	225	235	245	255	265	275	285	295
Ds(6-4) Q52Z99	PLTMOAPEKL	VDRVGHPLTA	-LPAPTARLP	--PVDVSLPG	IKD---AEV	GVPTWQEM--	GFKEAPTAIF	KGGETEALKR	LEHYMKDTKW	XASPEKPS
Dm(6-4) Q8SXX5	PITYQKFLGI	VEQLKVPKVL	GVPEKLNMP	TPPKD-EVEQ	KDS---AAY	DCPTMKQLVK	RPEELGPNKF	PGGETEALRR	MEESLKDEIW	VARPEKPN
AnCPDI P05327	YSVYGFPPWKN	WQAQPKPTPV	ATPTELVDL-	-----SPEQ	LTAIAPLLLS	ELPTLKQL--	GFDWDGGFPV	EPGETAAIAR	LQEPEDRAI-	-ADYDP---Q
	305	315	325	335	345	355	365	375	385	395
Ds(6-4) Q52Z99	PSAFTEPSTT	ALSPYLKFGC	LSARFFHQRL	LDV--YRLHP	KHSQPPMSLR	GQLLWREFFY	TLGSHTPNFD	RIAGNPICRQ	ITWDTNPALL	KAWRDGATGY
Dm(6-4) Q8SXX5	PNSL-EPSTT	VLSPYLKFGC	LSARLFNQKL	KEI--IKRQP	KHSQPPVSLI	GQLMWREFFY	TVAAAEPNFD	RMLGNVYCMQ	IPWQEHDPDL	EAWTHGRTGY
AnCPDI P05327	RNFPABAGTS	GLSPALKFGA	IGIRQAWRAA	SAAHALSRSD	EARNRISRVWQ	QELAWREFYQ	HALYHFPSLA	DGPYRSLWQQ	FPWENREALF	TAWTQAQTGY

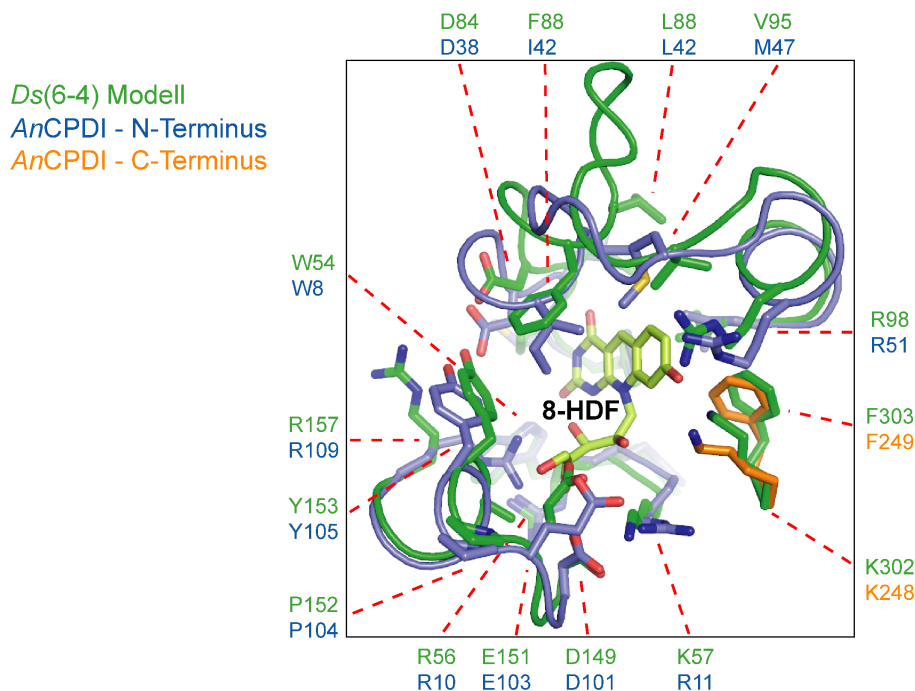


Abbildung 5.9: Die Ds(6-4) bindet 8-HDF voraussichtlich als Antennenchromophor. Oben: Alignment aus Ds(6-4), Dm(6-4) und AnCPDI. Alle Proteine binden 8-HDF. Reste, die in den beiden letztgenannten zur 8-HDF Bindungstasche gehören, sind farbig markiert und bei Konservierung rot hervorgehoben. Die N-terminale Domäne der Proteine ist dabei blau, die C-terminale orange hinterlegt. Unten: Überlagerung der AnCPDI (blau/orange IQNF) und einem Ds(6-4)-Modell (grün). Das Modell basiert auf der At(6-4) (3FY4) als Templat und wurde mit modbase erstellt. Wie das Alignment bereits suggeriert ist die Bindungstasche auch strukturell konserviert.

Methenyl-THF hat allerdings den entscheidenden Nachteil, dass es im Gegensatz zu deprotoniertem 8-HDF selbst redoxaktiv ist. So kann angeregtes, vollständig reduziertes FADH₂, bei Abwesenheit eines CPD-Schadens als Substrat, Methenyl-THF durch zwei

Elektronentransfers zu Methylen-THF reduzieren. In diesem Oxidationszustand hat die Bindungstasche keine Affinität mehr zu dem Chromophor und er dissoziiert vom Protein ab, *in vitro* hydrolysiert das Molekül nun langsam. Dieser Prozess (*photobleaching*) wurde bei mehreren MTHF-tragenden Photolyasen/Cryptochromen nachgewiesen.⁴¹ *In vivo* kann das reduzierte Methylen-THF durch Oxidation mit einer Folatdehydrogenase unter Gewinn von NADPH wieder zurückgewonnen werden, wie erste eigene Untersuchungen zu dieser Reaktion gezeigt haben.^{41,71}

5.3. Die Klasse II CPD-Photolyase aus *Methanosarcina mazei*

5.3.1. Analyse der DNA-Bindung der *Mm*CPDII an ungeschädigte DNA

In den durchgeführten EMSAs konnten für die *Mm*CPDII und ungeschädigte doppelsträngige DNA eine unspezifische Dissoziationskonstante des geformten Komplexes von $K_{D,ns} = 455$ nmol/L gemessen werden (Abschnitt 4.2.1). Die Stöchiometrie des gebildeten Komplexes konnte durch die Hill-Gleichung mit 4 Molekülen *Mm*CPDII pro DNA-Strang bestimmt werden. Damit deckt eine Bindungsstelle der *Mm*CPDII gut 12 Nukleotide in der Sequenz ab, was einer Länge von 42 Å entspricht. Diese Abdeckung ist im Einklang mit der publizierten Komplexstruktur zwischen der *Mm*CPDII und einem DNA-Tetradekamer mit zentralen CPD-Schaden (2XRZ¹⁰), in der die *Mm*CPDII gut 12 Basenpaare der dsDNA abdeckt. Bei hohen Konzentrationen legt sich das Protein folglich dichtest möglich um die zur Verfügung stehende DNA. Bei geringeren Konzentrationen, die näher an physiologischen Bedingungen sein sollten, kann davon ausgegangen werden, dass dieser unspezifische Photolyase-DNA-Komplex sehr schnell dissoziiert, da erst ab einer Proteinkonzentration von ca. 200 nmol/L eine Retention der DNA zu beobachten war.

5.3.2. Analyse der DNA-Bindung der *Mm*CPDII an UV-geschädigte DNA

Für ein 50mer-Oligonukleotid mit zentralem CPD-Schaden wurde eine Dissoziationskonstante des geformten *Mm*CPDII-DNA-Komplex von $K_D = 44$ nmol/L gefunden. Dies ist vergleichbar mit der Dissoziationskonstante des *Ec*CPDII-DNA-Komplexes für den eine Dissoziationskonstante von $K_D = 38$ nmol/L gefunden wurde.⁷⁷ Der spezifische Komplex begann sich schon bei geringen

5. Diskussion

Proteinkonzentrationen von 10 nmol/L zu bilden (Abschnitt 4.2.1). Bei hohen Konzentrationen wird er von dem sich ebenfalls bildenden unspezifischen überlagert, bis sich schließlich der vollständig besetzte unspezifische Komplex ausgebildet hat. In dieser Studie zeigte sich, dass die *Mm*CPDII zwischen geschädigter und ungeschädigter DNA um den Faktor 10 unterscheiden kann. Im Vergleich zu den veröffentlichten Daten der *Ec*CPDI, in denen die Unterscheidung bei einem Faktor von 10^4 lag, erscheint dies vergleichsweise wenig.⁷⁷ Im physiologischen Konzentrationsbereich sollte diese Diskriminierung jedoch ausreichen.

