

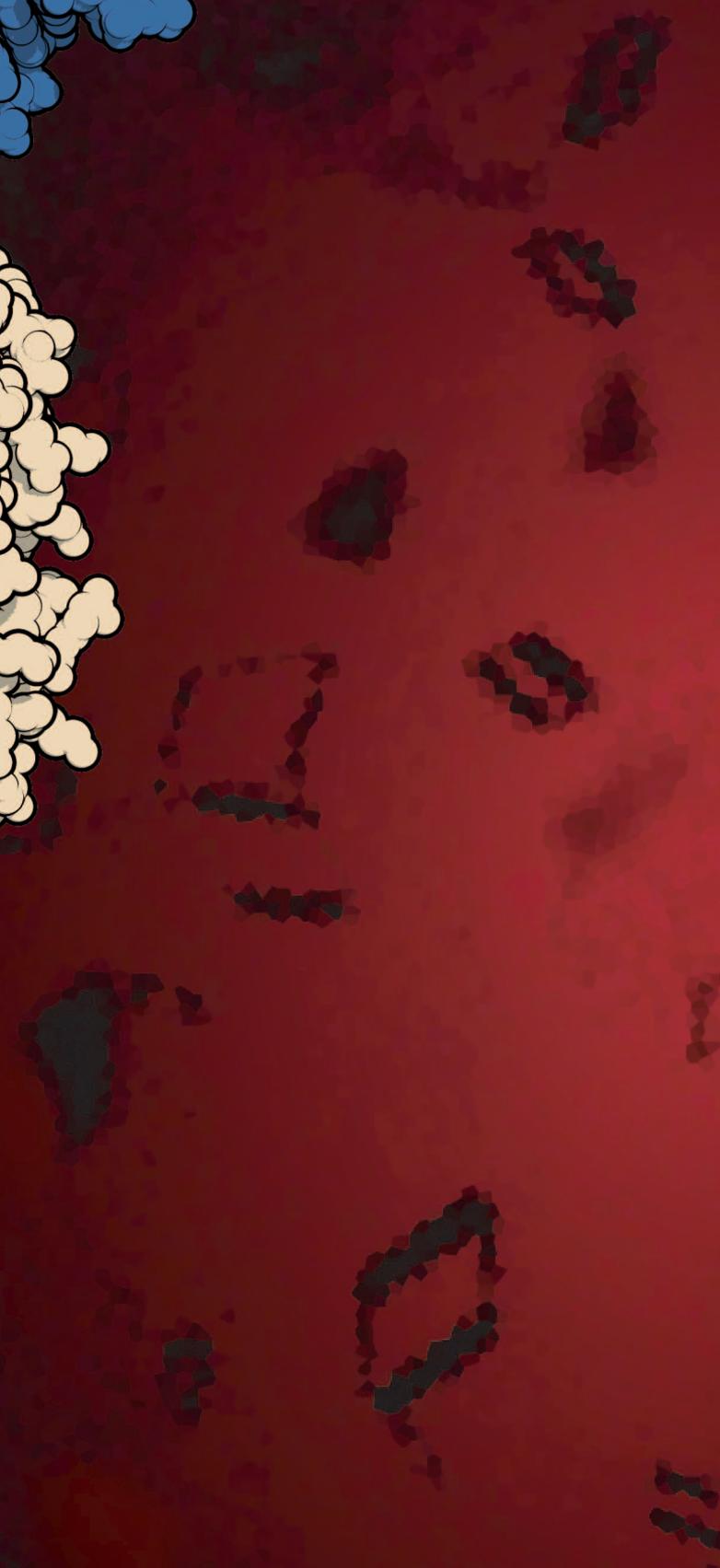
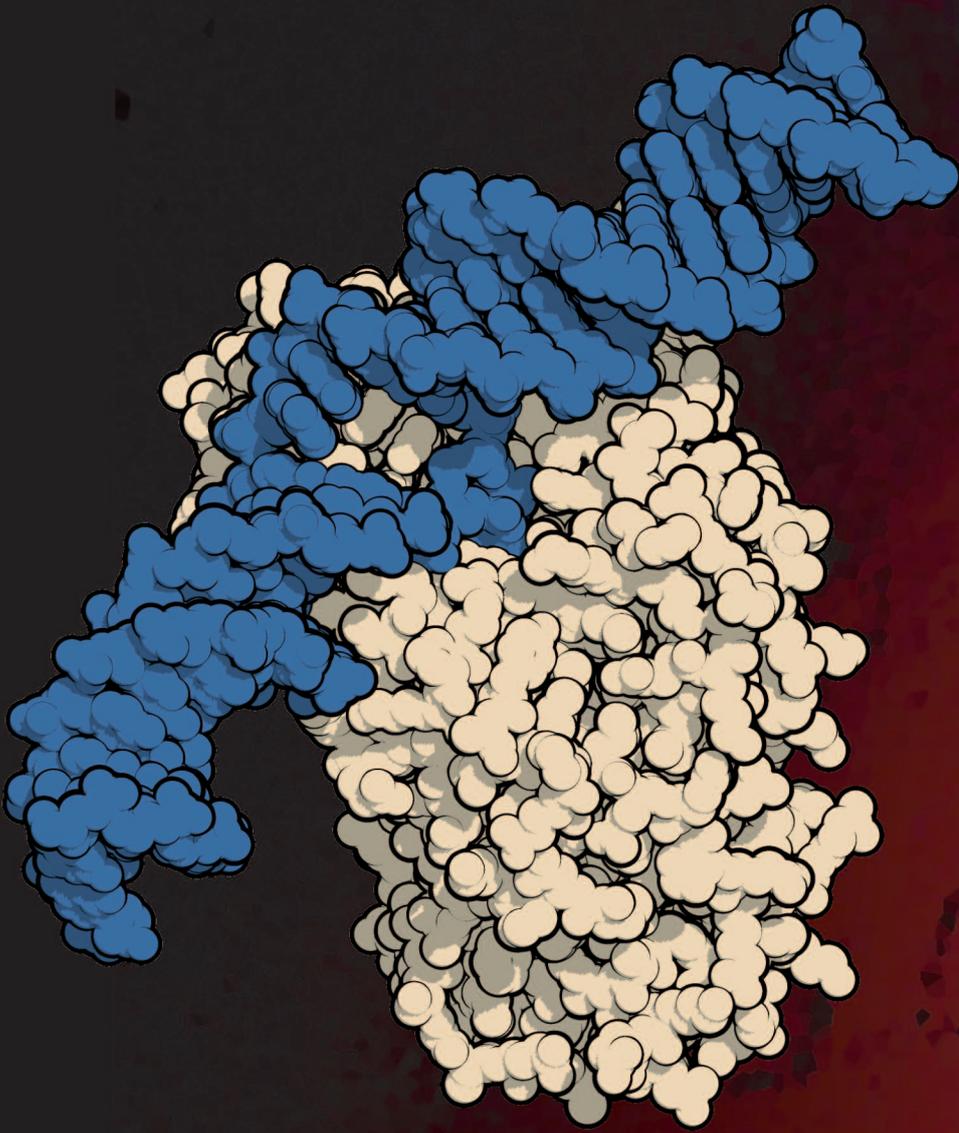
Strukturbasierte Charakterisierung von Klasse II CPD Photolyasen

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

**dem Fachbereich Chemie
der Philipps-Universität Marburg**

**vorgelegt von
Stephan Kiontke**

**Marburg an der Lahn
2012**



Strukturbasierte Charakterisierung von Klasse II CPD Photolyasen

Dissertation

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

**dem Fachbereich Chemie
der Philipps-Universität Marburg**

**vorgelegt von
Stephan Kiontke**

Marburg an der Lahn

2012

Die vorliegende Dissertation wurde unter Betreuung von Herrn Prof. Dr. Lars-Oliver Essen von November 2007 bis September 2012 am Fachbereich Chemie der Philipps-Universität Marburg angefertigt.

Vom Fachbereich Chemie der Philipps-Universität Marburg (Hochschulkennziffer 1180)

als Dissertation angenommen am:

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

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

Erklärung

Ich versichere, dass ich meine vorliegende Dissertation mit dem Titel

**„Strukturbasierte Charakterisierung
von Klasse II CPD 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 einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen in- oder ausländischen Hochschule anlässlich eines Promotionsgesuchs oder zu anderen Prüfungszwecken eingereicht habe.

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

Marburg, 28.09.2012

(Stephan Kiontke)

Teile dieser Arbeit sind Bestandteil der folgenden Publikationen

Kiontke S, Geisselbrecht Y, Pokorny R, Carell T, Batschauer A & Essen L-O (2011)

Crystal structures of an archaeal class II DNA photolyase and its complex with UV-damaged duplex DNA. EMBO J **30**, 4437-49.

Kiontke S, Batschauer A & Essen L-O

The antenna chromophore of an archaeal class II photolyase is ubiquitous in life.

Manuskript in Vorbereitung.

Weitere Publikation

Anders K, von Stetten D, Mailliet J, Kiontke S, Sineshchekov V A, Hildebrandt P, Hughes J & Essen L-O (2011)

Spectroscopic and photochemical characterization of the red-light sensitive photosensory module of Cph2 from Synechocystis PCC 6803. Photochem Photobiol **87**, 160-73.

Konferenzbeiträge (Poster)

Gordon Research Seminar & Gordon Research Conference (2012)

“Photosensory Receptors & Signal Transduction”

Kiontke S, Geisselbrecht Y, Pokorny R, Carell T, Batschauer A & Essen L-O

Class II photolyases from Methanosarcinales:

new light on light-driven DNA repair in eukaryotes

Molecular Life Science (2011)

Kiontke S, Geisselbrecht Y, Pokorny R, Carell T, Batschauer A & Essen L-O

Structural insights into a class II photolyase: A new theme of light-driven DNA repair

SYNMIKRO-Fachtagung (2011)

Kiontke S, Geisselbrecht Y & Essen L-O

Modifikation von Flavoproteinen: Artifizielle Chromophore und Fusionen

In der RCSB PDB deponierte Proteinstrukturen

Kiontke S, Geisselbrecht Y, Pokorny R, Carell T, Batschauer A & Essen L-O

2XRY

X-ray structure of archaeal class II CPD photolyase
from *Methanosarcina mazei*

2XRZ

X-ray structure of archaeal class II CPD photolyase
from *Methanosarcina mazei* in complex with intact CPD-lesion

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
Summary	3
1 Einleitung	5
1.1 UV-induzierte DNA-Schäden und lichtgetriebene Reparaturenzyme	5
1.2 Übersicht über die Phr/Cry-Familie.....	8
1.3 CPD-Photolyasen des Klasse II Subtyps	9
1.4 Globale Enzymarchitektur der Phr/Cry-Familie.....	11
1.5 Katalytischer Kofaktor und Antennenchromophor	12
1.6 Photoaktivierung in der Phr/Cry-Familie.....	16
1.7 DNA-Bindung und Reparaturmechanismus der CPD-Photolyasen	19
1.8 Motivation und Zielsetzung.....	24
1.9 Terminologie der charakterisierten Photolyasen	25
2 Materialien	26
2.1 Geräte	26
2.1.1 Allgemein	26
2.1.2 UV/Vis- und Fluoreszenzspektroskopie.....	28
2.1.3 Proteinkristallisation.....	28
2.2 Chemikalien	29
2.3 Chemikalien für die Proteinkristallisation	30
2.4 Kulturmedien (flüssig)	30
2.4.1 LB-Medium	30
2.4.2 TB-Medium	30
2.4.3 SOC-Medium	31
2.5 Kulturmedium (fest)	31
2.5.1 LB-Agar	31
2.6 Stammlösungen.....	31
2.7 <i>E. coli</i> Stämme	32
2.8 Vektoren.....	32
2.9 Oligonukleotide.....	33
2.9.1 Oligonukleotide für die Proteinkristallisation	33
2.9.2 Primer	33
2.10 Puffer	34
2.10.1 Affinitätschromatographie	34
2.10.2 Gelfiltration	35
2.10.3 Puffer für die Photoreduktion.....	35
3 Methoden	36
3.1 Molekularbiologische Methoden	36
3.1.1 Bestimmung der DNA-Konzentration	36
3.1.2 Hybridisierung komplementärer DNA.....	36
3.1.3 Sequenzierung von DNA-Abschnitten.....	36
3.1.4 Amplifikation eines Genabschnitts aus genomischer DNA	37
3.1.5 Hydrolytische Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen.....	37
3.1.6 Agarosegelelektrophorese	37
3.1.7 Extraktion von DNA aus Agarosegelen	38
3.1.8 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	38
3.1.8.1 Plasmidpräparation mittels Alkoholpräzipitation.....	38
3.1.8.2 Plasmidpräparation unter Verwendung des Qiagen-Kits	39

3.1.9 Übertragung freier Plasmid-DNA in das <i>E. coli</i> Expressionssystem.....	39
3.1.9.1 Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> Zellen.....	39
3.1.9.2 Herstellung elektrokompeter <i>E. coli</i> Zellen	40
3.1.9.3 Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> Zellen	40
3.1.9.4 Transformation elektrokompeter <i>E. coli</i> Zellen	41
3.1.9.5 Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i> Zellen	41
3.1.9.6 Co-Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i> Zellen	41
3.2 Proteinbiochemie Methoden.....	42
3.2.1 Bestimmung der Proteinlöslichkeit	42
3.2.2 Produktion und Aufreinigung von rekombinanten Photolyasen	42
3.2.3 Ankonzentrieren der Proteinproben	45
3.2.4 Polyacrylamid-Gelelektrophorese	45
3.2.5 Proteinkonzentrationsbestimmung	46
3.2.6 <i>In vitro</i> Rekonstitution der apoMmCPDII.....	46
3.2.7 UV/Vis-Spektroskopie	47
3.2.7.1 Aufnahme von Absorptionsspektren	48
3.2.7.2 Photoreduktion der MmCPDII und der MmCPDII-Mutanten	48
3.2.7.3 Bestimmung von Photoreduktionskinetiken	48
3.2.8 <i>In crystallo</i> UV/Vis-Spektroskopie	49
3.2.9 Fluoreszenz-Spektroskopie	49
3.2.10 Transiente EPR-Spektroskopie der MmCPDII.....	49
3.2.11 Zeitaufgelöste UV/Vis-Absorptionsspektroskopie der MmCPDII.....	50
3.2.12 Überprüfung der Reparaturaktivität und Bestimmung der Affinität zu DNA	51
3.3 Proteinkristallisation & Strukturanalyse – Generelle Aspekte	53
3.3.1 Proteinkristallisation.....	53
3.3.2 Das Phasenproblem der Kristallstrukturanalyse	54
3.3.3 Lösung des Phasenproblems	57
3.4 Proteinkristallisation und Strukturanalyse – Praktische Umsetzung.....	60
3.4.1 Verwendung von Sicherheitslicht	60
3.4.2 Kokristallisation der MmCPDII mit CPD-DNA	60
3.4.3 Robotergestütztes Hochdurchsatz-Screening.....	60
3.4.4 Optimierung und Reproduktion von Proteinkristallen	61
3.4.5 Soaking von apoMmCPDII-Kristallen mit 8-HDF.....	61
3.4.6 Datensammlung.....	62
3.4.7 Datenprozessierung	62
3.4.8 Lösen des Phasenproblems mittels PHASER	63
3.4.9 Strukturbau und -verfeinerung.....	64
3.4.10 Darstellung der Strukturen	65
3.5 Phylogenetische Analyse	65
4 Ergebnisse	66
4.1 Phylogenetische Einordnung der MmCPDII	66
4.2 Klonierung, heterologe Expression und Aufreinigung der apoMmCPDII	67
4.3 UV/Vis-Spektrum, Photoreduktion und DNA-Reparatur der apoMmCPDII	68
4.4 DNA-Bindungsverhalten der MmCPDII.....	69
4.5 <i>In vitro</i> Rekonstitution der apoMmCPDII	70
4.6 Ergebnisse der transienten EPR-Spektroskopie	71
4.6.1 Radikalpaargenerierung in der MmCPDII.....	71
4.6.2 Radikalpaargenerierung des apoMmCPDII•CPD-DNA Komplexes	73
4.7 Ergebnisse der zeitaufgelösten UV/Vis-Absorptionsspektroskopie.....	74
4.8 Klonierung der FO-Synthase und Aufreinigung der Holophotolyasen	77
4.9 Spektroskopische Charakterisierung der holoMmCPDII	78