5.3.3. Untersuchung des vollständig reduzierten Zustands der *Mm*CPDII

Der vollständig reduzierte Zustand einer Photolyase ist der katalytisch Aktive. Zur Kurzzeit-spektroskopischen Analyse des DNA-Reparaturprozesses ist es daher unerlässlich diesen aktiven Zustand genau zu charakterisieren. Zunächst sollte daher der vollständig reduzierte Zustand der Photolyase zuverlässig erreicht und im experimentellen Aufbau über mehrere Stunden stabil gehalten werden, was im Rahmen der durchgeführten Experimente sowohl im Peltierelement als auch im Kryostaten gezeigt werden konnte. In beiden experimentellen Aufbauten war die Probe über mehrere Stunden im reduzierten Zustand stabil, bevor Reoxidation durch eindringenden Sauerstoff stattfand. Diese Zeit könnte durch weitere Optimierung des experimentellen Setups eventuell noch verlängert werden. Ein Ansatzpunkt wäre hierbei vor allem die Abdichtung der Probe im Peltierelement.

Zudem konnte festgestellt werden, dass die Photolyase durch Anwesenheit von Glycerin im experimentellen Puffersystem erheblich stabilisiert wird. Dies wird im Vergleich von Messungen in Gegenwart von Glycerin und ohne Glycerin unter anderen an der qualitativ besseren Annäherung an die experimentellen Daten durch die exponentiellen Abfälle deutlich (siehe 4.2.3 und folgende). Weiterhin zeigt die Fluoreszenz des Photolyase gebundenen FAD im Puffersystem ohne Glycerin leicht verkürzte Lebensdauern auf, was auf erhöhte Flexibilität der Proteinumgebung hinweist. Außerdem tritt die theoretisch erwartete und im Fall der Klasse I Photolyase bestätigte⁸³, negative Amplitude in der roten Flanke des zeitabhängigen Fluoreszenzspektrums nur bei Zusatz von Glycerin hervor. Ohne diesen Zusatz wird der Prozess von anderen Relaxationsvorgängen und durch eine deutlich höhere Flexibilität im Protein verschleiert (Daten siehe Tab. 4.3 und Tab. 4.4).

Neben Glycerin als Zusatz hat vor allem die Temperatur einen starken Einfluss auf die Qualität der Messung. So zeigt die Photolyase über mehrere Minuten bei 298 K oder höheren Temperaturen deutliche Qualitätseinbußen, vermutlich durch Aggregation oder beginnende Denaturierung der biologischen Probe. Dies wird vor allem daran deutlich, dass bei zyklischen Messungen die initialen Werte nur grob reproduziert werden konnten. Nachfolgende Experimente sollten daher bei maximal 278 K durchgeführt werden um unnötige thermische Belastungen der Probe zu vermeiden. Zyklische Messungen der Probe zur Validierung des Experiments sind dabei unerlässlich (Daten siehe Tab. 4.2).

In der Analyse der Wellenlängenabhängigkeit der zeitabhängigen Fluoreszenz zeigte sich, dass die blaue Flanke ($\lambda < 500$ nm) des Spektrums von extrem schnellen Prozessen hervortraten, während der rote Bereich ($\lambda > 550$ nm) von langsameren dominiert wird, die Lebensdauern im Zeitbereich der Dauer von Reparaturprozessen aufweisen. Daher macht es Sinn, den Reparaturprozess im roten Bereich ($\lambda > 550$ nm) des Spektrums zu beobachten, da nur dort messbare Effekte auftreten sollten (Abbildung 5.10).

Diese ersten Experimente liefern den Grundstein für weiterführende Untersuchungen zum Reparaturprozess einer Klasse II CPD-Photolyase. Dabei zeigt sich im Vergleich zu den analogen Untersuchungen mit der Klasse I CPD-Photolyase aus *E. coli*⁸³, dass die Lebensdauer der *MmCPDII* um den Faktor zwei länger ist. Dies deutet auf eine stärkere sterische Restriktion des reduzierten Flavins hin, so dass der sogenannte *butterfly bend* – die Schwingung entlang der N5-N10 Achse – des reduzierten Flavins nur schwerlich ausgeführt werden kann. Diese Schwingung ist jedoch für die strahlungslose Rückkehr des angeregten Zustandes in den Grundzustand durch interne Konversion verantwortlich.⁸⁴ Die Klasse II Photolyase verbleibt also im Mittel gut doppelt so lange im angeregten Zustand und hat somit mehr Zeit zur Verfügung nach passender Anregung einen Reparaturprozess durchzuführen. Dieser verlängerte angeregte Zustand kann die im Vergleich zur Klasse I CPD-Photolyasen schlechtere DNA-Bindung möglicherweise kompensieren, indem die *MmCPDII* durch den verlängerten angeregten Zustand mehr Zeit hat einen für den Elektronentransfer produktiven DNA-Komplex auszubilden. Interessant ist in dieser Hinsicht vor allem der Wassercluster, der in der katalytischen Tasche der *MmCPDII*-CPD Komplexstruktur gefunden wurde (2XRZ).¹⁰

5. Diskussion

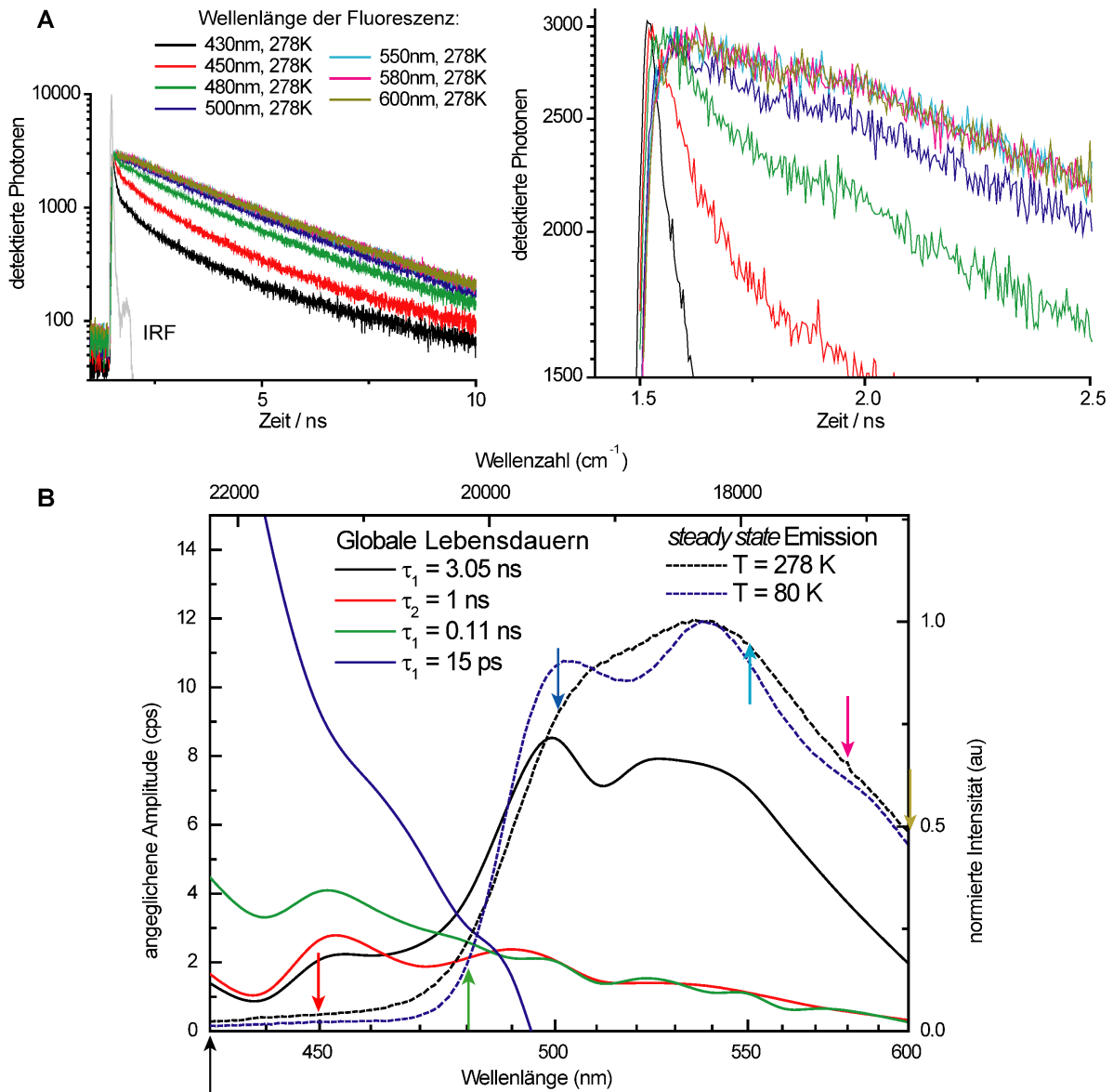


Abbildung 5.10: Wellenlängenabhängiges „time correlated single photon counting“ der MmCPDII bei der Anregungswellenlänge 365 nm und in Anwesenheit von 50% Glycerin. Die Proteinkonzentration während des TCSPC betrug 17 $\mu\text{mol/L}$. **A:** Links ist exemplarisch für die wellenlängenabhängigen Messungen bei 278 K eine Schar aus sechs Messungen gezeigt. Die „instrument related function“ (IRF) ist in grau in das Bild eingefügt. Im rechten Bild ist der Anfangsbereich der zeitabhängigen Messungen vergrößert gezeigt. Man kann gut erkennen, wie sich die Kurvenform mit höheren Wellenlängen ändert, was dem Auftauchen der negativen Amplitude zuzuschreiben ist.

B: Gezeigt sind zwei Fluoreszenzspektren der MmCPDII bei 278 K und 80 K (gestrichelte Linien). Diese Spektren wurden von Christoph Hartlmüller im Rahmen seiner Masterarbeit aufgenommen.¹⁷ Die durchgezogenen Linien entsprechen den dekonvolutionierten Fluoreszenzspektren aus den Amplituden der global genäherten wellenlängenabhängigen Messungen. Die korrespondierenden Wellenlängen aus A sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Für das steady state Fluoreszenzspektrum ist nahezu ausschließlich die lange Komponente mit ihrer Lebensdauer von 3.05 ps verantwortlich. Die Messpunkte wurden alle 10 nm (430 nm – 580 nm) und bei 600 nm aufgenommen und durch eine polynomische Interpolation geglättet. Nur in der roten Flanke des Fluoreszenzspektrums (550 nm – 600 nm) ist es möglich Reparaturereignisse zu detektieren, da der Reparaturprozess bei kürzeren Wellenlängen von den starken, schnellen Komponenten überlagert wird.

5.4. Ausblick zu offenen Fragen in der PCSf

Mit der Struktur des Cryptochrom B aus *Rhodobacter sphaeroides* dürfte die PCSf, aus struktureller Sicht, erschöpfend charakterisiert sein, da aus allen großen Unterfamilien, sowohl der kanonischen als auch der CryPro-Familie und der Klasse II Photolyasen, zumindest ein Vertreter charakterisiert ist und es innerhalb einer Familie keine signifikanten strukturellen Differenzen zu geben scheint. Die verbleibende Frage ist jedoch immer noch der genaue Mechanismus der Signalfunktion der Cryptochrome, über den auch die Struktur des RsCryB keine eindeutige Antwort liefern kann. Es wurde klar, dass diese Funktion über eine wie auch immer geartete Interaktion abläuft, nicht nur für die CryPro-Familie sondern auch für pflanzliche und tierische Cryptochrome.^{19,24,166} Daher sollte die strukturelle Charakterisierung solcher Interaktionspartner, wenn bekannt, vorangetrieben werden.

Am Beispiel des RsCryB werden aber noch weitere dringende Fragen offensichtlich, vor allem bezüglich der Chemie am N5-Stickstoff des katalytischen Kofaktors. Die feste Einteilung in photolyaseartige Proteine mit der Fähigkeit zur vollen Reduktion, vermittelt durch ein Asparagin und cryptochromartige Proteine, welche in den radikalischen Zuständen FADH[•] durch Aspartat; und FAD[•] durch Cystein stabilisiert sind, scheint nicht allgemein gültig zu sein. Durch die in dieser Arbeit gezeigten Varianten der Umgebung des N5-Stickstoffs ist dieses Feld wieder weit eröffnet, da sich RsCryB genau gegenteilig verhält. Im Wildtyp ist der N5-Stickstoff nur durch ein bisher nie beobachtetes Wassermolekül koordiniert und erreicht den vollständig reduzierten Zustand. Die Aminosäure an Position 399 hat dabei großen Einfluss, so zeigt der Austausch zu Aspartat, dem vermeintlichen cryptochromartigen Typ, auf einmal die Photochemie einer Photolyase und der Austausch zu Asparagin bewirkt ein spektroskopisches Verhalten wie von tierischen Cryptochromen her erwartet. Befriedigend wird dieses Feld nur durch die strukturelle Charakterisierung der verschiedenen Redoxzuständen bei möglichst hohen Auflösungen beantwortet werden können.

Die nahe evolutionäre Verwandtschaft zwischen der CryPro-Familie und eukaryotischen Primaten stellt einen interessanten Ansatzpunkt für weitergehende phylogenetische Analysen auf. Die Mitglieder der PCSf könnte sich dabei als ein Urtyp von Nukleinsäure-Interagierenden Enzymen und Signalproteinen herausstellen.

Die in den letzten vier Jahren charakterisierte Gruppe der *dual function* Cryptochrome hat höchstwahrscheinlich ein weiteres Mitglied gefunden, die Ds(6-4). Die hohe Sequenzidentität

5. Diskussion

von 52% zum Homologen *CraCry* legt eine vergleichbare Funktion *in vivo* nahe. Dabei ist auch der mögliche Signaltransduktionsmechanismus von eminentem Interesse, in welchem höchstwahrscheinlich die elongierten Termini involviert sind. Da die bekannten Funktionsmotive in der PCSf meist den Kanal zum FAD (die katalytische Tasche bei Photolyasen) involviert könnte der Mechanismus diesen *hot spot* involvieren. allerdings in andere Weise als bei *DmCry1*, da in den Termini keine Tryptophane identifiziert wurden, die mit der katalytischen Tasche interagieren könnten. Mit Untersuchungen an verkürzten Konstrukten und weitergehenden Kristallisationsstudien, auch an den homologen, sollte dieser Frage in Zukunft nachgegangen werden.

Der beobachtete Unterschied in der Lebensdauern des angeregten Zustands der *MmCPDII* im Vergleich zur gut untersuchten *EcCPDI* stellt, zusammen mit der hier vorgestellten Analyse zur DNA-Interaktion, den Ansatzpunkt für eine genaue mechanistische Studie zur CPD-Reparatur durch dieses nicht-kanonische Enzym dar. Die Untersuchungen sollten auf das Ziel hinauslaufen, die Reparatur von Nukleosom-verpackter DNA in Eukaryoten zu verstehen. Dieser Anspruchsvollen Fragestellung kann unter anderem mit der hier etablierten Methode zur kurzzeitspektroskopischen Analyse der *MmCPDII* nachgegangen werden.

6. Literatur

1. Halliday, K. J., Martinez-Garcia, J. F., Josse, E. M., Integration of light and auxin signaling. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, **2009**, 1, a001586.
2. Li, Z. *et al.*, Sensing and responding to excess light. *Annual review of plant biology*, **2009**, 60, 239-260.
3. Montgomery, B. L., Sensing the light: photoreceptive systems and signal transduction in cyanobacteria. *Molecular microbiology*, **2007**, 64, 16-27.
4. Apel, K. & Hirt, H., Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual review of plant biology*, **2004**, 55, 373-399.
5. Weiss, D. S. & Thauer, R. K., Methanogenesis and the unity of biochemistry. *Cell*, **1993**, 72, 819-822.
6. Wolfe, R. S., My kind of biology. *Annual review of microbiology*, **1991**, 45, 1-35.
7. Merrill, A. H., Jr. *et al.*, Formation and mode of action of flavoproteins. *Annual review of nutrition*, **1981**, 1, 281-317.
8. Losi, A. & Gärtner, W., Old chromophores, new photoactivation paradigms, trendy applications: flavins in blue light-sensing photoreceptors. *Photochemistry and photobiology*, **2011**, 87, 491-510.
9. Christie, J. M., Phototropin blue-light receptors. *Annual review of plant biology*, **2007**, 58, 21-45.
10. Kiontke, S. *et al.*, Crystal structures of an archaeal class II DNA photolyase and its complex with UV-damaged duplex DNA. *The EMBO journal*, **2011**, 30, 4437-4449.
11. Larkin, M. A. *et al.*, Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, **2007**, 23, 2947-2948.
12. Hall, T. A., BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, **1999**, 41, 95-98.
13. Tamura, K. *et al.*, MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular biology and evolution*, **2007**, 24, 1596-1599.
14. UniProt Consortium, Reorganizing the protein space at the Universal Protein Resource (UniProt). *Nucleic acids research*, **2012**, 40, D71-75.