4.10 <i>In vivo</i> Rekonstitution unterschiedlicher Photolyasen.....	79
4.11 Proteinkristallisation.....	80
4.11.1 Kristallisation der apo <i>Mm</i> CPDII.....	80
4.11.2 Kristallisation des <i>Mm</i> CPDII•CPD-DNA Komplexes.....	81
4.11.3 Kristallisation der holo <i>Mm</i> CPDII.....	82
4.12 Strukturlösung und Verfeinerung.....	82
4.12.1 <i>Mb</i> CPDII.....	82
4.12.2 apo <i>Mm</i> CPDII.....	83
4.12.3 <i>Mm</i> CPDII•CPD-DNA Komplex.....	83
4.12.4 <i>Mm</i> CPDII•8-HDF _{soak}	84
4.12.5 <i>Mm</i> CPDII•8-HDF Komplex.....	84
4.12.6 Datensammlung, Strukturlösung und Verfeinerung der <i>Mm</i> CPDII-Strukturen....	85
4.13 Kristallstruktur der Photolyase aus <i>Methanosarcina mazei</i>.....	86
4.14 Details der FAD-Bindungstasche.....	87
4.15 Der Elektronentransfer in <i>Mm</i>CPDII.....	89
4.16 <i>In crystallo</i> UV/Vis-Spektroskopie.....	91
4.17 Struktur des <i>Mm</i>CPDII•CPD-DNA Komplexes.....	92
4.18 Details der Klasse II CPD-Bindungstasche.....	94
4.19 <i>Soaking</i> von apo<i>Mm</i>CPDII-Kristallen mit 8-HDF.....	97
4.20 Struktur des <i>in vivo</i> rekonstituierten <i>Mm</i>CPDII•8-HDF Komplexes.....	98
5 Diskussion.....	101
5.1 Eine archaeale Photolyase als Modell für eukaryotische Enzyme.....	101
5.2 Photolyaseaktivität und Struktur der <i>Mm</i>CPDII.....	102
5.3 Konservierte Funktionsprinzipien – Strukturelle Unterschiede.....	104
5.3.1 Stabilisierung des katalytischen Kofaktors.....	105
5.3.2 Der Elektronenweg des Klasse II Subtyps.....	107
5.3.3 Evolution der Photolyasenkatalyse.....	108
5.4 DNA-Bindungsmodus des Klasse II Subtyps.....	111
5.5 Der intakte CPD-Schaden in der Bindungstasche.....	115
5.6 Strukturelle Unterschiede innerhalb des Klasse II Subtyps.....	117
5.7 Der Antennenchromophor der <i>Mm</i>CPDII.....	119
5.8 FO-Bindungsmuster des Klasse II Subtyps.....	122
5.9 Schlussfolgerungen für den Klasse II Subtyp.....	124
6 Fazit & Ausblick.....	129
7 Literatur.....	130
Danksagung.....	141
Anhang.....	143

Zusammenfassung

CPD-Photolyasen sind substratspezifische, lichtgetriebene DNA-Reparaturenzyme, die mit der Energie des Sonnenlichts (300 nm – 500 nm) den UV-induzierten Hauptschaden im Erbgut, das Cyclobutanpyrimidindimer (CPD), entfernen und somit die genomische Integrität sicherstellen. Diese monomeren Enzyme besitzen neben dem katalytisch essentiellen Kofaktor FAD in der Regel einen zusätzlichen Antennenchromophor zur Erweiterung ihres Aktionsspektrums. Die Klassifizierung der CPD-Photolyasen erfolgt anhand von Sequenzhomologien und spiegelt sich bemerkenswerterweise auch im differenzierten Auftreten innerhalb der Lebewesen wider. Während der umfangreich charakterisierte Klasse I Subtyp auf mikrobielle Organismen beschränkt ist, existiert der weitgehend unerforschte Klasse II Subtyp ubiquitär in Pflanzen, Tieren, Bakterien, Archaeen sowie in einigen Viren.

In dieser Arbeit erfolgte die funktionelle als auch strukturelle Charakterisierung des Klasse II Subtyps am Beispiel der Photolyasen aus der archaealen Gattung *Methanosarcina*. Diese Enzyme stellen aufgrund der hohen Sequenzhomologien zu den pflanzlichen und tierischen Orthologen geeignete Modelle für die Untersuchung eukaryotischer, Klasse II-spezifischer Aspekte dar. Die in dieser Arbeit gelösten Kristallstrukturen der *Methanosarcina mazei* Photolyase (*MmCPDII*) allein und im Komplex mit doppelsträngiger, CPD-geschädigter DNA lieferten die ersten dreidimensionalen Informationen für diese phylogenetisch distinkte Gruppe. Dabei wurde deutlich, dass der durch Gelshift-Experimente ermittelte geringe Diskriminierungsgrad zwischen ungeschädigter und geschädigter DNA des Klasse II Subtyps auf einen unterschiedlichen DNA-Bindungsmodus zurückzuführen ist. Katalytische Merkmale ähneln zwar dem Klasse I Subtyp funktionell, unterscheiden sich aber auf struktureller Ebene und deuten so auf deren konvergente Evolution hin. So findet der Elektronentransport während der Photoreduktion des Kofaktors FAD ebenfalls entlang konservierter Tryptophane statt, nimmt aber eine neue Route und besteht nicht aus einer Triade, sondern aus einer Dyade mit mehreren terminalen Verzweigungspunkten. Vergleichbar mit dem Klasse I Subtyp erfolgt die Stabilisierung des neutralen semichionoiden Zustands $FADH^{\bullet}$ während der Photoreduktion und der DNA-Reparatur über ein Asparagin, das sich allerdings im Klasse II Subtyp konserviert auf einem anderen Strukturelement befindet. Mit Hilfe ortsgerichteter Mutagenese und UV/Vis-spektroskopischer Methoden war es möglich, die Funktion und Relevanz dieser Klasse II-spezifischen Merkmale zu verifizieren.

Die Etablierung eines artifiziellen Synthesewegs zur Bereitstellung des Deazaflavins 8-HDF im Expressionswirt *Escherichia coli* identifizierte in letzter Konsequenz den anfänglich unbekanntem Antennenchromophor der *MmCPDII*. Die Kristallstruktur des *MmCPDII*•8-HDF Komplexes wiederum lieferte detaillierte Einblicke in die Antennenbindungstasche und ermöglichte Schlussfolgerungen bezüglich potentieller Antennen für den gesamten Klasse II Subtyp, insbesondere für die pflanzlichen Photolyasen. Diese Informationen können einen wichtigen Beitrag zur Entdeckung des bisher kryptischen Antennenchromophors in pflanzlichen Photolyasen leisten.

Summary

CPD photolyases are substrate-specific, light-driven DNA repair enzymes which use the energy of sunlight (300 nm – 500 nm) to remove the predominant UV-induced DNA lesion, the cyclobutane pyrimidine dimer (CPD), for ensuring genomic integrity. These monomeric enzymes possess usually two cofactors: the catalytic cofactor FAD crucial for repair activity and an additional antenna chromophore which broadens the photolyase's action spectrum. Based on sequence identities, CPD photolyases are classified into subtypes with species-specific distributions. While the extensively characterized class I subtype is limited to microbial organisms, the class II subtype is ubiquitous in plants, animals, bacteria, archaea and in some viruses. However, our overall knowledge on the class II photolyases is lagging behind.

In this work, functional and structural aspects of the class II subtype were addressed using the archaeal photolyases from the genus *Methanosarcina*. Due to their high sequence identities to plant and animal orthologs these photolyases are suitable model enzymes to enhance our understanding of class II-specific functionalities. The crystal structures of the *Methanosarcina mazei* photolyase (*Mm*CPDII) alone and in complex with duplex, CPD-containing DNA provided the first three-dimensional information for this phylogenetically distinct group. It became clear that the low discrimination ratio between undamaged and damaged DNA of the class II subtype, which was determined by gel shift experiments, is due to different DNA binding modes. Interestingly, while critical features are functionally similar between the class I and class II subtype, their differences on the structural level suggest that they convergently evolved. For example, during photoreduction of the cofactor FAD the electrons are also transferred along conserved tryptophans, but this pathway takes a different route and the triad of class I is replaced by a dyad with terminal branching points. Comparable to the class I subtype, the neutral semiquinoid FADH[•] species during photoreduction and DNA repair is stabilized by an asparagine. However, in the class II subtype, this conserved residues is located on a different structural element. Finally, use of site-directed mutagenesis and UV/Vis-spectroscopic approaches verified the functional role of these critical features in the class II subtyp.

Establishment of an artificial metabolic pathway for providing the deazaflavin 8-HDF in the *E. coli* expression system finally enabled the identification of the previously unknown antenna chromophore of *Mm*CPDII. The crystal structure of the *Mm*CPDII•8-HDF complex provided detailed insights into the antenna binding pocket and made it possible to draw conclusions regarding potential antennas for the entire class II subtype, especially for the plant photolyases. This information will be a major contribution for the identification of currently cryptic antenna chromophors in plant photolyases.

1 Einleitung

1.1 UV-induzierte DNA-Schäden und lichtgetriebene Reparaturenzyme

Das elektromagnetische Spektrum der Sonne umfasst neben dem für das menschliche Auge wahrnehmbaren Bereich von 400 nm bis 700 nm und dem längerwelligen Infrarotbereich, den wir teilweise als Wärme wahrnehmen, ebenfalls kurzwellige, energiereichere Strahlung zwischen 200 nm bis 400 nm. Diese ultraviolette Strahlung (UV-Strahlung) wird weiter in UV-C (200 nm-280 nm), UV-B (280 nm-320 nm) und UV-A (320 nm-400 nm) unterteilt, wobei der kurzwelligste und energiereichste Anteil (UV-C) durch die Ozonschicht der Stratosphäre absorbiert wird¹ (**Abb. 1**).

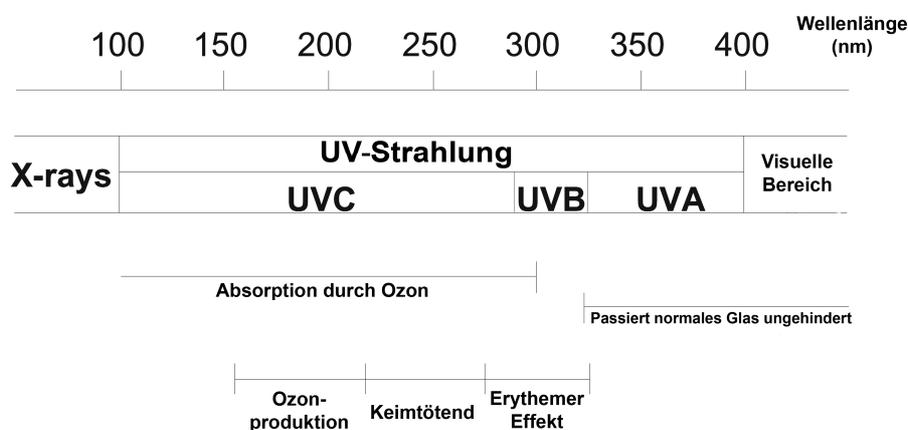


Abb. 1 Spektrum der UV-Strahlung und deren chemische bzw. biologische Effekte¹.

Die UV-Strahlung im Wellenlängenbereich zwischen 200 nm bis 300 nm kann in DNA die Ausbildung von kovalenten Bindungen zwischen benachbarten Pyrimidinen durch eine photochemische [2+2]-Cycloaddition induzieren. Neben dem sog. (6-4)-Photoprodukt (**Abb. 2**), das über ein Oxetan-Intermediat gebildet und durch Einwirkung von UV-B in ein Dewar-Isomer umgewandelt wird, ist das entstehende Cyclobutanpyrimidindimer (CPD) mit ungefähr 75% die am häufigsten vorkommende, UV-induzierte DNA-Schädigung² (**Abb. 3**).

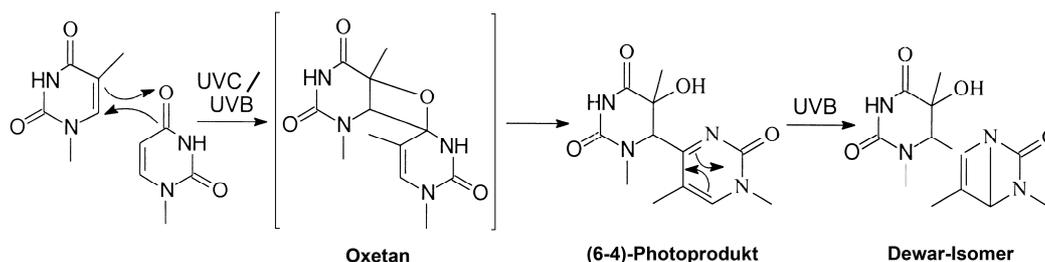


Abb. 2 Bildung und Photoisomerisierung des (6-4)-Photoprodukts³.

UV-B bewirkt dabei die Ausbildung von ungefähr einem CPD-Schaden auf 10^7 Basen pro J m^{-2} in zellulärer DNA³. Durch die [2+2]-Cycloaddition kommt es dabei zur Bildung einer kovalenten Bindung zwischen den C5- bzw. C6-Atomen zweier benachbarter Pyrimidine, wobei das Thymindimer am häufigsten vorkommt⁴. Von den möglichen Diastereomeren sind in DNA aufgrund sterischer Beschränkungen durch das Desoxyribosephosphatrückgrat nur die *syn*-Isomere möglich und in doppelsträngiger B-DNA ist quasi nur das *cis-syn* Dimer vorhanden. Das *trans-syn* Dimer hingegen kann sich in einzelsträngiger DNA bilden³ (**Abb. 3**).

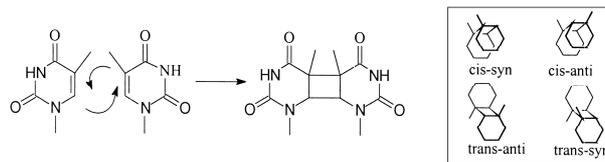


Abb. 3 Bildung eines Cyclobutanpyrimidindimers am Beispiel benachbarter Thymines und dessen mögliche Diastereomere³.

Neben diesen Schädigungen an Pyrimidinbasen kann UV-B eine photochemische Hydratisierung des Cytosins in ein Cytosinhydrat bewirken, welches wiederum in das stabilere Uracilhydrat durch eine Desaminierung übergeht³ (**Abb. 4**).

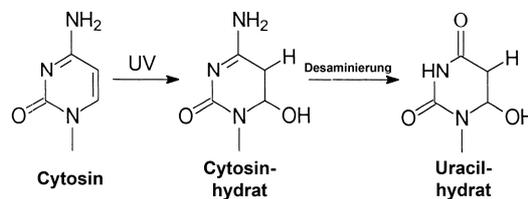


Abb. 4 Bildung und Desaminierung von Cytosinhydrat³.

Photoprodukte mit Purinbasen sind zumindest unter Beteiligung eines Adenins ebenso möglich. So können durch energiereiche Strahlung sowohl zwei unterschiedliche Adenindimere entstehen als auch ein Adenin-Thymin-Photoaddukt³ (**Abb. 5**).

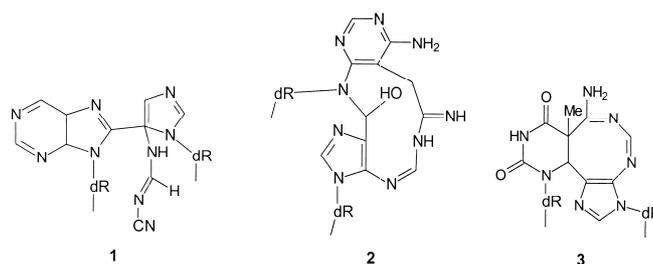


Abb. 5 Struktur von zwei Adenindimeren (1, 2) und eines Adenin-Thymin-Photoaddukts³.

Während die Reparatur der UV-induzierten CPD-Schäden und (6-4)-Photoprodukte in den höheren Säugetieren (Placentalia bzw. Eutheria) ausschließlich über die Nukleotid-Exzisionsreparatur (NER) stattfindet^{1,2}, besitzen alle übrigen Eukarya bis hin zu den Beuteltieren (Metatheria) sowie Archaea und Bacteria sog. DNA-Photolyasen, die substratspezifisch diese DNA-Schäden erkennen und mit Hilfe von UV-A bzw. Blaulicht reparieren können⁵ (**Abb. 6**). Die erste, indirekte Beschreibung dieser Enzyme geschah 1949 durch Alfred Kelner, der beobachtete, dass UV-geschädigte *Streptomyces griseus* Konidien durch anschließende Bestrahlung mit Licht eine höhere Überlebensrate aufwiesen⁶ und für diesen Effekt zusammen mit Max Delbrück den Namen *Photoreaktivierung* gab⁷. Während das Enzym anfänglich noch *photoreaktivierendes Enzym* genannt wurde^{8,9}, setzte sich der Begriff *Photolyase* erst durch die Erkenntnis durch, dass das Enzym die Reaktion von Pyrimidindimeren zu Monomeren katalysiert und folglich kovalente Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindungen spaltet^{9,10,11,12}. Die Notwendigkeit eines effizienten Reparatursystems für UV-induzierte DNA-Schäden wird auf struktureller Ebene anhand der Konformationsänderungen in doppelsträngiger DNA deutlich. Durch die am häufigsten auftretende UV-Schädigung, den CPD-Schaden, wird die doppelsträngige DNA um etwa 27° bis 30° gebogen und zusätzlich um etwa 9° entwunden^{13,14,15} (**Abb. 6**). Ein Defekt des NER-Systems und damit eine nicht erfolgende Reparatur der CPD-Schäden äußern sich beim Menschen z. B. in Form der Mondscheinkrankheit (Xeroderma pigmentosum), bei der es letztendlich durch die UV-Strahlung zur Ausbildung von malignen Hautkrebsformen kommt.

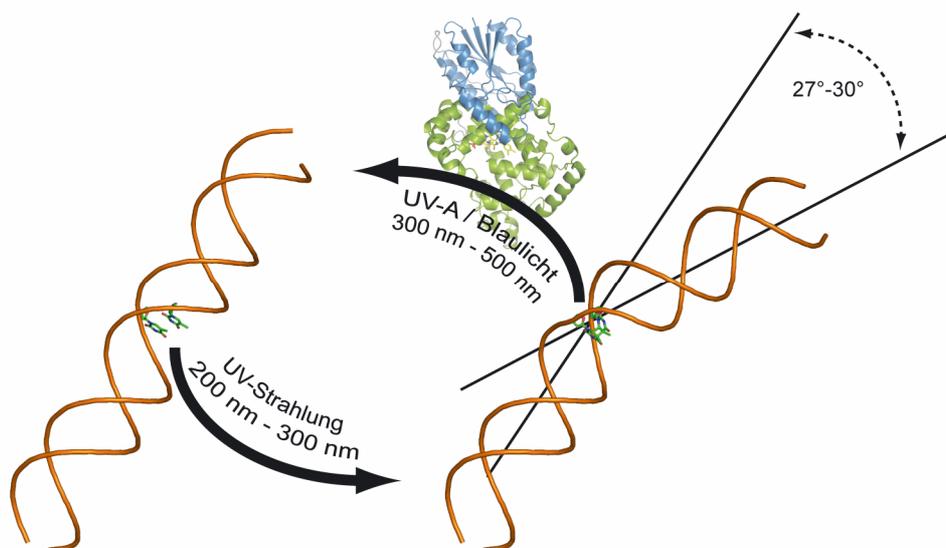


Abb. 6 Konformationelle Auswirkungen eines CPD-Schadens auf doppelsträngige DNA und lichtabhängige DNA-Reparatur durch Photolyasen.

1.2 Übersicht über die Phr/Cry-Familie

DNA-Photolyasen und Cryptochrome sind Flavoproteine und gehören evolutionär zu einer gemeinsamen Proteinfamilie (Phr/Cry-Familie), deren Vertreter in allen drei Domänen des Lebens vorkommen und untereinander eine hohe Strukturhomologie besitzen (**Abb. 7A, B**).

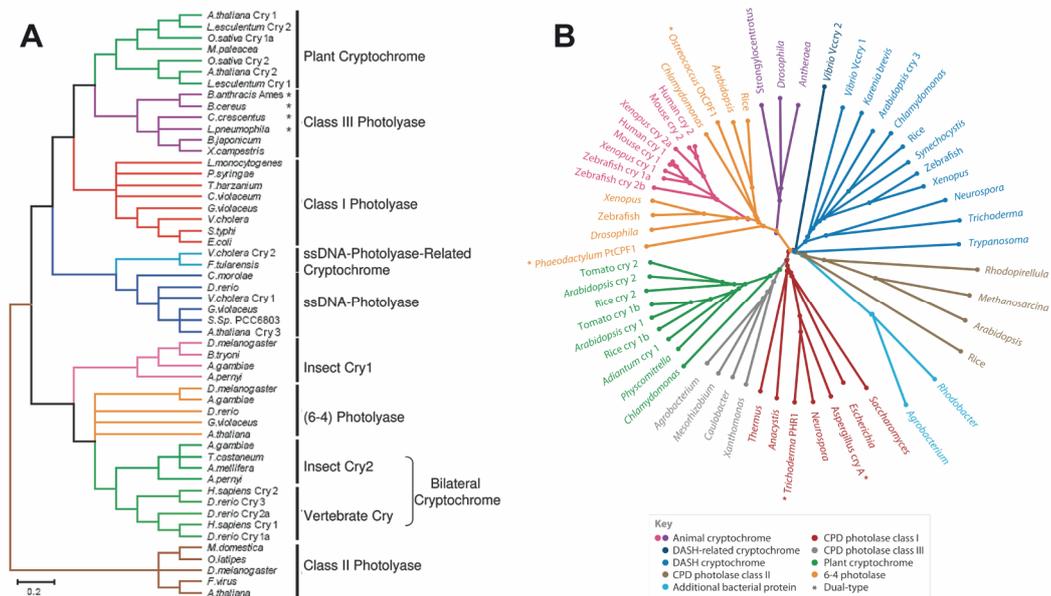


Abb. 7 Phylogenetische Analyse der Phr/Cry-Familie. Die ungewurzelten phylogenetischen Bäume stammen (**A**) aus Ozturk *et al.*¹⁶ und (**B**) aus Chaves *et al.*¹⁷.

Trotz der strukturellen Ähnlichkeiten z. B. in Form der gemeinsamen FAD-Bindungsdomäne, unterscheiden sich jedoch DNA-Photolyasen, DASH Cryptochrome und Cryptochrome in ihren Funktionen^{5,17,18}. Während pflanzliche Cryptochrome das Wachstum und die Entwicklung steuern¹⁹, sind die tierischen Enzyme für die Rhythmik der circadianen Uhr zuständig²⁰. Cryptochrome sind somit Photorezeptoren im klassischen Sinne, die an der Signalrezeption bzw. dessen Weiterleitung beteiligt sind und keinerlei DNA-Reparaturaktivität besitzen¹⁸. Photolyasen hingegen sind substratspezifische DNA-Reparaturenzyme, die mit Hilfe von Licht die UV-induzierten Schäden in der DNA reparieren können⁵. Aufgrund ihrer Spezifität für CPD-Schäden bzw. (6-4)-Photoprodukte werden Photolyasen in den jeweiligen Subtyp klassifiziert, was sich auf phylogenetischer Ebene ebenfalls anhand der distinkten Clusterbildung zeigt (**Abb. 7**). Eine Ausnahme bilden hierbei allerdings die Enzyme, die in **Abb. 7B** mit einem Stern markiert sind. Phylogenetisch gesehen gehören diese Vertreter der Phr/Cry-Familie eher zu den Klasse I CPD bzw. zu den (6-4)-Photolyasen und besitzen deren jeweilige DNA-Reparaturspezifität. Zusätzlich besitzen diese Enzyme die Eigenschaften eines Photorezeptors was sie als *dual-type* Photolyasen/Cryptochrome definiert¹⁷. Eine weitere außergewöhnliche Gruppe innerhalb der

Phr/Cry-Familie sind die sog. DASH Cryptochrome, die mit der strukturellen Charakterisierung des CryDASH aus *Synechocystis* spec. PCC6803 eingeführt wurden²¹. Anfänglich wurden diese Enzyme aufgrund phylogenetischer Analysen und einer nicht nachweisbaren DNA-Reparaturaktivität den tierischen Cryptochromen zugeordnet^{21,22,23}. Jedoch konnte in der Folgezeit durch weitere Experimente eine CPD-Reparaturaktivität sowohl in einzelsträngiger DNA²⁴ als auch in Loopstrukturen doppelsträngiger DNA nachgewiesen werden²⁵. Neuere phylogenetische Analysen zeigten außerdem, dass DASH Cryptochrome keinen gemeinsamen Ursprung mit den tierischen Cryptochromen haben, sondern von einem Vorläufer der CPD-Photolyasen abstammen¹⁶. Aktuell wurde diese diverse Phr/Cry-Familie noch durch eine neue Gruppe an Cryptochromen erweitert (hellblau in **Abb. 7B**). Der sog. CryPro-Subtyp ist in Proteobakterien an der Regulation der Expression von Photosynthesegenen beteiligt und zeigt keine DNA-Reparaturaktivität^{26,27}. Auf struktureller Ebene ist das CryB aus *Rhodobacter sphaeroides* (*RsCryB*) nur entfernt mit den bisher charakterisierten Photolyasen und Cryptochromen verwandt, besitzt aber ebenfalls ein photochemisch reduzierbares FAD als katalytischen Kofaktor²⁷. Interessanterweise besitzt die C-terminale katalytische Domäne zusätzlich einen Eisen-Schwefel-Cluster und ähnelt strukturell der helikalen, DNA-bindenden Domäne der eukaryotischen Primaseuntereinheit PriL²⁷, welche wiederum strukturelle Gemeinsamkeiten mit der C-Terminus der Phr/Cry-Familie aufweist²⁸. Generell wurden in der Vergangenheit sowohl die Evolution als auch die phylogenetischen Verwandtschaftsverhältnisse innerhalb der Phr/Cry-Familie teilweise kontrovers diskutiert^{16,29,30,31}. Einen aktuellen Überblick bieten dabei die aus der Literatur stammenden ungewurzelten phylogenetischen Bäume in **Abb. 7**^{16,17}.

1.3 CPD-Photolyasen des Klasse II Subtyps

CPD-Photolyasen selbst können anhand von Sequenzanalysen in drei Klassen eingeordnet werden (**Abb. 7A**). Neben der monophyletischen Gruppe zu der sowohl die Klasse I CPD Photolyasen als auch die Enzyme des Klasse III Subtyps, die eine Schwestergruppe zu den pflanzlichen Cryptochromen bilden¹⁶, gehören, gibt es eine distinkte, phylogenetisch deutlich entferntere Klasse II mit Sequenzidentitäten von teilweise weit unter 20% zu den übrigen Vertretern der Phr/Cry-Familie^{32,33}. Diese phylogenetische Stellung innerhalb der Phr/Cry-Familie deutet daraufhin, dass es während der Evolution der Proteinfamilie früh zu einer Abspaltung dieses Subtyps von den anderen Enzymklassen infolge einer Genduplikation kam²⁹. Die Verteilung der einzelnen CPD-Subtypen ist dabei sehr unterschiedlich und spiegelt in gewisser Weise die Sonderstellung der Klasse II CPD Photolyasen wider. Während die

Klasse III bisher nur Bakterien zugeordnet wurde und die Klasse I in Archaeen, Bakterien und Pilzen vorkommt, ist die Verbreitung des Klasse II Subtyps nahezu ubiquitär. Diese CPD-Photolyasen existieren sowohl in Archaeen³⁴ und Bakterien³² als auch in Viren der Familien *Poxviridae*³⁵ und *Baculoviridae*³⁶, in verschiedenen Algen wie z. B. der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii*³⁷ und in höheren Eukarya wie z. B. der Acker-Schmalwand (*Arabidopsis thaliana*)³⁸, der schwarzbäuchigen Taufliege (*Drosophila melanogaster*)³² oder einer Art des Kaninchenkänguruhs (*Potorous tridactylus*)³². Eine Klasse II CPD Photolyase wurde ebenfalls in dem eukaryotischen, intrazellulären Parasiten *Antonospora locustae* (Microsporidia) gefunden, der zwar entfernt mit Pilzen verwandt, aber dessen Photolyase nicht ortholog zu den pilzlichen Klasse I-Enzymen ist³⁹. Eine mögliche Erklärung für diese divergente Verteilung des Klasse II Subtyps könnte ein horizontaler Gentransfer sein, der zwischen den verschiedenen Organismusgruppen stattgefunden hat^{36,39}. Diese Form der Genübertragung trat wahrscheinlich auch innerhalb der Klasse I von Bakterien zu Pilzen auf und erklärt so das singuläre Auftreten dieses Photolyase-Subtyps in Ascomyceten aber keinen anderen Eukaryoten^{29,39}. Neben diesen systematischen Besonderheiten konnten für die Klasse II CPD Photolyasen auch auf physiologischer Ebene interessante Beobachtungen gemacht werden, die wiederum neue Fragen bezüglich dieses Subtyps aufwerfen. So wurde am Beispiel unterschiedlicher Reissorten, die geringfügige Variationen im Photolyasegenotyp aufweisen, gezeigt, dass deren Sensitivität gegenüber UV-Strahlung direkt mit der Photolyaseaktivität korreliert^{40,41}. Die direkte Abhängigkeit der Überlebensrate von der CPD-Reparaturaktivität konnte im Vorfeld bereits an der *A. thaliana* Mutante *uvr2-1* demonstriert werden⁴². Im direkten Vergleich zeigten transgene Pflanzen, welche die arteigene Klasse II CPD Photolyase überexprimierten, eine signifikant geringere Akkumulation an CPD-Schäden und eine damit verbundene geringere Inhibition des Wachstums unter Bestrahlung mit UV-B im Vergleich zum entsprechenden Wildtyp^{43,44}. Durch *in vivo* Experimente mit der *Potorous tridactylis* Klasse II CPD-Photolyase konnte außerdem demonstriert werden, dass dieser Subtyp prinzipiell auch in höheren Säugetieren eine Reparaturaktivität ausüben kann. So wurde sowohl auf zellulärer Ebene mit dermalen Fibroblasten transgener Mäuse die DNA-Reparaturaktivität nachgewiesen als auch die Reduktion akuter Effekte UV-exponierter Haut wie z. B. das Auftreten von Erythema an lebenden Mäusen gezeigt⁴⁵.