6. Literatur

15. Tamada, T. *et al.*, Crystal structure of DNA photolyase from *Anacystis nidulans*. *Nature Structural Biology*, **1997**, 4, 887-891.
16. Kort, R. *et al.*, DNA apophotolyase from *Anacystis nidulans*: 1.8 Å structure, 8-HDF reconstitution and X-ray-induced FAD reduction. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography*, **2004**, 60, 1205-1213.
17. Hartlmüller, C., A Roadmap to the Photorepair of Nucleosomes - A study of the novel class II DNA photolyases using femtosecond fluorescence spectroscopy. *Masterarbeit*, **2012**, Technische Universität München.
18. Zoltowski, B. D., Vaccaro, B. Crane, B. R., Mechanism-based tuning of a LOV domain photoreceptor. *Nature chemical biology*, **2009**, 5, 827-834.
19. Braatsch, S. *et al.*, A single flavoprotein, AppA, integrates both redox and light signals in *Rhodobacter sphaeroides*. *Molecular microbiology*, **2002**, 45, 827-836.
20. Gomelsky, M. & Klug, G., BLUF: a novel FAD-binding domain involved in sensory transduction in microorganisms. *Trends in biochemical sciences*, **2002**, 27, 497-500.
21. Bonetti, C. *et al.*, The role of key amino acids in the photoactivation pathway of the *Synechocystis* Slr1694 BLUF domain. *Biochemistry*, **2009**, 48, 11458-11469.
22. Domratcheva, T. *et al.*, Molecular models predict light-induced glutamine tautomerization in BLUF photoreceptors. *Biophysical journal*, **2008**, 94, 3872-3879.
23. Khrenova, M., Nemukhin, A. V. Domratcheva, T., Photoinduced Electron Transfer Facilitates Tautomerization of the Conserved Signaling Glutamine Side Chain in BLUF Protein Light Sensors. *The journal of physical chemistry. B*, **2013**.
24. Chaves, I. *et al.*, The cryptochromes: blue light photoreceptors in plants and animals. *Annual review of plant biology*, **2011**, 62, 335-364.
25. Sancar, A., Structure and function of DNA photolyase and cryptochrome blue-light photoreceptors. *Chemical Reviews*, **2003**, 103, 2203-2237.
26. Essen, L. O., Photolyases and cryptochromes: common mechanisms of DNA repair and light-driven signaling? *Current Opinion in Structural Biology*, **2006**, 16, 51-59.
27. Cashmore, A. R. *et al.*, Cryptochromes: blue light receptors for plants and animals. *Science*, **1999**, 284, 760-765.
28. Pokorny, R. *et al.*, Recognition and repair of UV lesions in loop structures of duplex DNA by DASH-type cryptochrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **2008**, 105, 21023-21027.

29. Selby, C. P. &ancar, A., The second chromophore in *Drosophila* photolyase/cryptochrome family photoreceptors. *Biochemistry*, **2012**, 51, 167-171.
30. Park, H. W. *et al.*, Crystal structure of DNA photolyase from *Escherichia coli*. *Science*, **1995**, 268, 1866-1872.
31. Komori, H. *et al.*, Crystal structure of thermostable DNA photolyase: pyrimidine-dimer recognition mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **2001**, 98, 13560-13565.
32. Fujihashi, M. *et al.*, Crystal structure of archaeal photolyase from *Sulfolobus tokodaii* with two FAD molecules: implication of a novel light-harvesting cofactor. *J Mol Biol*, **2007**, 365, 903-910.
33. Hitomi, K. *et al.*, Eukaryotic class II cyclobutane pyrimidine dimer photolyase structure reveals basis for improved ultraviolet tolerance in plants. *The Journal of biological chemistry*, **2012**, 287, 12060-12069.
34. Brautigam, C. A. *et al.*, Structure of the photolyase-like domain of cryptochrome 1 from *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **2004**, 101, 12142-12147.
35. Klar, T. *et al.*, Cryptochrome 3 from *Arabidopsis thaliana*: Structural and functional analysis of its complex with a folate light antenna. *J Mol Biol*, **2007**, 366, 954-964.
36. Brudler, R. *et al.*, Identification of a new cryptochrome class. Structure, function, and evolution. *Mol Cell*, **2003**, 11, 59-67.
37. Zoltowski, B. D. *et al.*, Structure of full-length *Drosophila* cryptochrome. *Nature*, **2011**, 480, 396-399.
38. Maul, M. J. *et al.*, Crystal structure and mechanism of a DNA (6-4) photolyase. *Angewandte Chemie, International Edition*, **2008**, 47, 10076-10080.
39. Hitomi, K. *et al.*, Functional motifs in the (6-4) photolyase crystal structure make a comparative framework for DNA repair photolyases and clock cryptochromes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **2009**, 106, 6962-6967.
40. Finn, R. D. *et al.*, The Pfam protein families database. *Nucleic acids research*, **2010**, 38, D211-222.
41. Moldt, J. *et al.*, Photoreduction of the folate cofactor in members of the photolyase family. *The Journal of biological chemistry*, **2009**, 284, 21670-21683.

6. Literatur

42. Payne, G. *et al.*, The active form of *Escherichia coli* DNA photolyase contains a fully reduced flavin and not a flavin radical, both in vivo and in vitro. *Biochemistry*, **1987**, 26, 7121-7127.
43. Essen, L. O. & Klar, T., Light-driven DNA repair by photolyases. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, **2006**, 63, 1266-1277.
44. Ahmad, M. & Cashmore, A. R., HY4 gene of *A. thaliana* encodes a protein with characteristics of a blue-light photoreceptor. *Nature*, **1993**, 366, 162-166.
45. Burney, S. *et al.*, Single amino acid substitution reveals latent photolyase activity in *Arabidopsis cry1*. *Angewandte Chemie*, **2012**, 51, 9356-9360.
46. Stanewsky, R. *et al.*, The cryb mutation identifies cryptochrome as a circadian photoreceptor in *Drosophila*. *Cell*, **1998**, 95, 681-692.
47. Emery, P. *et al.*, CRY, a *Drosophila* clock and light-regulated cryptochrome, is a major contributor to circadian rhythm resetting and photosensitivity. *Cell*, **1998**, 95, 669-679.
48. Okamura, H. *et al.*, Photic induction of mPer1 and mPer2 in cry-deficient mice lacking a biological clock. *Science*, **1999**, 286, 2531-2534.
49. Kume, K. *et al.*, mCRY1 and mCRY2 are essential components of the negative limb of the circadian clock feedback loop. *Cell*, **1999**, 98, 193-205.
50. Ritz, T., Adem, S., Schulten, K., A model for photoreceptor-based magnetoreception in birds. *Biophysical journal*, **2000**, 78, 707-718.
51. Biskup, T. *et al.*, Direct observation of a photoinduced radical pair in a cryptochrome blue-light photoreceptor. *Angewandte Chemie*, **2009**, 48, 404-407.
52. Liedvogel, M. *et al.*, Chemical magnetoreception: bird cryptochrome 1a is excited by blue light and forms long-lived radical-pairs. *PloS one*, **2007**, 2, e1106.
53. Ritz, T. *et al.*, Magnetic compass of birds is based on a molecule with optimal directional sensitivity. *Biophysical journal*, **2009**, 96, 3451-3457.
54. Mouritsen, H. & Hore, P. J., The magnetic retina: light-dependent and trigeminal magnetoreception in migratory birds. *Current opinion in neurobiology*, **2012**, 22, 343-352.
55. Gegear, R. J. *et al.*, Cryptochrome mediates light-dependent magnetosensitivity in *Drosophila*. *Nature*, **2008**, 454, 1014-1018.
56. Gegear, R. J. *et al.*, Animal cryptochromes mediate magnetoreception by an unconventional photochemical mechanism. *Nature*, **2010**, 463, 804-807.

57. Sancar, G. B., Enzymatic photoreactivation: 50 years and counting. *Mutation research*, **2000**, 451, 25-37.
58. Kelner, A., Effect of Visible Light on the Recovery of *Streptomyces Griseus conidia* from Ultra-violet Irradiation Injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **1949**, 35, 73-79.
59. Kelner, A., Photoreactivation of Ultraviolet-Irradiated *Escherichia coli*, with Special Reference to the Dose-Reduction Principle and to Ultraviolet-Induced Mutation. *Journal of Bacteriology*, **1949**, 58, 511-522.
60. Bayram, O. *et al.*, More than a repair enzyme: *Aspergillus nidulans* photolyase-like CryA is a regulator of sexual development. *Molecular biology of the cell*, **2008**, 19, 3254-3262.
61. Beel, B. *et al.*, News about cryptochrome photoreceptors in algae. *Plant signaling & behavior*, **2012**, 8.
62. Beel, B. *et al.*, A flavin binding cryptochrome photoreceptor responds to both blue and red light in *Chlamydomonas reinhardtii*. *The Plant cell*, **2012**, 24, 2992-3008.
63. Coesel, S. *et al.*, Diatom PtCPF1 is a new cryptochrome/photolyase family member with DNA repair and transcription regulation activity. *EMBO reports*, **2009**, 10, 655-661.
64. Heijde, M. *et al.*, Characterization of two members of the cryptochrome/photolyase family from *Ostreococcus tauri* provides insights into the origin and evolution of cryptochromes. *Plant, cell & environment*, **2010**, 33, 1614-1626.
65. Huang, Y. H. *et al.*, Crystal structure of cryptochrome 3 from *Arabidopsis thaliana* and its implications for photolyase activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **2006**, 103, 17701-17706.
66. Aubert, C. *et al.*, Intraprotein radical transfer during photoactivation of DNA photolyase. *Nature*, **2000**, 405, 586-590.
67. Brettel, K. & Byrdin, M., Reaction mechanisms of DNA photolyase. *Current Opinion in Structural Biology*, **2010**, 20, 693-701.
68. Schröder, C., Studien zur Konversion photochemischer und funktioneller Eigenschaften verschiedener Blaulichtrezeptoren. *Dissertation*, **2009**, Philipps-Universität Marburg.