1.4 Globale Enzymarchitektur der Phr/Cry-Familie

Alle bisher strukturell charakterisierten Photolyasen und Cryptochrome sind monomere Enzyme und besitzen eine uniforme, bilobale Enzymarchitektur¹⁷. Die N-terminale α/β -Domäne entspricht strukturell einer Rossmann-Faltung, die häufig in Nukleotid-bindenden Enzymen auftritt⁴⁶. In der C-terminalen, α -helikalen Domäne befindet sich der nicht-kovalent gebundene, katalytische Kofaktor FAD in einer, für Vertreter der Phr/Cry-Familie typischen, U-förmigen Anordnung. Die Verbindung zwischen dieser katalytischen FAD-Bindungsdomäne und der N-terminalen Photolyasedomäne erfolgt über eine strukturell weniger definierte Loopregion variabler Länge (**Abb. 8**).

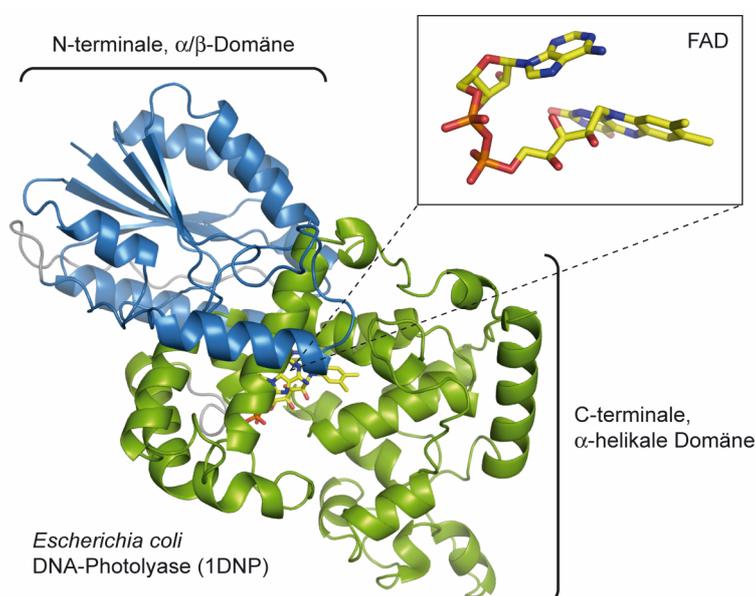


Abb. 8 Globale Enzymarchitektur der Phr/Cry-Familie am Beispiel der DNA-Photolyase aus *Escherichia coli* (1DNP). Die U-förmige Anordnung des katalytischen Kofaktors FAD ist in der vergrößerten Darstellung gezeigt. Der Antennenchromophor MTHF ist in der Gesamtabbildung nicht dargestellt.

Von dieser Kernstruktur abweichende Unterschiede sind vor allem am N- bzw. C-Terminus vorhanden. So besitzt das CryDASH aus *Arabidopsis thaliana*, im Gegensatz zu dessen cyanobakteriellen, orthologen Enzym aus *Synechocystis spec. PCC 6803*²¹, neben einer N-terminalen Sequenz für den Import in die Mitochondrien bzw. Chloroplasten⁴⁷ eine zusätzliche Erweiterung von 39 Aminosäuren am N-Terminus⁴⁸. Dieser Bereich trägt das sog. DAS-Motiv bestehend aus einem konservierten Aspartat (D), einer darauf folgenden sauren Region (A) und einer Abfolge von Serinen (S). Dieses Motiv ist interessanterweise charakteristisch für die C-terminale Erweiterung in pflanzlichen Cryptochromen und spielt hier eine Rolle bei der Lokalisierung und Stabilität der Cryptochrome bzw. wirkt an der Phototransduktion mit^{18,49}. Eine äußerst überraschende Entdeckung konnte anhand der

Struktur des *Drosophila* Cryptochroms mit vorhandener C-terminaler Erweiterung gemacht werden⁵⁰. Die in diesem Abschnitt ausgebildete terminale α -Helix positioniert sich in den Bereich, der normalerweise in Photolyasen für die Bindung der geschädigten DNA als Substrat zuständig ist. Das konservierte Tryptophan W536 wiederum ragt so in das katalytische Zentrum hinein, dass der Erkennungsmodus eines (6-4)-Schadens imitiert wird. Aufgrund von photochemischen Änderungen des katalytischen Kofaktors FAD könnte es so zu konformationellen Änderungen dieses C-terminalen Bereiches kommen. Interessanterweise konnten strukturelle Veränderungen in Abhängigkeit des FAD-Redoxzustands ebenfalls bei der phylogenetisch verwandten *Dunaliella salina* (6-4)-Photolyase CD-spektroskopisch nachgewiesen werden und finden dort vermutlich im Bereich des verlängerten α -helikalen C-Terminus statt^{51,52}. Auch in den bisher charakterisierten CPD-Photolyasen ist der C-Terminus ebenfalls eine mitunter variable Region. So besitzt im Gegensatz zu den übrigen Klasse I CPD Photolyasen das Enzym aus *Thermus thermophilus* eine um ~20 Aminosäuren verkürzte katalytische Domäne¹⁷.

1.5 Katalytischer Kofaktor und Antennenchromophor

Als katalytischer Kofaktor wurde in allen Proteinen der Phr/Cry-Familie ein nicht-kovalent gebundenes FAD identifiziert, welches generell in den drei möglichen Redox-Zuständen vorkommen kann (**Abb. 9**).

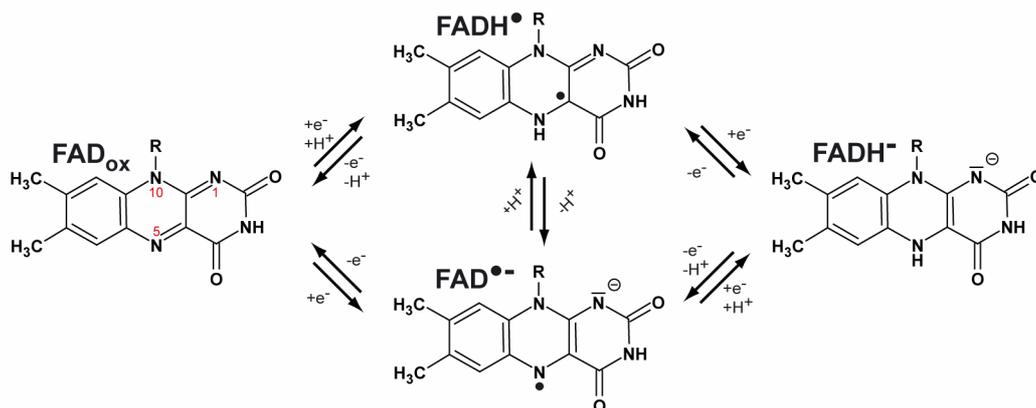


Abb. 9 Redoxzustände des katalytischen Kofaktors FAD in der Phr/Cry-Familie. FAD_{ox}: vollständig oxidiert, FADH•: neutrale semichinoide Form, FAD•⁻: anionische semichinoide Form, FADH⁻: vollständig reduziert.

Für Photolyasen wurde gezeigt, dass dieses FAD für die DNA-Bindung und Reparaturaktivität essentiell ist, weshalb man in diesem Zusammenhang auch von dem katalytischen Kofaktor spricht⁵³. Interessanterweise konnte hierbei demonstriert werden, dass dieser katalytische Kofaktor zumindest in der *Ec*CPDI durch ein 5-Deaza-FAD mittels

Rekonstitution der FAD-freien Photolyase ersetzt werden konnte, während dies mit 1-Deaza-FAD nicht möglich war. Der *in vitro* rekonstituierte *Ec*CPDI•5-Deaza-FAD Komplex zeigte außerdem eine Bindung an CPD-geschädigte DNA wies jedoch keine Reparaturaktivität auf⁵³. Abhängig vom einzelnen Subtyp der Phr/Cry-Familie erfolgt die Stabilisierung des jeweiligen Redox-Zustands des katalytischen FAD durch eine spezifische Aminosäure in der näheren Umgebung des N5-Stickstoffs. Die unterschiedlichen Interaktionen der im Folgenden vorgestellten Vertreter am N5-Stickstoff des katalytischen Kofaktors FAD sind in **Abb. 10** zusammengefasst.

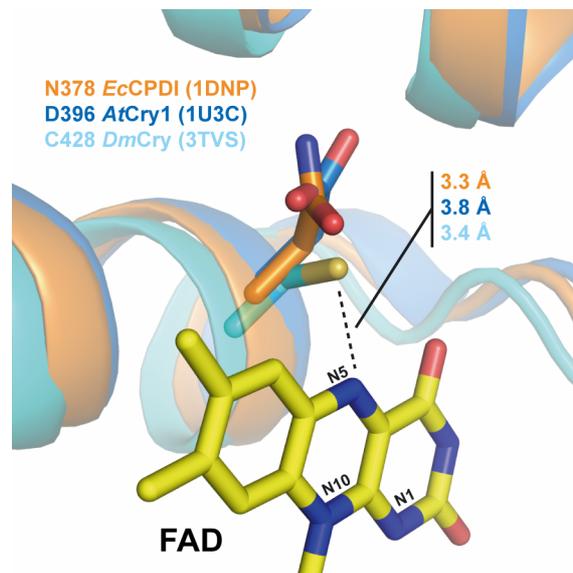


Abb. 10 Die Stabilisierung der verschiedenen Redox-Zustände des katalytischen FAD erfolgt in den Subtypen der Phr/Cry-Familie durch Interaktionen am N5-Stickstoff mit unterschiedlichen Aminosäuren. Exemplarisch ist für Enzyme mit DNA-Reparaturaktivität die *Ec*CPDI, für pflanzliche Cryptochrome das *At*Cry1 und für tierische Cryptochrome das *Dm*Cry gezeigt.

In den Enzymen mit DNA-Reparaturaktivität stabilisiert ein Asparagin (*Ec*CPDI: N378) die neutrale semichinoide Form FADH^\bullet während der Photoaktivierung des Enzyms bzw. der DNA-Reparatur⁵⁴. In pflanzlichen Cryptochromen befindet sich an dieser Stelle hingegen eine Asparaginsäure (*At*Cry1: D396), die als Protonendonator fungieren kann, wodurch es zu einem Verbleib im neutralen semichinoiden FADH^\bullet -Zustand kommt und die beiden Maxima dieser Redox-Spezies blauverschoben sind^{55,56,57}. Im Gegensatz dazu findet die Stabilisierung des anionischen semichinoiden Radikals $\text{FAD}^{\bullet-}$ in tierischen Cryptochromen durch ein Cystein statt (*Dm*Cry: C416), das aufgrund des höheren pK_S -Wertes im Vergleich zu einer Asparaginsäure nicht in der Lage ist, den N5-Stickstoff des FAD zu protonieren⁵⁸. Diese funktionelle Position des Cysteins C416 konnte vor Kurzem durch die Kristallstruktur des *Drosophila melanogaster* Cryptochroms bestätigt werden⁵⁰.

Der uniforme Charakter der katalytischen Domäne (IPR005101) der gesamten Phr/Cry-Familie wird ebenfalls durch eine Analyse des Überlappungsgrads der InterPro-Einträge deutlich⁵⁹ (**Abb. 11**). Einzig die Klasse II CPD Photolyasen (IPR 008148) zeigen mit 96% nur eine geringe Abweichung in der prozentualen Überschneidung (Stand 24/06/2012).

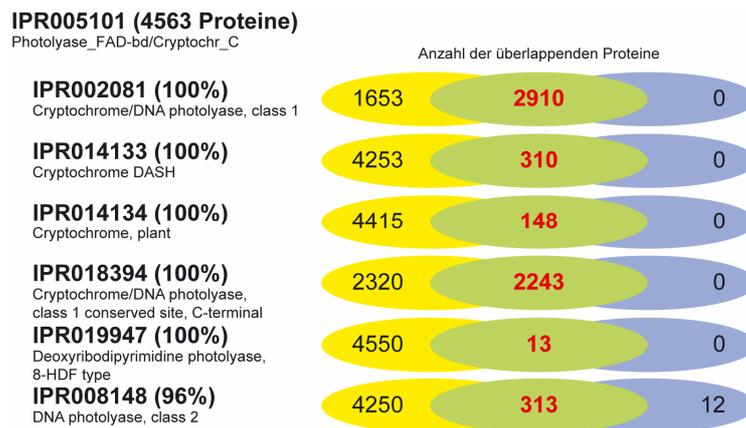


Abb. 11 InterPro-Analyse der FAD-Bindungsdomäne (IPR005101) der Phr/Cry-Familie⁵⁹. Der uniforme Charakter der katalytischen Domäne wird durch den extrem hohen Überlappungsgrad deutlich. Die linke Zahl (gelb) verdeutlicht, wie viele Proteine aus IPR005101 nicht im jeweiligen analysierten InterPro-Profil vorhanden sind. Während die rechte Zahl (blau) für die Anzahl der fehlenden Überschneidungen steht, gibt die mittlere, rote Zahl (grün) die Anzahl der überlappenden Proteine an. Daraus ergibt sich der prozentuale Überlappungsgrad (Stand 24/06/2012).

Während der Konservierungsgrad der einzelnen Aminosäuren der C-terminalen FAD-Bindungsdomäne relativ hoch ist, gestaltet sich die N-terminale Photolyasedomäne deutlich variabler in der Primärsequenz. In dieser Domäne wurden bisher fünf verschiedene zusätzliche Kofaktoren gefunden, die als lichtsammelnde Antenne fungieren können^{17,27}. Ein Überblick über die bisher identifizierten Antennenchromophore der Phr/Cry-Familie ist in **Abb. 12** gezeigt.

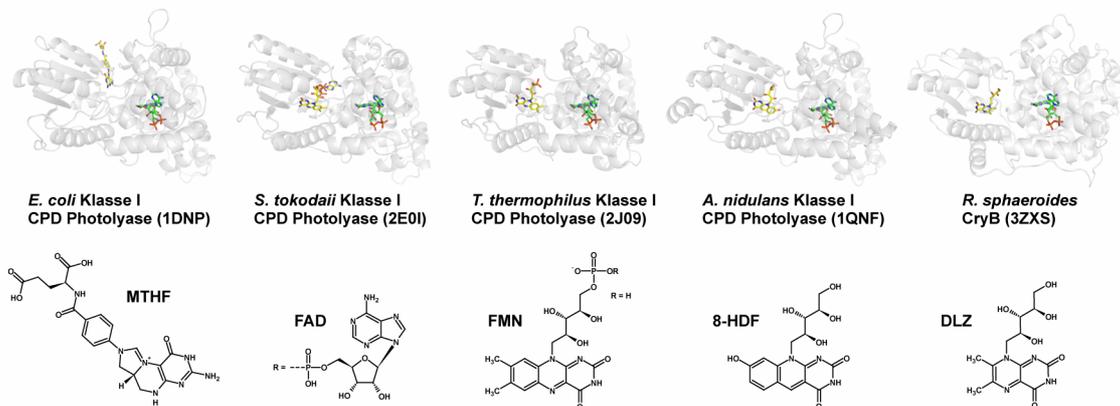


Abb. 12 Übersicht der bisher charakterisierten Antennenchromophore in Vertretern der Phr/Cry-Familie.