6. Literatur

69. Kiontke, S., Strukturbasierte Charakterisierung von Klasse II CPD Photolyasen. *Dissertation*, **2012**, Philipps-Universität Marburg.
70. Klar, T. *et al.*, Natural and non-natural antenna chromophores in the DNA photolyase from *Thermus thermophilus*. *Chembiochem : a European journal of chemical biology*, **2006**, 7, 1798-1806.
71. Geisselbrecht, Y., Untersuchungen zur lichtgetriebenen MTHF-reduktase Aktivität von Klasse I Photolyasen. *Diplomarbeit*, **2009**, Philipps-Universität Marburg.
72. Pfeifer, G. P. & Besaratinia, A., UV wavelength-dependent DNA damage and human non-melanoma and melanoma skin cancer. *Photochemical & photobiological sciences : Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology*, **2012**, 11, 90-97.
73. Tuteja, N. *et al.*, Genotoxic stress in plants: shedding light on DNA damage, repair and DNA repair helicases. *Mutation research*, **2009**, 681, 134-149.
74. Brash, D. E., UV mutagenic photoproducts in *Escherichia coli* and human cells: a molecular genetics perspective on human skin cancer. *Photochemistry and photobiology*, **1988**, 48, 59-66.
75. Kim, J. K., Patel, D. Choi, B. S., Contrasting structural impacts induced by cis-syn cyclobutane dimer and (6-4) adduct in DNA duplex decamers: implication in mutagenesis and repair activity. *Photochemistry and photobiology*, **1995**, 62, 44-50.
76. Mees, A. *et al.*, Crystal structure of a photolyase bound to a CPD-like DNA lesion after in situ repair. *Science*, **2004**, 306, 1789-1793.
77. Husain, I. & Sancar, A., Binding of E. coli DNA photolyase to a defined substrate containing a single T mean value of T dimer. *Nucleic acids research*, **1987**, 15, 1109-1120.
78. Kiener, A. *et al.*, Purification and properties of *Methanobacterium thermoautotrophicum* DNA photolyase. *The Journal of biological chemistry*, **1989**, 264, 13880-13887.
79. Hitomi, K. *et al.*, Binding and catalytic properties of *Xenopus* (6-4) photolyase. *The Journal of biological chemistry*, **1997**, 272, 32591-32598.
80. Selby, C. P. & Sancar, A., A cryptochrome/photolyase class of enzymes with single-stranded DNA-specific photolyase activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **2006**, 103, 17696-17700.

81. Ozgur, S. & Sancar, A., Purification and properties of human blue-light photoreceptor cryptochrome 2. *Biochemistry*, **2003**, 42, 2926-2932.
82. Liu, Z. *et al.*, Dynamics and mechanism of cyclobutane pyrimidine dimer repair by DNA photolyase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **2011**, 108, 14831-14836.
83. Kao, Y. T. *et al.*, Direct observation of thymine dimer repair in DNA by photolyase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **2005**, 102, 16128-16132.
84. Kao, Y. T. *et al.*, Ultrafast dynamics of flavins in five redox states. *Journal of the American Chemical Society*, **2008**, 130, 13132-13139.
85. Johnson, E. T. & Schmidt-Dannert, C., Light-energy conversion in engineered microorganisms. *Trends in biotechnology*, **2008**, 26, 682-689.
86. Han, Y. *et al.*, A haem cofactor is required for redox and light signalling by the AppA protein of *Rhodobacter sphaeroides*. *Molecular microbiology*, **2007**, 64, 1090-1104.
87. Metz, S., Jager, A., Klug, G., In vivo sensitivity of blue-light-dependent signaling mediated by AppA/PpsR or PrrB/PrrA in *Rhodobacter sphaeroides*. *Journal of Bacteriology*, **2009**, 191, 4473-4477.
88. Hendrischk, A. K. *et al.*, A cryptochrome-like protein is involved in the regulation of photosynthesis genes in *Rhodobacter sphaeroides*. *Molecular microbiology*, **2009**, 74, 990-1003.
89. Baker, N. A. *et al.*, Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **2001**, 98, 10037-10041.
90. Emsley, P. *et al.*, Features and development of Coot. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography*, **2010**, 66, 486-501.
91. Winn, M. D. *et al.*, Overview of the CCP4 suite and current developments. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography*, **2011**, 67, 235-242.
92. Collaborative Computational Project, The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography*, **1994**, 50, 760-763.
93. Pieper, U. *et al.*, ModBase, a database of annotated comparative protein structure models, and associated resources. *Nucleic acids research*, **2011**, 39, D465-474.

6. Literatur

94. Battye, T. G. *et al.*, iMOSFLM: a new graphical interface for diffraction-image processing with MOSFLM. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography*, **2011**, 67, 271-281.
95. Leslie, A. G., The integration of macromolecular diffraction data. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography*, **2006**, 62, 48-57.
96. Adams, P. D. *et al.*, PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography*, **2010**, 66, 213-221.
97. DeLano, W. L., The PyMOL Molecular Graphics System. *DeLano Scientific, San Carlos, CA, USA.*, **2002**.
98. Kabsch, W., Xds. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography*, **2010**, 66, 125-132.
99. Taylor, R. G., Walker, D. C. McInnes, R. R., E. coli host strains significantly affect the quality of small scale plasmid DNA preparations used for sequencing. *Nucleic acids research*, **1993**, 21, 1677-1678.
100. Sambrook, J., Fritsch, E. F. Maniatis, T., Molecular cloning : a laboratory manual. **1989**, New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press.
101. Bertani, G., Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, **1951**, 62, 293-300.
102. Tartof, K. D. & Hobbs, C. A., Improved media for growing plasmid and cosmid clones. *Bethesda Lab. Res. Focus*, **1987**, 9, 12.
103. Hanahan, D., Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology*, **1983**, 166, 557-580.
104. Morrison, D. A., Transformation in *Escherichia coli*: cryogenic preservation of competent cells. *Journal of Bacteriology*, **1977**, 132, 349-351.
105. Birnboim, H. C. & Doly, J., A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic acids research*, **1979**, 7, 1513-1523.
106. Mullis, K. B. & Faloona, F. A., Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in enzymology*, **1987**, 155, 335-350.
107. Graham, D. E. & White, R. H., Elucidation of methanogenic coenzyme biosyntheses: from spectroscopy to genomics. *Natural product reports*, **2002**, 19, 133-147.

108. Bradford, M. M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, **1976**, 72, 248-254.
109. Laemmli, U. K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **1970**, 227, 680-685.
110. Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J., Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **1979**, 76, 4350-4354.
111. Kyhse-Andersen, J., Electroblothing of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *Journal of biochemical and biophysical methods*, **1984**, 10, 203-209.
112. Lovenberg, W., Buchanan, B. B., Rabinowitz, J. C., Studies on the Chemical Nature of Clostridial Ferredoxin. *The Journal of biological chemistry*, **1963**, 238, 3899-3913.
113. Fogo, J. K. & Popowsky, M., Spectrophotometric Detection of Hydrogen Sulfide. *Anal. Chem.*, **1949**, 21, 732-734.
114. Hill, A. V., The possible effects of the aggregation of the molecules of hæmoglobin on its dissociation curves. *The Journal of Physiology*, **1910**, 40, i-vii.
115. Ehrenberg, W. & Franks, A., Small-angle x-ray scattering. *Nature*, **1952**, 170, 1076-1077.
116. Henderson, R., Realizing the potential of electron cryo-microscopy. *Quarterly reviews of biophysics*, **2004**, 37, 3-13.
117. Wuthrich, K., Protein structure determination in solution by NMR spectroscopy. *The Journal of biological chemistry*, **1990**, 265, 22059-22062.
118. Gelis, I. *et al.*, Structural basis for signal-sequence recognition by the translocase motor SecA as determined by NMR. *Cell*, **2007**, 131, 756-769.
119. Berman, H. *et al.*, The worldwide Protein Data Bank (wwPDB): ensuring a single, uniform archive of PDB data. *Nucleic acids research*, **2007**, 35, D301-303.
120. Jancarik, J. & Kim, S.-H., Sparse matrix sampling: a screening method for crystallization of proteins. *Journal of Applied Crystallography*, **1991**, 24, 409-411.
121. Bergfors, T., Seeds to crystals. *Journal of structural biology*, **2003**, 142, 66-76.