Generell wurden bisher zwei unterschiedliche Antennenchromophortypen identifiziert: Das Pterin-Derivat MTHF, welches z. B. in der *EcCPDI*^{60,61}, aber auch in Cryptochromen vorhanden ist^{18,48}, bindet in einem Abstand von 15 Å-17 Å in der Spalte zwischen der N- und C-terminalen Domäne¹⁷. Im Gegensatz befinden sich die nukleotidartigen Kofaktoren wie FAD⁶², FMN^{63,64}, 8-HDF^{65,66,67,68} bzw. das erst kürzlich als Antenne charakterisierte 6,7-Dimethyl-8-ribityl-lumazin (DLZ)²⁷ innerhalb der N-terminalen Domäne und werden durch die Rossmann-Faltung in einem Abstand von etwa 17 Å-18 Å zum katalytischen Kofaktor positioniert¹⁷. Während der DNA-Reparatur gehen beide Antennenchromophortypen durch die Absorption eines Photons geeigneter Wellenlänge in einen angeregten Zustand über und übertragen die Energie durch einen Förster-Resonanzenergietransfer auf das katalytische FAD. Die Effizienz des Energietransfers unterscheidet sich hierbei jedoch zwischen dem Pterin-Typ (MTHF → FADH₂) mit 62% in der *EcCPDI*⁶⁹ und dem Deazaflavin-Typ (8-HDF → FADH₂) mit 98% in der *AnCPDI*⁷⁰ deutlich. Am Beispiel der Klasse III CPD Photolyase aus *Caulobacter crescentus* (*CcCPDII*), die ebenfalls MTHF als Antennenchromophor besitzt, wurde jedoch gezeigt, dass der Energietransfer zwischen MTHF → FADH₂ auch effizienter (79%) stattfinden kann¹⁶. In dem Zusammenhang ist es interessant hervorzuheben, dass sich die einzelnen Energietransfereffizienzen auf das neutrale semichinoide FADH• (MTHF → FADH•), welches während der Photoaktivierung durch den Antennenchromophor angeregt wird, nur geringfügig voneinander unterscheiden (*EcCPDI*: 92%, *AnCPDI*: >99%, *CcCPDIII*: 94%)^{16,69,70}.

Während MTHF und die aus dem Umfeld des Riboflavin-Metabolismus stammenden FAD, FMN und DLZ weit verbreitete Moleküle in allen drei Domänen des Lebens sind, ist die Verbreitung des Deazaflavins 8-HDF restriktiver. Deazaflavine sind charakteristisch für methanogene Archaea und spielen eine wichtige Rolle in deren Energiestoffwechsel. Das 8-HDF in der poly-glutamylierten F₄₂₀ ist hier ein wichtiger Elektronenüberträger in verschiedenen biologischen Redox-Prozessen⁷¹. Allerdings wurden Deazaflavine auch in Bakterien z. B. der Klasse der Actinobacteria⁷² oder in der einzelligen Grünalge *Osterococcus taurii* nachgewiesen⁶⁸. Die besondere Stellung des 8-HDF als lichtsammelnder Antennenkofaktor wird zudem dadurch deutlich, dass erst durch die Deprotonierung der 8-Hydroxygruppe und der daraus resultierenden Delokalisation des Anions innerhalb des 5-Deazaflavinanteils ein funktionaler Chromophor entsteht. Diese Deprotonierung der 8-Hydroxygruppe (pK_S: 5,8)⁷¹ erfolgt in den bisher strukturell charakterisierten Photolyasen über zumindest eine basische Aminosäure^{64,67,68} (**Abb. 13**).

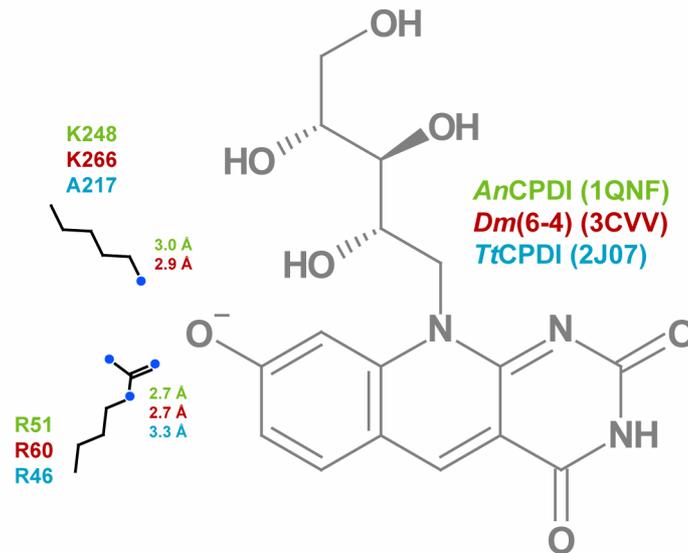


Abb. 13 Deprotonierung der 8-Hydroxygruppe des Deazaflavin in den bisher strukturell charakterisierten Photolyasen zur Bildung des chromogenen, delokalisierten Anions.

Die Identifizierung des Deazaflavins 8-HDF in *Dm(6-4)* bzw. *TtCPDI* als Antenne wirft allerdings die äußerst interessante Frage nach dem Ursprung des Kofaktors auf, da beide Organismen nicht in der Lage sind diesen zu produzieren. Sie besitzen weder die für die Synthese verantwortlichen Enzyme CofG und CofH noch dessen homologe, bifunktionelle Variante FbiC⁷³. Während bei den Ergebnissen sowohl des *soakings* von *TtCPDI*-apoKristallen mit 8-HDF als auch der *in vitro* Rekonstitution der *Dm(6-4)* mit dem Deazaflavin noch von einer artifiziellen Bindung des Chromophors ausgegangen werden konnte, so bestätigte die Methode der *in vivo* Rekonstitution die Funktion als Antennenchromophor zumindest in *D. melanogaster*. In einem modifizierten *E. coli* Expressionssystem⁷⁴, welches in der Lage ist 8-HDF zu produzieren, wurde der Einbau unter kompetitiven Bedingungen nicht nur für die (6-4)-Photolyase bestätigt, sondern auch für die Klasse II CPD Photolyase gezeigt. Interessanterweise erfolgte jedoch kein Einbau in das Cryptochrom aus *D. melanogaster*⁷⁴. Die Herkunft des Kofaktors bleibt dennoch unklar. Laut Literatur könnte das Deazaflavin in den Organismen, die nicht zu dessen Produktion in der Lage sind, von Mikroorganismen aus der direkten Umgebung wie z. B. dem Verdauungstrakt stammen^{68,75}.

1.6 Photoaktivierung in der Phr/Cry-Familie

Für die DNA-Reparaturaktivität muss der katalytische Kofaktor FAD in den Enzymen als vollreduziertes FADH⁻ vorliegen. Diese photochemische Reduktion (Photoreduktion), bei der Elektronen von einem externen Donor auf den Kofaktor übertragen werden, nennt man

sowohl bei Photolyasen als auch Cryptochromen Photoaktivierung und findet entlang einer konservierten Tryptophan-Triade statt^{5,76} (**Abb. 14**).

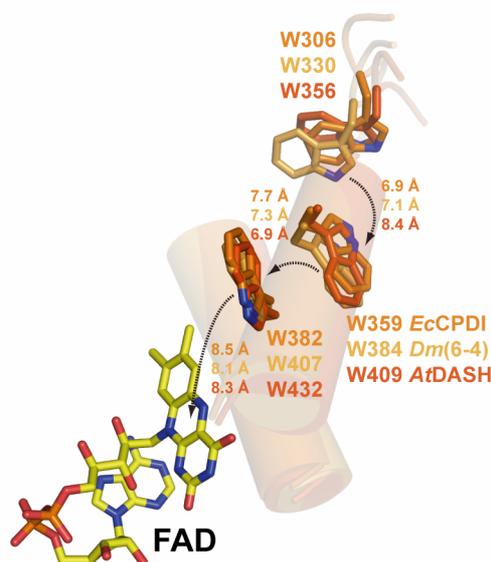


Abb. 14 Mechanismus der Photoaktivierung in DNA-Reparaturenzymen der Phr/Cry-Familie. Die Photoreduktion erfolgt entlang einer konservierten Tryptophan-Triade.

Nach Anregung des FAD_{ox} oder FADH^{\bullet} durch Absorption eines Photons im Wellenlängenbereich zwischen 300 nm bis 500 nm kommt es zu einer Radikalpaarbildung mit einem sich proximal befindlichen Tryptophan (z. B. W382 in *EcCPDI*). Dieses entstandene Tryptophanylradikal-Kation $\text{TrpH}^{\bullet+}$ abstrahiert wiederum vom nächstgelegenen, medialen Tryptophan (*EcCPDI*: W359) ein Elektron und dieser Rest wiederum vom oberflächenexponierten Tryptophan (*EcCPDI*: W306), welches durch die Abgabe eines Protons an das umgebende Lösungsmittel unter Bildung eines Trp^{\bullet} -Radikal stabilisiert wird. Während der Elektronentransfer entlang der Tryptophan-Triade im Pikosekundenbereich stattfindet, ist die Deprotonierung des terminalen Tryptophans mit ~200 ns relativ langsam. In Anwesenheit eines externen Reduktionsmittels kann das Trp^{\bullet} -Radikal allerdings reduziert werden und der Ladungsausgleich wird durch eine anschließende Protonierung hergestellt^{76,77}. Ein vereinfachtes, zeitlich aufgelöstes Schema am Beispiel der *EcCPDI* ist in **Abb. 15** anhand von Literaturdaten^{76,77} dargestellt.

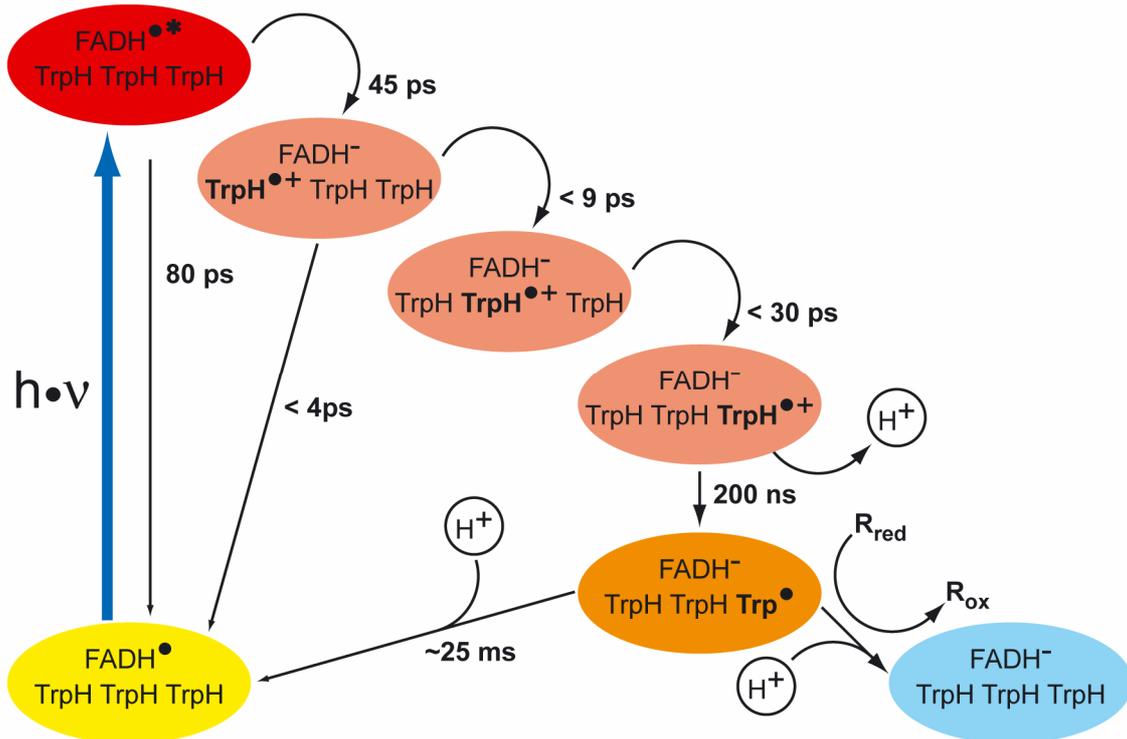


Abb. 15 Vereinfachtes, zeitlich aufgelöstes Schema der Photoaktivierung am Beispiel der *EcCPDI*. R_{red} ist ein externes Reduktionsmittel, welches das terminale Trp^\bullet -Radikal reduzieren kann und dabei oxidiert (R_{ox}). Alternativ kann das Elektron auf den katalytischen Kofaktor FAD zurückspringen. Die Zeitangaben stammen aus der Literatur^{76,77}.

Neben Tryptophan wurde auch Tyrosin als terminaler, intrinsischer Elektronendonator in Vertretern der Phr/Cry-Familie identifiziert. So konnte in der *Xenopus laevis* (6-4)-Photolyase mittels transientser EPR-Spektroskopie ein Tyrosyl-Radikal Tyr^\bullet innerhalb von 100 ns nach Anregungslaserpuls beobachtet werden, während kein Signal für ein intermediäres Trp^\bullet -Radikal vorhanden war⁷⁸. In der *AnCPDI* konnte ein Tyrosyl-Radikal hingegen mittels zeitaufgelöster UV/Vis-Spektroskopie nachgewiesen werden⁷⁹. Im Gegensatz zu den bisher bekannten Tryptophan-Triaden aus Photolyasen und Chryptochromen (**Abb. 14**) wurde anhand eines multiplen Sequenzalignments und eines Homologiestrukturmodells der *Oryza sativa* Klasse II CPD Photolyase ein neuer Elektronentransferweg über ebenfalls konservierte Tryptophane für diesen Photolyase-Subtyp postuliert⁸⁰. Sowohl die strukturelle Vorhersage als auch die funktionelle Relevanz der Klasse II-spezifischen Kaskade wurde mit bereits publizierten Daten dieser Arbeit bewiesen⁸¹. Eine andere Art der „Aktivierung“ wurde mit Proteinkristallen der *AnCPDI* gezeigt. Durch hochenergetische Synchrotronstrahlung erfolgte ebenfalls eine Reduktion des katalytischen Kofaktors FAD was in den *in crystallo* Experimenten durch eine Abnahme der Absorption im Wellenlängenbereich um die 450 nm zu beobachten war⁸². Wie anfangs erwähnt muss der katalytische Kofaktor FAD für die Reparaturaktivität der Photolyase als vollständig reduziertes FADH^- vorliegen. Durch

zeitaufgelöste UV/Vis- und EPR-Spektroskopie konnte früh das Tryptophan W306 in *E. coli* als intrinsischer Elektronendonator identifiziert werden^{83,84}. Durch Mutagenese wurde diese Aminosäure als primärer Elektronendonator bestätigt, da *EcCPDI-W306F* unter *in vitro* Bedingungen zwar ein normales DNA-Bindungsverhalten zeigt, aber nicht photoreduzierbar war und keine CPD-Schäden reparieren konnte⁸³. Zunächst wurde daher vermutet, dass sich das Tryptophan W306 in der Nähe des katalytischen Kofaktors FAD befindet⁸³. Die Bestimmung der genauen Position an der Proteinoberfläche und die damit verbundene Beschreibung der Tryptophantriade (**Abb. 14**) konnten erst anhand der Kristallstruktur geschehen⁶¹. In diesem Zusammenhang stellt sich allerdings die Frage, ob die Tryptophantriade bei der Photoreduktion und somit bei der CPD-Reparatur *in vivo* eine Rolle spielt. Interessanterweise konnte nämlich durch *in vivo* Experimente mit CPD-reparaturdefizienten *E. coli* Stämmen, die unterschiedliche Photolyase-Varianten trugen, gezeigt werden, dass auch die Mutanten *EcCPDI-W306F* und *EcCPDI-W382F* eine mit dem Wildtyp vergleichbare Photoreaktivierung aufwiesen⁸⁵.

1.7 DNA-Bindung und Reparaturmechanismus der CPD-Photolyasen

Die Bindung der CPD-geschädigten DNA erfolgt in einem lichtunabhängigen Schritt bei dem der CPD-Schaden aus der Doppelhelix heraus in die Substratbindungstasche hineingedreht wird. Anhand der Struktur des *AnCPDI*•CPD-DNA Komplexes konnte gezeigt werden, dass die Biegung der doppelsträngigen DNA sich bei diesem „Flip-Mechanismus“ von 27° bis 30° auf ~50° erhöht⁸⁶. Die Bindung des CPD-Schadens als Substrat ist mit einer Assoziationsrate von $k_{on} \sim 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ relativ schnell (im Vergleich: Diffusionslimit $\sim 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) und mit Dissoziationskonstanten von $K_{D, \text{spez.}} \sim 10^{-9} \text{ M}$ (*EcCPDI*) zu geschädigter DNA und $K_{D, \text{unspez.}} \sim 10^{-4} \text{ M}$ (*EcCPDI*) zu ungeschädigter DNA sehr spezifisch⁵. Dabei gibt es keine signifikanten Unterschiede zwischen einzel- oder doppelsträngiger DNA⁵. Die Stabilisierung des *Phr*•CPD-DNA Komplexes erfolgt durch elektrostatische Wechselwirkungen mit dem Desoxyribosephosphatrückgrat über eine Reihe von Wasserstoff- und Salzbrücken sowohl mit dem geschädigten Strang als auch mit dem Gegenstrang (**Abb. 16**). Während die Interaktionen der Photolyase mit dem CPD-Strang extensiv an den Phosphaten P^{-1} , P^{+1} , P^{+2} bzw. P^{+3} bzw. über eine Dipol-Wechselwirkung der Helix $\alpha 6$ am Phosphat P^{-1} stattfinden, ist das zentrale Phosphat P^0 nicht involviert. Die Ursache hierfür ist nicht das Formacetal, welche als Linker innerhalb des synthetischen Thymindimers verwendet wurde, sondern die Tatsache, dass sich keine Aminosäure in der unmittelbaren Nähe befindet⁸⁶. Dieses sequenzunabhängige NpT<>TpNpNp-Bindungsmotiv deckt sich mit den

DNA-Bindungsstudien, die mit der *E. coli* bzw. der *Methanobacterium thermoautotrophicum* Photolyase durchgeführt wurden^{65,87}.

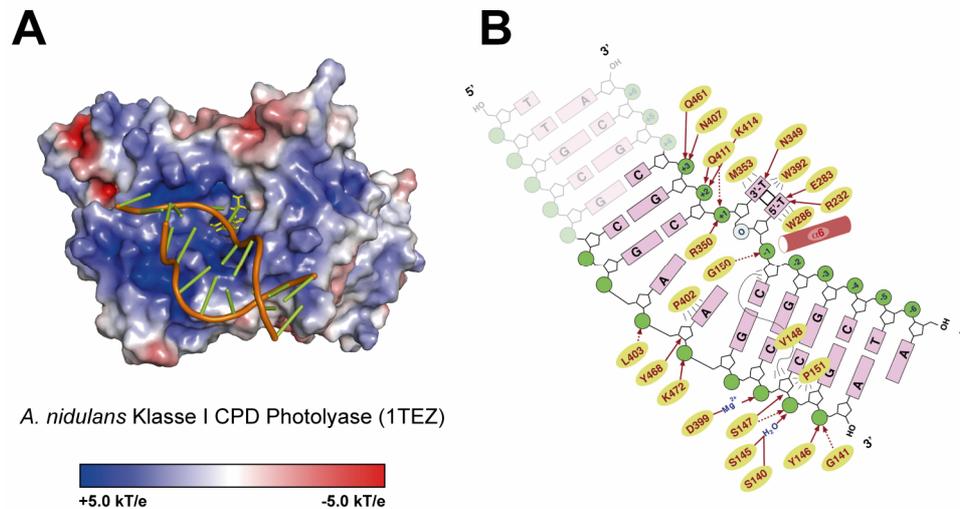


Abb. 16 Übersicht der stabilisierenden Wechselwirkungen im *An*CPDI•CPD-DNA Komplex. (A) Die Bindung der doppelsträngigen DNA erfolgt entlang der positiven elektrostatischen Oberfläche der Photolyase. (B) Schematische Darstellung⁸⁶ der verschiedenen Bindungen zwischen dem Enzym und den beiden Strängen der CPD-geschädigten DNA.

Das Thymin dimer selbst befindet sich in einer hydrophoben Tasche die im Falle der *An*CPDI aus der L-förmigen Anordnung der beiden Tryptophane W286 und W392 bzw. dem Methionin M353 gebildet wird. Neben diesen Van-der-Waals-Wechselwirkungen existieren innerhalb der Bindungstasche mehrere Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den beiden Thyminen des Schadens und der Photolyase. Dabei spielt vor allem das Glutamat E283 am 5'-Thymin eine entscheidende Rolle, da die protonierte Seitenkette während der Reparatur das anionische Radikalintermediat des CPD-Schadens stabilisieren könnte⁸⁶. Die Relevanz dieser Aminosäure konnte durch den Austausch des äquivalenten Glutamats E384 in ein nicht funktionales Alanin in der *Saccharomyces cerevisiae* Photolyase bereits im Vorfeld gezeigt werden. Diese Mutation in der aktiven Tasche führte sowohl zu einer um ~50% verminderten Affinität zu CPD-geschädigter DNA als auch zu einer signifikanten Abnahme der Quantenausbeute der DNA-Reparatur um 60%⁸⁸. Auf der Seite des 3'-Thymins befindet sich in der *An*CPDI das Asparagin N349, welches ebenfalls H-Brücken ausbildet. Die N6-Amidgruppe des Adeninanteils des katalytischen Kofaktors FAD ist ebenfalls in einer passenden Entfernung zur Ausbildung von Wasserbrücken zu den C4-Carbonylgruppen der beiden Thyminen und trägt somit zur Stabilisierung des Phr•CPD-DNA Komplexes bei⁸⁶. Dieses konnte anhand von DNA-Bindungsexperimenten mit apo*Ec*CPDI gezeigt werden, da diese Kofaktor-freie Photolyase nicht in der Lage war, CPD-DNA als Substrat zu binden bzw. den Komplex zu stabilisieren⁵³.

Die eigentliche Reparatur des CPD-Schadens ist ein photonengetriebener Prozess bei dem ein zyklischer Elektronentransfer stattfindet (**Abb. 17**).

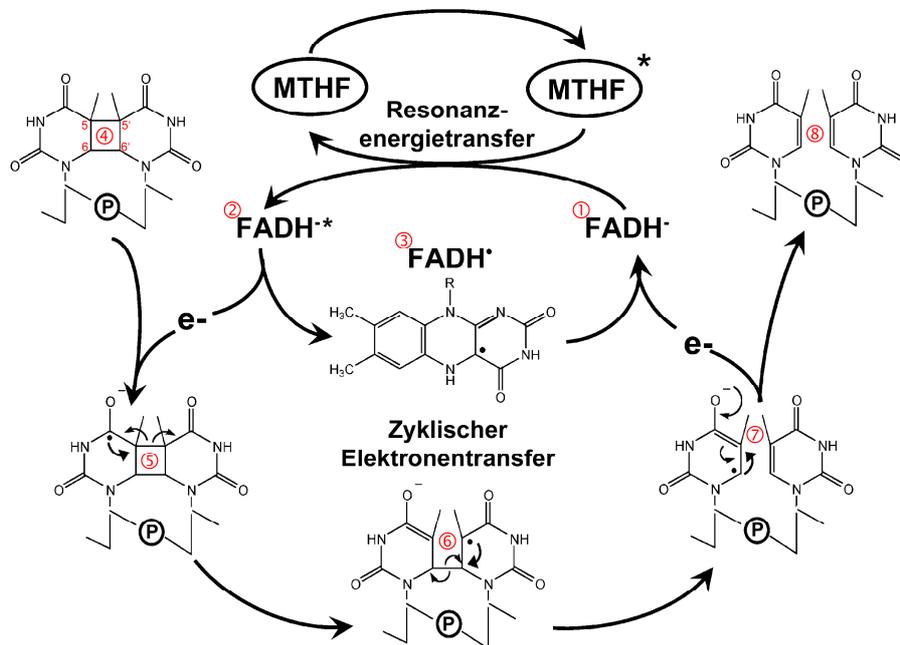


Abb. 17 Schematische Darstellung des Reparaturmechanismus der CPD-Photolyasen am Beispiel der *EcCPDI*⁵.

Der katalytische Kofaktor im vollständig reduzierten Zustand FADH^- (**Abb. 17** ①) wird entweder durch einen resonanten Energietransfer vom angeregten Antennenchromophor oder durch direkte Absorption eines Photons in den angeregten Zustand $\text{FADH}^{*\cdot}$ (**Abb. 17** ②) überführt. Im nächsten Schritt wird ein Elektron auf den gebundenen CPD-Schaden (**Abb. 17** ④) übertragen wodurch sowohl das neutrale semichinoide Radikal FADH^{\cdot} als auch das anionische CPD-Radikal gebildet wird, welches durch den bereits angesprochenen Glutamatrest stabilisiert werden kann (**Abb. 17** ③/⑤). Das Aufbrechen des Cyclobutanrings erfolgt nun in einem asynchronen Mechanismus: In einem ersten Schritt wird die Bindung C5-C5' (**Abb. 17** ⑤ \rightarrow ⑥) gespalten und erst in einem zweiten Schritt kommt es zur Aufspaltung der Bindung C6-C6' (**Abb. 17** ⑥ \rightarrow ⑦). Das entstandene anionische Thyminradikal (**Abb. 17** ⑦) übertägt nun das Elektron zurück auf die neutrale semichinoide Form des katalytischen Kofaktors, wodurch der zyklische Elektronentransfer geschlossen ist und die reparierte DNA (**Abb. 17** ⑧) in einem letzten Schritt freigegeben wird^{5,76}. Durch *in vivo* Untersuchungen an *E. coli* fand man heraus, dass die 16-17 Photolyasemoleküle, die pro Zelle vorhanden sind, diesen Reparaturzyklus mindestens 25-mal durchlaufen können⁸⁵. Der katalytische Umsatz der CPD-Reparatur wurde dabei in älteren Publikationen in einem Größenbereich von 1 s^{-1} angegeben und die Quantenausbeute bei der direkten Anregung des

vollreduzierten FADH^- mit 80% bis 100% bestimmt⁵. Neuere Arbeiten zeigten jedoch eine Umsatzrate von $\geq 260 \text{ s}^{-1}$, die wahrscheinlich nur durch den Vorgang der Substratbindung limitiert ist⁸⁹, und eine Quantenausbeute der Reparatur von $\sim 50\%$ ⁹⁰. Im Vorfeld war bereits bekannt, dass der Elektronentransfer vom angeregten, vollständig reduzierten katalytischen Kofaktor FADH^* auf den CPD-Schaden in 170 ps und der Elektronenrücktransfer auf das intermediäre FADH^\bullet (Re-Reduktion des Kofaktors) nach der Reparatur in 560 ps stattfindet⁹¹. Desweiteren wurde die Zeit für den gesamten CPD-Reparaturvorgang im Subnanosekundenbereich eingeordnet⁹². In einer aktuellen Veröffentlichung konnten nun sämtliche Elektronentransfervorgänge und damit der komplette Reparaturvorgang des CPD-Schadens mit Hilfe von UV/Vis-Spektroskopie im Femtosekundenbereich am Beispiel der *Ec*CPDI zeitaufgelöst analysiert werden⁹³. In **Abb. 18** ist der vollständige CPD-Reparaturzyklus mit Angabe der aktuellen Reaktionszeiten der grundlegenden Schritte dargestellt⁹³.

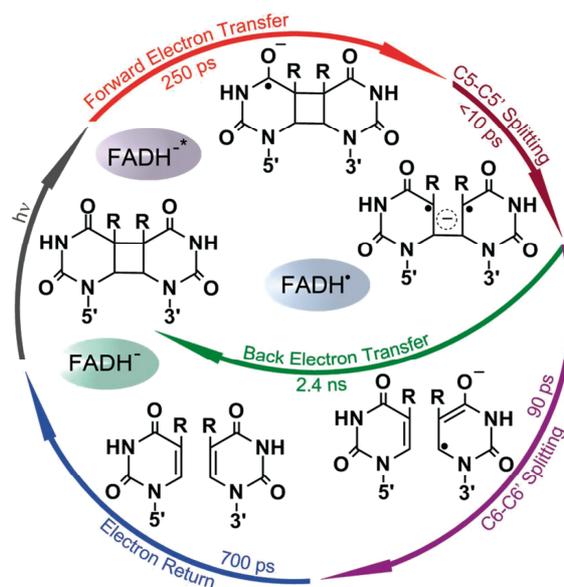


Abb. 18 Darstellung des zeitlich aufgelösten Reparaturzyklus einer CPD-Photolyase am Beispiel der *Ec*CPDI⁹³.

Während der initiale Elektronentransfer ($\text{FADH}^* \rightarrow \text{T} \leftrightarrow \text{T}$) innerhalb von 250 ps abläuft, findet das Aufbrechen des Cyclobutanrings in zwei extrem schnellen Schritten statt. Zuerst erfolgt die Spaltung der Bindung C5-C5' innerhalb von <10 ps. Anschließend geschieht die Öffnung der Bindung C6-C6' in 90 ps. Der Rücktransfer des Elektrons auf den katalytischen Kofaktor ohne Brechen der zweiten Bindung verläuft in verhältnismäßig langsamen 2,4 ns, wodurch der Zyklus in Richtung der vollständigen Reparatur kanalisiert wird. Die Re-Reduktion des FADH^\bullet am Ende dieses zyklischen Elektronentransfers ist wiederum komplett vom Aufbrechen des Cyclobutanrings entkoppelt und findet in 700 ps statt.

Ausgehend vom anfänglichen Elektronentransfer werden somit die Produkte dieser enzymatischen Katalyse, zwei reparierte Thyminer, in zwei aufeinanderfolgenden Schritten in 90 ps bzw. 700 ps gebildet.

Diese zeitaufgelösten Untersuchungen an der *E. coli* Photolyase trugen ebenfalls dazu bei, dass neue Rückschlüsse auf den Elektronentransferweg zwischen dem vollständig reduzierten katalytischen Kofaktor FADH^- und dem gebundenen CPD-Schaden gezogen werden konnten⁹⁴ (**Abb. 19**).

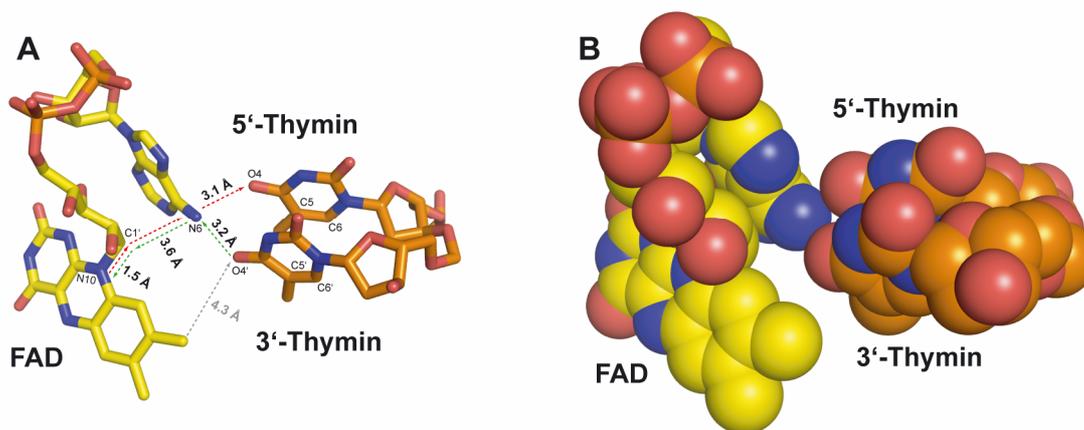


Abb. 19 Darstellung der CPD-Bindung anhand des *AnCPDI*•CPD-DNA Komplexes⁸⁶. (A) Relative Anordnung des katalytischen Kofaktors FAD und der beiden Thyminer nach *in situ* Reparatur. Der Elektronenweg im Vorfeld der Reparatur ist in rot und der Rücktransfer auf den Kofaktor nach der Reparatur in grün dargestellt. Der ungünstige Elektronentransfer durch den Raum über 4,3 Å ist in grau angedeutet. (B) Die raumfüllende Darstellung dieser Anordnung zeigt, dass der Transfer über den Adeninanteil des FAD vollständig über Van-der-Waals-Kontakte stattfindet.