6. Literatur

122. Stura, E. A. *et al.*, Crystallization studies of glycosylated and unglycosylated human recombinant interleukin-2. *Proteins*, **1992**, 12, 24-30.
123. Garman, E., 'Cool' crystals: macromolecular cryocrystallography and radiation damage. *Current Opinion in Structural Biology*, **2003**, 13, 545-551.
124. Incardona, M. F. *et al.*, EDNA: a framework for plugin-based applications applied to X-ray experiment online data analysis. *Journal of synchrotron radiation*, **2009**, 16, 872-879.
125. Massa, W., Kristallstrukturbestimmung. **2011**, Vieweg+Teubner.
126. Hendrickson, W. A., Smith, J. L., Sheriff, S., Direct phase determination based on anomalous scattering. *Methods in enzymology*, **1985**, 115, 41-55.
127. Rossmann, M. G. *et al.*, Molecular symmetry of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Journal of Molecular Biology*, **1972**, 64, 237-245.
128. Crick, F. H. C. & Magdoff, B. S., The theory of the method of isomorphous replacement for protein crystals. I. *Acta Crystallographica*, **1956**, 9, 901-908.
129. Hendrickson, W. A., Analysis of protein structure from diffraction measurement at multiple wavelengths. *Transactions of the American Crystallographic Association*, **1985**, 21.
130. Patterson, A. L., A Fourier Series Method for the Determination of the Components of Interatomic Distances in Crystals. *Physical Review*, **1934**, 46, 372-376.
131. Taylor, G., The phase problem. *Acta Crystallographica Section D*, **2003**, 59, 1881-1890.
132. Rossmann, M. G., The molecular replacement method. *Acta crystallographica. Section A, Foundations of crystallography*, **1990**, 46 (Pt 2), 73-82.
133. Afonine, P. V. *et al.*, Towards automated crystallographic structure refinement with phenix.refine. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography*, **2012**, 68, 352-367.
134. Murshudov, G. N. *et al.*, REFMAC5 for the refinement of macromolecular crystal structures. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography*, **2011**, 67, 355-367.
135. Vagin, A. A. *et al.*, REFMAC5 dictionary: organization of prior chemical knowledge and guidelines for its use. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography*, **2004**, 60, 2184-2195.

136. Brunger, A. T., Simulated Annealing in Crystallography. *Annual Review of Physical Chemistry*, **1991**, 42, 197-223.
137. Schuttelkopf, A. W. & van Aalten, D. M., PRODRG: a tool for high-throughput crystallography of protein-ligand complexes. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography*, **2004**, 60, 1355-1363.
138. Mortl, S. *et al.*, Biosynthesis of riboflavin. Lumazine synthase of *Escherichia coli*. *The Journal of biological chemistry*, **1996**, 271, 33201-33207.
139. Wacker, H. *et al.*, 4-(1'-D-Ribitylamino)-5-Amino-2,6-Dihydroxypyrimidine, the Second Product of the Riboflavin Synthetase Reaction. *The Journal of biological chemistry*, **1964**, 239, 3493-3497.
140. Dey, A. *et al.*, Solvent tuning of electrochemical potentials in the active sites of HiPIP versus ferredoxin. *Science*, **2007**, 318, 1464-1468.
141. Yeeles, J. T., Cammack, R., Dillingham, M. S., An iron-sulfur cluster is essential for the binding of broken DNA by AddAB-type helicase-nucleases. *The Journal of biological chemistry*, **2009**, 284, 7746-7755.
142. Sauguet, L. *et al.*, Shared active site architecture between the large subunit of eukaryotic primase and DNA photolyase. *PloS one*, **2010**, 5, e10083.
143. Weiner, B. E. *et al.*, An iron-sulfur cluster in the C-terminal domain of the p58 subunit of human DNA primase. *The Journal of biological chemistry*, **2007**, 282, 33444-33451.
144. Adams, P. D. *et al.*, The Phenix software for automated determination of macromolecular structures. *Methods*, **2011**, 55, 94-106.
145. Royant, A. *et al.*, Advances in spectroscopic methods for biological crystals. 1. Fluorescence lifetime measurements. *Journal of Applied Crystallography*, **2007**, 40, 1105-1112.
146. Rossmann, M. G., Moras, D., Olsen, K. W., Chemical and biological evolution of nucleotide-binding protein. *Nature*, **1974**, 250, 194-199.
147. Dodson, G. & Wlodawer, A., Catalytic triads and their relatives. *Trends in biochemical sciences*, **1998**, 23, 347-352.
148. Yan Lv, X. *et al.*, Photoreactivation of (6-4) photolyase in *Dunaliella salina*. *FEMS microbiology letters*, **2008**, 283, 42-46.

6. Literatur

149. Glas, A. F. *et al.*, The archaeal cofactor F0 is a light-harvesting antenna chromophore in eukaryotes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **2009**, 106, 11540-11545.
150. Kuchta, R. D. & Stengel, G., Mechanism and evolution of DNA primases. *Biochimica et biophysica acta*, **2010**, 1804, 1180-1189.
151. Ashkenazy, H. *et al.*, ConSurf 2010: calculating evolutionary conservation in sequence and structure of proteins and nucleic acids. *Nucleic acids research*, **2010**, 38, W529-533.
152. Kavakli, I. H. & Sancar, A., Analysis of the role of intraprotein electron transfer in photoreactivation by DNA photolyase in vivo. *Biochemistry*, **2004**, 43, 15103-15110.
153. Li, X. *et al.*, *Arabidopsis cryptochrome 2 (CRY2)* functions by the photoactivation mechanism distinct from the tryptophan (trp) triad-dependent photoreduction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **2011**, 108, 20844-20849.
154. Balland, V. *et al.*, What Makes the Difference between a Cryptochrome and DNA Photolyase? A Spectroelectrochemical Comparison of the Flavin Redox Transitions. *Journal of the American Chemical Society*, **2009**, 131, 426-+.
155. Perrin, C. L. & Nielson, J. B., "Strong" hydrogen bonds in chemistry and biology. *Annual Review of Physical Chemistry*, **1997**, 48, 511-544.
156. Gindt, Y. M. *et al.*, Origin of the transient electron paramagnetic resonance signals in DNA photolyase. *Biochemistry*, **1999**, 38, 3857-3866.
157. Agarkar, V. B. *et al.*, Crystal structure of the C-terminal domain of human DNA primase large subunit: implications for the mechanism of the primase-polymerase alpha switch. *Cell cycle*, **2011**, 10, 926-931.
158. Bacher, A. *et al.*, Biosynthesis of riboflavin: structure and mechanism of lumazine synthase. *Biochemical Society transactions*, **1996**, 24, 89-94.
159. Gast, R. & Lee, J., Isolation of the in vivo emitter in bacterial bioluminescence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **1978**, 75, 833-837.
160. Lee, J., Lumazine protein and the excitation mechanism in bacterial bioluminescence. *Biophysical chemistry*, **1993**, 48, 149-158.

161. O'Kane, D. J. & Lee, J., Chemical characterization of lumazine protein from *Photobacterium leiognathi*: comparison with lumazine protein from *Photobacterium phosphoreum*. *Biochemistry*, **1985**, 24, 1467-1475.
162. Sato, Y. *et al.*, Crystal structures of the lumazine protein from *Photobacterium kishitanii* in complexes with the authentic chromophore, 6,7-dimethyl- 8-(1'-D-ribityl) lumazine, and its analogues, riboflavin and flavin mononucleotide, at high resolution. *Journal of Bacteriology*, **2010**, 192, 127-133.
163. Oberpichler, I. *et al.*, A Photolyase-Like Protein from *Agrobacterium tumefaciens* with an Iron-Sulfur Cluster. *PloS one*, **2011**, 6, e26775.
164. Banerjee, R. *et al.*, The signaling state of *Arabidopsis* cryptochrome 2 contains flavin semiquinone. *The Journal of biological chemistry*, **2007**, 282, 14916-14922.
165. Bouly, J. P. *et al.*, Cryptochrome blue light photoreceptors are activated through interconversion of flavin redox states. *The Journal of biological chemistry*, **2007**, 282, 9383-9391.
166. Fruhwirth, S., Teich, K. Klug, G., Effects of the cryptochrome CryB from *Rhodobacter sphaeroides* on global gene expression in the dark or blue light or in the presence of singlet oxygen. *PloS one*, **2012**, 7, e33791.
167. Metz, S. *et al.*, Interaction of two photoreceptors in the regulation of bacterial photosynthesis genes. *Nucleic acids research*, **2012**, 40, 5901-5909.
168. Zhang, F. *et al.*, Role of Lys281 in the *Dunaliella salina* (6-4) photolyase reaction. *Current microbiology*, **2011**, 62, 146-151.
169. Petersen, J. L. & Ronan, P. J., Critical role of 7,8-didemethyl-8-hydroxy-5-deazariboflavin for photoreactivation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *The Journal of biological chemistry*, **2010**, 285, 32467-32475.