Bereits in Abwesenheit einer verfügbaren Struktur eines *Phr*•CPD-DNA Komplexes wurde aufgrund von theoretischen Berechnungen postuliert, dass der Elektronentransfer in Richtung CPD-Schaden über den Adeninanteil des FAD stattfindet kann⁹⁵. Diese Vermutung konnte anschließend durch die Kenntnis der strukturellen Details der Bindungstasche anhand des *AnCPDI*•CPD-DNA Komplexes bekräftigt werden⁸⁶. Aufgrund der aktuellen Daten ist nun bekannt, dass der anfängliche Elektronenweg über den Stickstoff N6 des Adenins auf das 5'-Thymin verläuft und somit die ungewöhnliche U-förmige Anordnung des Kofaktors einen funktionalen Sinn besitzt (**Abb. 19A**). Dieser Adenin-vermittelte Vorwärts-Transfer, genauso wie der Rück-Transfer über das 3'-Thymin, findet vollständig über Van-der-Waals-Kontakte der beteiligten Atome statt (**Abb. 19B**) und besitzt in beiden Fällen eine hohe Direktionalität⁹⁴.

1.8 Motivation und Zielsetzung

Im Gegensatz zu den umfangreich strukturell als auch biochemisch und funktionell charakterisierten Klasse I CPD Photolyasen wie z. B. aus *E. coli* oder *A. nidulans* gab es zu Beginn dieser Arbeit für den Klasse II Subtyp nur rudimentäre Informationen. Die Charakterisierung einzelner Klasse II CPD Photolyasen beschränkte sich meist auf die Identifizierung in den jeweiligen Organismen und die anschließende spektroskopische Analyse des nativen bzw. rekombinanten Enzyms oder auf phänotypische Untersuchungen. Strukturelle Informationen waren für diese phylogenetisch distinkte Gruppe an CPD-Photolyasen nicht vorhanden und Homologiemodelle konnten aufgrund der geringen paarweisen Sequenzidentitäten nur bedingt Aufschluss über strukturell relevante, funktionelle Aspekte geben. Die exklusive Verbreitung in Tieren und Pflanzen und das experimentell nachgewiesene Potential zur Erhöhung der Widerstandsfähigkeit gegenüber UV-Strahlung machen die Klasse II CPD Photolyasen zu einem Objekt von akademischem und (agrar-)wirtschaftlich relevantem Interesse. Da die bisherigen Erkenntnisse über den Klasse I Subtyp nur sehr eingeschränkt übertragbar sind, stellt die Erforschung der Klasse II CPD Photolyasen ein derzeit nahezu unerschlossenes Forschungsfeld dar.

Die Wahl der zu untersuchenden Photolyasen fiel hierbei auf die archaealen Vertreter aus der Gattung *Methanosarcina*, welche mit paarweisen Sequenzidentitäten von $\geq 45\%$ zu Enzymen aus mehrzelligen Organismen geeignete Modellproteine darstellen und im Gegensatz zu den homologen Enzymen aus Pflanzen opportune Eigenschaften während der Aufreinigung als rekombinantes, in *E. coli* hergestelltes Protein zeigen.

Der Fokus dieser Arbeit lag neben der eingehenden biochemischen und funktionellen Charakterisierung der archaealen Klasse II CPD Photolyase aus *Methanosarcina mazei* insbesondere auf der proteinkristallographischen Ebene, um damit zum strukturbasierten Verständnis dieses weitgehend unerforschten Subtyps einen wichtigen Beitrag liefern zu können.

1.9 Terminologie der charakterisierten Photolyasen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Klasse II CPD-Photolyase aus *Methanosarcina mazei* ohne Antennenchromophor („apoMmCPDII“) als auch mit der Antenne („holoMmCPDII“) untersucht. Alternative Schreibweisen für das Holoenzym sind „MmCPDII•8-HDF“ (*in vivo* Rekonstitution) bzw. „MmCPDII•8-HDF_{soak}“ (*in vitro* Rekonstitution). Die Photolyase im Allgemeinen wird als „MmCPDII“ bezeichnet. Mutanten der Photolyase werden z. B. in der Form „MmCPDII-W360F“ abgekürzt. Alle weiteren Photolyasen werden wie folgt bezeichnet:

Photolyase	Abkürzung
<i>Methanosarcina barkeri</i> Klasse II CPD-Photolyase	MbCPDII
<i>Arabidopsis thaliana</i> Klasse II CPD-Photolyase	AtCPDII
<i>Anacystis nidulans</i> Klasse I CPD-Photolyase	AnCPDI
<i>Thermus thermophilus</i> Klasse I CPD-Photolyase	TtCPDI
<i>Drosophila melanogaster</i> (6-4)-Photolyase	Dm(6-4)

Die in dieser Arbeit verwendete allgemeine Abkürzung für Photolyasen ist „Phr“. Ergänzend wird für die Spezifikation einer Klasse eine jeweilige Erweiterung, z. B. „CPDII“, verwendet oder zur Bezeichnung der Holophotolyasen das Suffix „•8-HDF“ angehängt.

2 Materialien

2.1 Geräte

2.1.1 Allgemein

24-well VDX-Platte	<i>Hampton Research</i>
Agarosegelapparatur	<i>Feinmechanik, Marburg</i>
Agarosegeldokumentationssystem	<i>Herolab</i>
ÄKTA Purifier-System	
Box 900	
Pumpe P-900	
Fraktionskollektor Frac-950	<i>GE Healthcare</i>
Monitor pH/C-900	
Monitor UV-900	
Amicon Ultra - 15 (MWCO 30.000)	<i>Millipore</i>
Amicon Ultra - 4 (MWCO 30.000)	<i>Millipore</i>
Autoklav HMC HV-110L	<i>HMC</i>
Autoklav T-Line	<i>Fedegari</i>
Brutschrank	<i>Binder</i>
Digital pH-Meter	<i>Sartorius</i>
Einmalküvetten aus Polystyrol	<i>Sarstedt</i>
Elektrophorese-Spannungsquelle EPS 301	<i>GE Healthcare</i>
Elektroporationsgerät MicroPulser	<i>Biorad</i>
Elektroporationsküvetten (2 mm)	<i>VWR</i>
FastPrep24	<i>MP Biomedicals</i>
Feinwaage PC2200	<i>Mettler</i>
French Press	<i>Thermo</i>
Gelschüttler 3013	<i>GFL</i>
GeneAmp PCR System 2400	<i>Perkin Elmer</i>
Heizblock BT3	<i>Grant Instruments</i>
High Pressure Homogenizer (Fluidizer)	<i>Avestin</i>
HisTrap-FF-Säulen	<i>GE Healthcare</i>
Inkubationsschüttler	<i>Infors</i>
Inkubationsschüttler Certomat IS	<i>Sartorius</i>
Kühlzentrifuge 5810 R	<i>Eppendorf</i>
Kühlzentrifuge Biofuge 13R	<i>Heraeus</i>
Kühlzentrifuge J2-HS mit JA-10 & JA-20 Rotor	<i>Beckmann</i>
Mikrodialyseknöpfe (10 µL, stabförmig)	<i>Hampton Research</i>

Ni-NTA Spin Kit	<i>Qiagen</i>
Ni-NTA Superflow	<i>Qiagen</i>
Peristaltikpumpe P-1	<i>GE Healthcare</i>
Pipetten <i>Eppendorf research</i>	<i>Eppendorf</i>
QIAcube	<i>Qiagen</i>
QIAprep Spin Miniprep Kit	<i>Qiagen</i>
QIAquick Gel Extraction Kit	<i>Qiagen</i>
QIAquick PCR Purificaton Kit	<i>Qiagen</i>
Reinstwasseranlage Seralpur Pro90CN	<i>Seral</i>
SDS-PAGE Apparatur MightySmall II SE250	<i>Hoefler Scientific</i>
SnakeSkin Dialysemembran (3,5 kDa)	<i>Pierce</i>
Spektrometer Ultrospec 3100 Pro	<i>Biochrom Ltd.</i>
Spritzenvorsatzfilter Filtropur S 0.2	<i>Sarstedt</i>
Spritzenvorsatzfilter Filtropur S 0.45	<i>Sarstedt</i>
Steritop-GP Filter Unit (0,22 µm)	<i>Millipore</i>
Superdex200 prep grade	<i>Qiagen</i>
Thermocycler TPersonal	<i>Biometra</i>
Ultrafree Filter (0,22 µm)	<i>Millipore</i>
Ultraschallgerät Sonifier 250	<i>Branson</i>
Vortex-Genie2	<i>Scientific Industries</i>
Waage LabStyl 54	<i>Mettler</i>
Wasserbad NK22	<i>Haake</i>
Zentrifuge Biofuge pico	<i>Heraeus</i>

2.1.2 UV/Vis- und Fluoreszenzspektroskopie

Durchlaufkühler DLK 1002	<i>Fryka</i>
Einmalküvetten aus Polystyrol	<i>Sarstedt</i>
Fluoreszenz-Küvette (10 mm)	<i>Hellma</i>
<i>high power</i> LED 385 nm (3,5 mW cm ⁻² auf 5 cm)	<i>Roithner Lasertechnik</i>
<i>high power</i> LED 450 nm (9,7 mW cm ⁻² auf 10 cm)	<i>Roithner Lasertechnik</i>
Küvettenhalter CUV	<i>OceanOptics</i>
Lichtleiter (100 µm, 200 µm, 600 µm)	<i>OceanOptics</i>
Lichtquelle DH-2000-BAL	<i>Mikropack</i>
NanoDrop 1000	<i>Thermo Scientific</i>
Peltier-Element ETCS-761	<i>Jasco</i>
Spektrometer Maya 2000 Pro	<i>OceanOptics</i>
Spektrometer Ultrospec 3100 Pro	<i>Biochrom Ltd.</i>
Spektrometer V-660	<i>Jasco</i>
UV/Vis-Quarzküvette (10 mm)	<i>Hellma</i>

2.1.3 Proteinkristallisation

24-well EasyXtal-Platte	<i>Qiagen</i>
24-well EasyXtal-Platte (mit <i>drop guards</i>)	<i>Qiagen</i>
24-well VDX-Platte	<i>Hampton Research</i>
CryoCaps (with data matrix)	<i>Molecular Dimensions</i>
CryoLoops	<i>Hampton Research</i>
CrystalCap HAT	<i>Hampton Research</i>
CrystalCap HT Vial	<i>Hampton Research</i>
Deckgläser (22 mm)	<i>Hampton Research</i>
Headlights mit Rotlicht-LEDs (656 nm)	<i>Roithner Lasertechnik</i>
Honeybee 963	<i>Digilab</i>
Kristallisationsscreens	<i>Qiagen</i>
Microsys SQ4000	<i>Cartesian Technologies</i>
Mikroskop MZ8	<i>Leica</i>
MiTeGen MicroMount Loops	<i>Jena Bioscience</i>
MRC2 96-well Platte	<i>Jena Bioscience</i>
VIEWseal	<i>Greiner Bio-One</i>

2.2 Chemikalien

Acrylamid (Rotiphorese Gel30)	<i>Roth</i>
Agar-Agar	<i>Roth</i>
Agarose	<i>Invitrogen</i>
Bacto-Trypton & Yeast Extrakt	<i>Difco</i>
Bradfordreagenz	<i>Biorad</i>
Coomassie-Brilliant Blue R-250	<i>Serva</i>
Dikaliumhydrogenphosphat	<i>Merck</i>
DL-Dithiothreitol	<i>Sigma</i>
EDTA	<i>Roth</i>
Ethidiumbromid	<i>Roth</i>
FAD	<i>Sigma</i>
FMN	<i>Boehringer</i>
Imidazol	<i>Merck</i>
IPTG	<i>Duchefa</i>
Kaliumdihydrogenphosphat	<i>Merck</i>
Kanamycinsulfat	<i>AppliChem</i>
Lysozym	<i>Boehringer</i>
MassRuler DNA Ladder Mix	<i>Fermentas</i>
Molekularbiologische Enzyme	<i>New England Biolabs</i>
MTHF	<i>Schricks Laboratories</i>
Natriumchlorid	<i>Sigma Aldrich</i>
Natriumdihydrogenphosphat	<i>Merck</i>
Natriumhydroxid	<i>Merck</i>
PMSF	<i>Fluka</i>
SDS	<i>Merck</i>
Streptomycinsulfat	<i>Sigma</i>
TEMED	<i>Roth</i>
Tris	<i>Roth</i>
Unstained Protein Marker (SM0431)	<i>Fermentas</i>
Virkon	<i>VWR</i>
β -Mercaptoethanol	<i>Roth</i>

In dieser Liste nicht aufgeführte Chemikalien wurden entweder von *Fluka*, *Merck* oder *Sigma Aldrich* bezogen.

2.3 Chemikalien für die Proteinkristallisation

Die Chemikalien für die Proteinkristallisation stammen von der Firma *Fluka*.

2.4 Kulturmedien (flüssig)

Die verwendeten Kulturmedien wurden vor der Verwendung für 20 Minuten bei 121° C und 1 bar Überdruck autoklaviert. Verwendete Antibiotika wurden in den entsprechenden Konzentrationen vor der Inokulation des Mediums hinzugegeben.

2.4.1 LB-Medium (*lysogeny broth*)^{96,97}

LB-Medium	
10 g	Bacto-Trypton
5 g	Bacto Yeast Extract
10 g	NaCl
400 µL	NaOH (10 M)
add 1 L	dH ₂ O

2.4.2 TB-Medium (*terrific broth*)⁹⁸

TB-Medium	
12 g	Bacto-Trypton
24 g	Bacto Yeast Extract
4 mL	Glycerin (87%)
add 900 mL	dH ₂ O

Zur Komplettierung des Mediums wurden 100 mL des separat autoklavierten Phosphatpuffers hinzugefügt.

Phosphatpuffer für TB-Medium	
2,3 g	KH ₂ PO ₄ (0,17 M)
16,4 g	K ₂ HPO ₄ *3H ₂ O (0,72 M)
add 100 mL	dH ₂ O

2.4.3 SOC-Medium (*super optimal broth with catabolite repression*)⁹⁹

SOC-Medium	
20 g	Bacto-Trypton
5 g	Bacto Yeast Extract
0,5 g	NaCl
add 1 L	dH ₂ O

Zusätzlich wurden dem Medium vor dem Autoklavieren 10 mL einer KCl-Lösung (250 mM, pH 7,0) zugegeben.