7. Anhang

7.1. Abkürzungsverzeichnis

Tab. 7.1: Abkürzungen der 20 proteinogenen Aminosäuren.

Aminosäure	Dreibuchstaben Code	Einbuchstaben Code
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin / Aspartat	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure /Glutamat	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

Tab. 7.2: Häufig verwendete Abkürzungen.

Abkürzung	Name
(6-4)	(6-4)-Pyrimidin-pyrimidon-photoprodukt im Kontext auch (6-4)-Photolyase
8-HDF	8-Hydroxy-5-Deazaflavin
Å	Ångström = 1×10^{-10} m
AnCPDI	Klasse I CPD-Photolyase aus <i>Anacystis nidulans</i>
AnCryA	<i>dual function</i> Cryptochrom aus <i>Aspergillus nidulans</i>
Am	Ammonium
AS	Aminosäure(n)
APS	Ammoniumperoxosulfat
AtCry1	Cryptochrom 1 aus <i>Arabodopsis thaliana</i>
AtCry3	Cryptochrom 3 oder CryDASH aus <i>Arabodopsis thaliana</i>
AtCryDASH	Cryptochrom (<i>Drosophila Arabidopsis Synechocystis Human</i>) aus <i>Arabodopsis thaliana</i> , vgl. AtCry3
au	Absorptionseinheiten (engl. <i>absorption units</i>)
bp	Basenpaar(e) (engl. <i>base pairs</i>)
Cam	Chloramphenicol
CD	Circular Dichroismus
CPD	<i>cis,syn</i> -Cyclobutanpyrimidindimer
CPDI	Klasse I CPD-Photolyase
CPDII	Klasse II CPD-Photolyase
CraCry	<i>dual function (animal like)</i> Cryptochrom aus <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>
CryPro	Proteobakterielle Cryptochrome
Da	Dalton = g/mol
DLZ	6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin
DNA	Desoxyribonkleinsäure (engl. <i>desoxyribonucleic acid</i>)
Dm(6-4)	(6-4)-Photolyase aus <i>Drosophila melanogaster</i>
DmCry1	Typ I Cryptochrom aus <i>Drosophila melanogaster</i>

7. Anhang

Abkürzung	Name
<i>Ds</i> (6-4)	(6-4)-Photolyase aus <i>Dunaliella salii</i>
dsDNA	doppelsträngige DNA (engl. <i>double stranded</i>)
DTT	D,L-Dithiothreitol,
<i>Ec</i> CPDI	Klasse I CPD-Photolyase aus <i>Escherichia coli</i>
EtOH	Ethanol
FAD	Flavin-Adenindinukleotid
FMN	Flavinmononukleotid
IMAC	Immobilisierte Metallionen-Affinitäts-Chromatographie (engl. <i>immobilized metal ion affinity chromatography</i>)
IRDye700	Fluoreszenzmarkierung für DNA-Oligomere, Fa. Metabion
Kan	Kanamycin
MeOH	Methanol
<i>Mm</i> CPDII	Klasse II CPD-Photolyase aus <i>Methanosarcina mazei</i>
MTHF	Methenyl-tetrahydrofolat
NTA	Nitrilotriessigsäure
PEG	Polyethylenglycol
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl. <i>rotations per minute</i>)
<i>Rs</i> CryB	Cryptochrom B aus <i>Rhodobacter sphaeroides</i>
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl. <i>sodium dodecylsulfate</i>)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCSf	Photolyase/Cryptochrom-Superfamilie
SEC	Größenausschlusschromatographie, Gelfiltration (engl. <i>size exclusion chromatography</i>)
ssDNA	einzelsträngige DNA (engl. <i>single stranded</i>)
Tab.	Tabelle
TCSPC	<i>Time correlated single photon counting</i> , Methode der verwendeten Ultrakurzzeitspektroskopie
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin

Abkürzung	Name
TrCPDI	Klasse I CPD-Photolyase aus <i>Thermus thermophilus</i>
ÜNK	Übernachtkultur
v/v	Volumen auf Volum
w/v	Gewicht auf Volumen (<i>engl. weight per volume</i>)
λ	Wellenlänge

7.2. Proteinsequenzen

Im Folgenden sind die Wildtyp Proteinsequenzen der in dieser Arbeit produzierten und gereinigten Proteine inklusive His₆tags (unterstrichen) angegeben. Die Affinitätsvermittelnde Sequenz hat eine Länge von 20 AS und ist stets an den N-Terminus der Proteinsequenz angefügt worden. Auf Veränderungen hinsichtlich der in der Uniprot-Datenbank hinterlegten Sequenz wird explizit hingewiesen und die entsprechenden Aminosäuren sind kursiv hervorgehoben.

7.2.1. RsCryB

<u>MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHM</u> <u>LTRLI</u> LVLGDQLSDDLPAALRAADPAADLVVMAEVMEEGT	60 (39)
<u>YVPHHPQKIALI</u> LAAMRKFARRLQERGFVAYSRLDDPDTGPSIGAE LLRRAAETGAREA	120 (99)
<u>VATRPGDWRLIEALE</u> AMPLPVRF LPDDRFLCPADEFARWTEGRKQLRMEWFYREMRRTG	180 (159)
<u>LLMEGDEPAGGKWN</u> FDTENRKPAAPDLLRPRPLRFEPDAEVRVLDLVEARFPRHFGRRLR	240 (219)
<u>PFHWATDRAEALRAL</u> DHFIRESLPRFGDEQDAMLADDPFLSHALLSSSMNLGLLGPMEVC	300 (279)
<u>RRAETEWREGRAPL</u> NAVEGFIRQILGWREYVIRGIWTLSPDYIRSNGLGHSAALPPLYWG	360 (339)
<u>KPTRMACLSAAVAQ</u> TRDLAYAHHIQRLMVTGNFALLAGVDPAEVHEWYLSVYIDALEWVE	420 (399)
<u>APNTIGMSQFADH</u> GLLGSKPYVSSGAYIDRMSDYCRGCAYAVKDRTGPRACPFNLLYWHF	480 (459)
<u>LNRHRARFERNPRM</u> VQMYRTWDRMEE THRARVLTEAEAFGLRLHAGEPV.	529 (508)

Aufgrund der Klonierungsstrategie ist Leucin 22 in die Wildtypsequenz (nach Q3IXP1) insertiert worden. Die in der Struktur **3ZXS** definierten Reste sind grau hinterlegt. Die strukturelle Nummerierung beginnt bei Leucin 22→1 und ist in Klammern angegeben

7.2.2. *MmCPDII*

<u>MGSSHHHHHHSSGLVPRGSH</u> MNPKRIRALKSGKQGDGPVVYWMSRDQRAEDNWALLFSRA	60
IAKEANVPVVVVFCLTDEFLEAGIRQYEFMLKGLQELEVLSRKKIPSFFLRGDPGEKIS	120
RFVKDYNAGTLVTDSPLRIKNQWIEKVISGISIPFFEVDAHNVVPCWEASQKHEYAAHT	180
FRPKLYALLPEFLEEFPELEPNSVTPELSAGAGMVETLSDVLETGVKALLPERALLKKNKD	240
PLFEPWHFEPGEKAAKVMESFIADRLDSYGALRNDPTKNMLSNLSPYLHFGQISSQRVV	300
LEVEKAESNPGSKKAFLDEILIWKEISDNFCYYPGYDGFESFSPWAKESLNAHRNDVRS	360
HIYTLLEFEAGKTHDPLWNASQMELLSTGKMHGYMRTYWAKKILEWSESEPEKALEIAICL	420
NDRYELDGRDPNGYAGIAWSIGGVHDRAWGEREVTGKIRYMSYEGCKRKFVVKLYIEKYS	480
AL.	482

Die ersten beiden AS der unter Q8PYK9 hinterlegten Sequenz sind deletiert. An Position 397 ist Methionin zu Threonin ausgetauscht.

7.2.3. *Ds(6-4)*

<u>MGSSHHHHHHSSGLVPRGSH</u> MLRCAQPKYAPLKRQAFNQKLNRLVAAARTPSKSSSTSRM	60
ASTSSGQQGRSILWFRKGLRLHDNPALRDACTGSAAVFPIFIIIDPYFLQKSNNKVGVNRY	120
QFLLESLSDLNSSLTSLGSQLLVLRGTPEEVI PRVLRDWSIKKLCYEIDTEPYAKARDAR	180
VDDMAREAGVEVKKHWSHTLYDTDMLVRENKGKAPLTMQAFEKLVDRVGHPLTALPAPTA	240
RLPPVDVSLPGIKDAEVEGVPWTWQEMGFKEAPTAFKGGETEALKRLEHYMKDTKWVASFE	300
KPSTDPSAFTEPSTTALSPLYLKFGLSARFFHQRLLDVYRLHPKHSQPPMSLRGQLLWRE	360
FFYTLGSHTPNFDRIAGNPICRQITWDTNPALLKAWRDGATGYPWIDAAMTQLREWGWMH	420
HLARHSVACFLTRGDLYLSWESGKEVFEELLLDADYFINAANWMWLSASAFFAQYFRVYS	480
PVVFQKKYDKEGAYIRKFLPVLKDMPAKYIYEPWTAPKEVQQRANCIIGRDYPAPIVDHA	540
VASKECIARMGAAYKATNTGGSAGKASPAKAASSGDAGTSASAGAPSSSKKTTGKRAASA	600
DQGGKRQKTLEESMTKKRCQ.	620

7.4. Ergebnis des SilverBullet-Screenings

Der SilverBullet-Screen (SB-Screen) vom Hampton Research wurde für *R_sCryB* mit der Bedingung SB1 (0.1 mol/L HEPES pH 7.5, 0.1 mol/L AmSO₄, 30% (v/v) PEG 400) durchgeführt. Bei einem positiven Ergebnis, also bei Kristallbildung, wurde mit der gesamten Bedingungen und bei Bedingungen mit mehreren Zusätzen einzelne Reproduktion durchgeführt. Dabei wurden neben der im Ergebnisteil beschriebenen Bedingung mit 0.2% (w/v) Kongorot, weitere Kleinmoleküle identifiziert, welche *R_sCryB* in dieser Bedingung zur Kristallisation verhelfen. Das Ergebnis des Screenings ist in der unten stehenden Tab. 3.3 aufgelistet.

Tab. 7.3: Ergebnis des SilverBullet-screenings von *R_sCryB* mit Bedingung SB1.

Initiale Bedingung im SilverBullet-Screen	Identifizierter Zusatz	Diffraktion
Bedingung C2 (26): 0.33% (w/v) Koffein, 0.33% (w/v) Dithioerythritol, 0.33% (w/v) L-Methionin	Reproduktion nicht erfolgreich.	---
Bedingung E4 (52): 1% w/v Protaminsulfat	Reproduktion nicht erfolgreich.	---
Bedingung F4 (64): 0.2% (w/v) L-Arginin, 0.2% (w/v) L-Canavanin, 0.2% (w/v) L-Carnitin-hydrochlorid, 0.2% (w/v) L-Citrullin, 0.2% (w/v) Taurin	Reproduktion nur mit gesamter Bedingung erfolgreich.	Kristalle zeigten keine Diffraktion.
Bedingung F6 (66): 0.2% (w/v) 2-Methyl-2,4-pentandiol, 0.2% (w/v) 1,2,3-Heptanetriol, 0.2% (w/v) Diethylen-triamin-pentakis(methylphosphonsäure), 0.2% (w/v) D-Sorbitol, 0.2% (w/v) Glycerin	Reproduktion nicht erfolgreich, Diethylen-triamin-pentakis(methylphosphonsäure) wurde nicht eingesetzt.	---
Bedingung F9 (69): 0.2% (w/v) 6-Aminohexansäure, 0.2% (w/v) Benzamidin-hydrochlorid, 0.2% (w/v) Kongorot, 0.2% (w/v) Nikotinamid, 0.2% (w/v) Salicin,	Reproduktion mit gesamter Bedingung und Kongorot 0.2% (w/v) erfolgreich.	Diffraktion bis 3.3 Å, Raumgruppe C121, siehe Ergebnisse.

Initiale Bedingung im SilverBullet-Screen	Identifizierter Zusatz	Diffraktion
Bedingung 71:		
0.25% (w/v) Natrium 1-Pentansulfonat monohydrat, 0.25% (w/v) 4-Aminobutansäure, 0.25% (w/v) Cytosin, 0.25% (w/v) Salicylamid	Reproduktion nicht erfolgreich.	---

8. Danksagung

Zuerst möchte ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Essen für die Möglichkeit, in der AG Essen zu promovieren und für die Unterstützung während der letzten Jahre danken.

Ein großer Dank geht auch an Herrn Prof. Batschauer für die bereitwillige Übernahme des Zweitgutachtens und die Möglichkeit, gerade zu Beginn der Promotion entscheidende Experimente in der AG Batschauer durchführen zu können. In diesem Zusammenhang gebührt auch Herrn Dr. Pokorny ein großes Danke für die Unterstützung bei den EMSAs.

Herrn Prof. Hamppe danke ich für die nicht selbstverständliche Teilnahme an der Prüfungskommission trotz des nahenden Osterurlaubs.

Der massenspektrometrischen Abteilung des Fachbereichs Chemie unter Leitung von Dr. Uwe Linne gilt meine Verbundenheit für die kompetente Analyse und Mithilfe bei der Identifizierung des DLZ.

Meinen Kooperationspartner Korbinian Heil, AG Carell, LMU-München (Analyse der (6-4)-Aktivität), sowie Sebastian Frühwirth, AG Klug, JLU-Gießen (Kooperation auf dem Themengebiet *RsCryB*) danke ich für die durchgeführten Arbeiten und zur Verfügung gestellten Materialien, die diese Arbeit ermöglicht haben.

Ein besonderer Dank auch an Frau Prof. Michel-Beyerle und ihr Labor an der NTU Singapur, wobei Dr. Reinhard Haselsberger und Christoph Hartlmüller hervorzuheben sind, für die Möglichkeit das spannende Gebiet der ultrakurzen Zeiten kennlernen zu dürfen.

Frau Dr. Schröder danke ich für die Vorarbeiten auf dem Themengebiet des *RsCryB* und der *Ds(6-4)* und die bereitwillige Übergabe der Themen in meine Hände.

Insbesondere möchte ich hier die Unterstützung von Herrn Dr. Kiontke hervorheben, mit dem ich zusammen das Themengebiet der (Blaulicht-)Photorezeptoren untersucht habe.

Der gesamten AG Essen, die während meiner Promotion die folgenden Personen umfasste: Katrin Anders, Petra Gnau, Wolfgang Große, Silke vonHorsten, Vitali Kalugin, Stephan Kiontke, Michael Kock, Timo Kraushaar, Manuel Maestre-Reyna, Barbara Mertins, Ralf Poeschke, George Psakis und Maik Veelders. danke ich für die tolle Atmosphäre und kollegiale Unterstützung während meiner Zeit auf G3. Ich bitte zu entschuldigen, dass ich nicht auch alle Ehemaligen, Diplomanden, Masteranden und Bacheloranden persönlich erwähne, aber auch Euch gilt mein Dank, jede(r) Einzelne hat Erinnerungen hinterlassen. Natürlich gilt mein Dank allen Vertiefungsstudenten, namentlich Erman Koçak, Christin Schönfeld, Andreas Mielcarek, Lara Golde, Benjamin Weiler, Sabrina Fischer und Elisabeth Ignatz, die alle ihr Möglichstes zum Projekt beigetragen und es immer wieder vorangebracht haben.

Meinen langjährigen Freunden vom Server (*Blackknight*, *Ferliöp*, *isis*, *Pazifist*, *nox*, *UnknownAlien*) sowie Fidi, Kristian, Marc, Nick, Pascal, Till und Wenjie möchte ich für jede Doppelkopfrunde in der Mensa und die schöne Zeit in Marburg danken. Besonderer Dank auch an Josephine Diewitz und Sven DeCausmaecker für die tolle Freundschaft vom Anbeginn der (Uni-) Zeit.

Meinen Eltern Peter und Bärbel, sowie meinem Bruder Joris danke ich für die familiäre Unterstützung während der Doktorarbeit.

Zum Schluss möchte ich Femke für den Halt im Leben und für die mir fortwährend gegebene Liebe danken, ohne Dich wäre die Zeit schwerer, wenn nicht unschaffbar gewesen.