2.5 Kulturmedium (fest)

2.5.1 LB-Agar

LB-Agar	
10 g	Bacto-Trypton
5 g	Bacto Yeast Extract
10 g	NaCl
400 µL	NaOH (10 M)
1,5% (w/v)	Agar
add 1 L	dH ₂ O

2.6 Stammlösungen

Stammlösung	Konzentration
dNTP-Mix	10 mM
DTT	1 M
EDTA	100 mM
Glucose	1 M
IPTG	1 M
Kanamycin	35 mg/mL
Lysozym	50 mg/mL
PMSF	200 mM
Streptomycin	50 mg/mL

2.7 *E. coli* Stämme

E. coli BL21-Gold(DE3) (*Stratagene*)

Genotyp: *E. coli* B F⁻ *ompT hsdS*(r_B⁻ m_B⁻) *dcm*⁺ Tet^r *gal* λ(DE3) *endA Hte*

Der Expressionsstamm *E. coli* BL21-Gold(DE3) ist für Plasmidvektoren mit T7-Promoter, wie z. B. pET- und pCDF-Vektoren, geeignet, da die Zellen eine chromosomale Kopie des Gens für die T7-RNA-Polymerase besitzen. Die über den Prophagen DE3 nach *lacZ* und dem *lacUV5*-Promotor im Chromosom insertierte und durch IPTG induzierbare T7-RNA-Polymerase ermöglicht die kontrollierte Expression von Genen unter Kontrolle des T7-Promotors. Die Transformationseffizienz wird durch den Hte-Phänotyp gesteigert. Der Bakterienstamm besitzt außerdem keine *ompT*- und Lon-Proteasen, welche für den Abbau rekombinanter Proteine verantwortlich sind. Das *endI*-Gen, welches die Endonuklease I codiert, ist inaktiviert.

E. coli DH5α (*Invitrogen*)

Genotyp: *E. coli* F⁻ Φ80*lacZ*ΔM15 Δ(*lacZYA-argF*) U169 *recA1 endA1 hsdR17* (r_K⁻, m_K⁺) *phoA supE44* λ⁻ *thi-1 gyrA96 relA1*

Der Stamm *E. coli* DH5α wurde für die molekularbiologischen Methoden verwendet, da er sich durch eine hohe Transformationseffizienz als auch durch eine erhöhte Stabilität der Plasmide während dieser Arbeiten auszeichnet.

2.8 Vektoren

pET-28a(+)-Vektor (*Novagen*)

Der Vektor pET-28a(+), der eine Kanamycinresistenz vermittelt, wurde als Standardexpressionsvektor für sämtliche in dieser Arbeit untersuchten Photolyasen verwendet. Dieser Vektor basiert auf einem der ersten künstlich hergestellten Plasmide pBR322 und ist eng verwandt mit dem natürlich in *E. coli* vorkommenden Plasmid ColE1. Der Replikationsursprung (*ori*) pMB1 ist dem *ori* ColE1 sehr ähnlich und gehört daher zu der gleichen Inkompatibilitätsgruppe. Die Kopienanzahl von pET-28a(+) liegt nach Herstellerangaben bei ~40 Plasmide pro Zelle.

pCDF-Duet1-Vektor (*Novagen*)

Das Duet-System zeichnet sich durch zwei vorhandene *multiple cloning sites (mcs)* und der vielfältigen Kombinationsmöglichkeiten zwischen den einzelnen Duet-Vektoren aus. In dieser Arbeit wurde der pCDF-Duet1-Vektor, der eine Streptomycinresistenz vermittelt, für die Konstruktion des Kofaktorplasmids verwendet. Das Plasmid besitzt den Replikationsursprung CloDF13 und ist somit kompatibel zu den pET-Expressionsvektoren. Die Kopienanzahl liegt nach Herstellerangaben bei 20-40 Plasmide pro Zelle.

2.9 Oligonukleotide

Sämtliche verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma *Metabion* in der Reinheitsstufe „entsalzt“ für PCR-Ansätze und „HPLC-gereinigt“ für die Proteinkristallisation bezogen.

2.9.1 Oligonukleotide für die Proteinkristallisation

Für die Kristallisation des *MmCPDII*•CPD-DNA Komplexes wurde folgendes Oligonukleotid mit einem zentralen, synthetischen CPD-Schaden, der über ein Formacetal verknüpft ist, von Andreas Glas aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Thomas Carell (Ludwig-Maximilians-Universität, München) zur Verfügung gestellt: 5'-ATCGGCT<>TCGCGCA-3'⁸⁶. Als Komplementärstrang wurde verwendet: 5'-TGCGCGAAGCCGAT-3'.

2.9.2 Primer

Konstrukt	Primer	Plasmid
<i>MmCPDII</i> -WT	5'-CTAGGCCATATGAAATCCGAAACGTATCAGG-3' 5'-CCCCTCGAGCTACAAAGCTGAATATTTTC-3'	pET-28a- His ₆ <i>MmCPDII</i>
<i>MmCPDII</i> -W381F <i>Xba</i> I	5'-CACGCGCATGTACTTCGCAAAAAAATCTAGAAATGGAGCG-3' 5'-CGCTCCATCTAGAAATTTTTTTCGGAAGTACATGCGCGTG-3'	pET-28a- His ₆ <i>MmCPDII</i> -W381F
<i>MmCPDII</i> -W360F <i>Nhe</i> I	5'-CACATGACCCACTCTTCAACGCTAGCCAGATGGAAC TTC-3' 5'-GAAGTTCATCTGGCTAGCGTTGAAGAGTGGGTCATGTG-3'	pET-28a- His ₆ <i>MmCPDII</i> -W360F
<i>MmCPDII</i> -W388F <i>Eco</i> RI	5'-GGGCAAAAAAATCTGGAATTCAGCGAATCTCCCG-3' 5'-CGGGAGATTCGCTGAATTCAGAAATTTTTTTGCCC-3'	pET-28a- His ₆ <i>MmCPDII</i> -W388F
<i>MmCPDII</i> -Y345F <i>Xba</i> I	5'-GTGAGGAGTCATATCTTCACTCTAGAAAGAGTTCGAAAGC-3' 5'-GCTTCGAACTCTTCTAGAGTGAAGATATGACTCCTCAC-3'	pET-28a- His ₆ <i>MmCPDII</i> -Y345F
<i>MmCPDII</i> -Y380F <i>Mlu</i> I	5'-GCACGGTTACACGCGTATGTTCTGGGCAAAAAAATCTGG-3' 5'-CCAGAATTTTTTTGCCCCAGAACATACGCGTGTAACCGTGC-3'	pET-28a- His ₆ <i>MmCPDII</i> -Y380F
<i>MmCPDII</i> -N403D <i>Pvu</i> I	5'-GAAATTGCAATCTGCCTGGACGATCGGTATGAACTTGACG-3' 5'-CGTCAAGTTCATACCGATCGTCCAGGCAGATTGCAATTTTC-3'	pET-28a- His ₆ <i>MmCPDII</i> -N403D

<i>Mm</i> CPDII-N403L <i>Pvu</i> I	5'-GAAATTGCAATCTGCCTGCTCGATCGGTATGAACTTGACG-3' 5'-CGTCAAGTTCATACCGATCGAGCAGGCAGATTGCAATTC-3'	pET-28a- His ₆ <i>Mm</i> CPDII-N403L
<i>Mm</i> CPDII-N403A <i>Pvu</i> I	5'-GAAATTGCAATCTGCCTGGCCGATCGGTATGAACTTGACG-3' 5'-CGTCAAGTTCATACCGATCGGCCAGGCAGATTGCAATTC-3'	pET-28a- His ₆ <i>Mm</i> CPDII-N403A
<i>Sc</i> FbiC	5'-GCATTGAATTCGATGACGACTCCGCGACCTCC-3' 5'-GATATTCTCGAGTTAGTCCAGGACCGGCAGCAG-3'	pCDFDuet- His ₆ <i>Sc</i> FbiC
<i>An</i> CPDI	5'-GGTTTGCATATGGCGGCTCCGATTCTGTTTTGG-3' 5'-CCAAACTCGAGCTATGAATCGGGCTCAGCCTC-3'	pET-28a- His ₆ <i>An</i> CPDI
<i>Dm</i> (6-4)	5'-GCTTCGCATATGGATTACAAAGGTCCACG-3' 5'-GCCCGTCTCGAGTCAGGTTTCTGATTTCTC-3'	pET-28a- His ₆ <i>Dm</i> (6-4)
<i>Tr</i> CPDI	5'-GGAATTCATATGGGCCCTTCTCGTC-3' 5'-CGCGGATCCTACCCTCGGGCAGATCC-3'	pET-28a- His ₆ <i>Tr</i> CPDI

Tab. 1 Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Primer. Die angegebenen Restriktionsenzyme wurden für den jeweiligen analytischen Restriktionsverdau genutzt.

2.10 Puffer

Sämtliche Puffer wurden mit *d*H₂O angesetzt und nach dem Einstellen des pH-Wertes mit einem Steritop Sterilfilter (*Millipore*) zur Entfernung von Aggregaten filtriert und anschließend bei 8° C gelagert.

2.10.1 Affinitätschromatographie

Puffer I

50 mM NaH₂PO₄
300 mM NaCl
pH 8,0

Puffer II

50 mM NaH₂PO₄
300 mM NaCl
500 mM Imidazol
pH 8,0

AtPuffer I

50 mM NaH₂PO₄
500 mM NaCl
20% (v/v) Glycerin
pH 7,4

AtPuffer II_{Histidin}

50 mM NaH₂PO₄
500 mM NaCl
20% (v/v) Glycerin
150 mM L-Histidin
pH 7,4

AtPuffer II_{Imidazol}

50 mM NaH₂PO₄
500 mM NaCl
20% (v/v) Glycerin
500 mM Imidazol
pH 7,4

2.10.2 Gelfiltration**Puffer III**

10 mM Tris/HCl
100 mM NaCl
pH 8,0

AtPuffer III

20 mM Tris/HCl
300 mM NaCl
10% (v/v) Glycerin
pH 7,4

2.10.3 Puffer für die Photoreduktion**Puffer III_{DTT}**

10 mM Tris/HCl
100 mM NaCl
pH 8,0
50 mM DTT

3 Methoden

Sämtliche in dieser vorliegenden Arbeit durchgeführten Methoden mit gentechnisch veränderten Organismen (GVOs) wurden nach dem Gesetz zur Regelung der Gentechnik (GenTG) ausgeübt. Sofern erforderlich wurden die Arbeiten unter sterilen Bedingungen vollzogen. Die Inaktivierung der GMOs erfolgte entweder über das Autoklavieren oder chemisch durch die Verwendung von Virkon (VWR).

3.1 Molekularbiologische Methoden

Die molekularbiologischen Methoden wurden, sofern nicht anders angegeben, nach „Sambrook, Maniatis & Fritsch: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*“ durchgeführt⁹⁹.

3.1.1 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte UV/Vis-spektroskopisch am NanoDrop 1000 (*Thermo Scientific*) mittels Absorption bei 260 nm. Eine Absorption von $Abs_{260}=1$ entspricht dabei einer Konzentration von 33 ng/ μ L ssDNA bzw. 50 ng/ μ L dsDNA⁹⁹.

3.1.2 Hybridisierung komplementärer DNA

Für die Hybridisierung einzelsträngiger DNA wurde eine äquimolare Menge der beiden komplementären Einzelstränge auf 95° C im Thermomixer (*Eppendorf*) erhitzt und über einen Zeitraum von zwei bis drei Stunden auf Raumtemperatur abgekühlt.

3.1.3 Sequenzierung von DNA-Abschnitten

Zur Verifizierung von spezifischen DNA-Abschnitten wurden DNA-Sequenzierungen von der Firma *Qiagen* mit den aufgeführten Primern und der Sanger-Kettenabbruchmethode durchgeführt¹⁰⁰.

Vektor	Primer
pET-28a	T7-Promoter T7-Terminator
pCDFDuet (MCS1)	pACYCDuetUP1 DuetDOWN-1
pCDFDuet (MCS2)	DuetUP2 T7-Terminator

3.1.4 Amplifikation eines Genabschnitts aus genomischer DNA

Zur Vervielfältigung eines definierten Genabschnitts aus chromosomaler DNA oder Plasmid-DNA wurde die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction, PCR*) mit den jeweiligen komplementären Oligonukleotiden, sog. Primern, und der Phusion DNA-Polymerase (*Finnzymes*) nach Herstellerangaben durchgeführt¹⁰¹. Eine Auflistung der verwendeten Primer für die entsprechenden PCR-Ansätze befindet sich in **Tab. 1**.

3.1.5 Hydrolytische Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsnukleasen sind sequenzspezifische Endonukleasen, die DNA an bestimmten Stellen, den sog. Restriktionsschnittstellen, schneiden. In dieser Arbeit wurden verschiedene Enzyme der Firma *New England Biolabs* sowohl für analytische als auch präparative Ansätze nach Angaben des Herstellers verwendet.

3.1.6 Agarosegelelektrophorese

Die Analyse der amplifizierten DNA nach einer PCR und des DNA-Bandenmuster als Ergebnis eines hydrolytischen Verdaus als auch die präparative Auftrennung von DNA erfolgte durch die Agarosegelelektrophorese (1% (w/v) Agarose, TBE-Puffersystem). Dazu wurden die DNA-Proben im Verhältnis 1:5 mit 6x DNA-Probenpuffer versetzt. Die Elektrophorese wurde mit einer Spannung von 110 V durchgeführt und die DNA mittels Ethidiumbromid unter UV-Licht sichtbar gemacht.

TBE-Puffer (10x)

1 M Tris

1 M Borsäure

20 mM EDTA

DNA-Probenpuffer (6x)

0,25% (w/v) Xylenyanol FF

15% (w/v) Ficoll Typ 400

3.1.7 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Zur präparativen Isolierung von DNA wurde nach der Auftrennung mittels Agarosegelelektrophorese das QIAquick Gel Extraction Kit (*Qiagen*) nach Angaben des Herstellers verwendet¹⁰². Das Protokoll wurde sowohl manuell als auch automatisiert am QIAcube durchgeführt.

3.1.8 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Zur Plasmidpräparation aus *E. coli* wurde am Vorabend eine Übernachtskultur (5 mL LB-Medium) mit einer einzelnen Kolonie inokuliert und bei 37° C und 225 rpm im Schüttelinkubator inkubiert. Je nach zu isolierendem Plasmid wurde das entsprechende Antibiotikum der Kultur zugefügt. Am folgenden Tag wurden insgesamt 4 mL der ÜNK in einem 2 mL Reaktionsgefäß durch Zentrifugation pelletiert (5 min, 16060 g, RT) und der Überstand verworfen. Die Plasmidpräparation mittels Alkoholpräzipitation¹⁰³ erfolgte vor allem im Rahmen der Herstellung der *MmCPDII*-Mutanten durch ortsspezifische Mutagenese während das QIAgen-Kit zur Isolierung verifizierter Plasmide zum Einsatz kam.

3.1.8.1 Plasmidpräparation mittels Alkoholpräzipitation

Das Pellet der Übernachtskultur wurde in 250 µL P1-Puffer resuspendiert, die Zellsuspension mit 250 µL P2-Puffer versetzt und das Gemisch anschließend invertiert. Nach 5 min auf Eis wurde die Mischung mit 350 µL P3-Puffer neutralisiert und erneut für 15 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation (30 min, 13792 g, 4° C) zur Entfernung des weißen Niederschlags (Proteine bzw. Zelltrümmer) wurde der Überstand in ein neues 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt. Die Plasmid-DNA wurde nun durch Zugabe von 600 µL Isopropanol gefällt und durch Zentrifugation (30 min, 13792 g, 4° C) pelletiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit 350 µL Ethanol 70% (v/v) gewaschen und erneut zentrifugiert (15 min, 13792 g, 4° C). Nach dem vorsichtigen Abpipettieren des Ethanols wurde die Plasmid-DNA bei 30° C im Heizblock getrocknet und anschließend in 30 µL EB-Puffer aufgenommen. Die Lagerung der Plasmid-DNA erfolgte bei -20° C.

P1-Puffer (Resuspensionspuffer)

50 mM Tris/HCl, pH 8,0

10 mM EDTA

100 µg/mL RNaseA

P2-Puffer (Lysepuffer)

200 mM NaOH

1% (w/v) SDS

P3-Puffer (Neutralisationspuffer)

3 M KAc pH 5,5

EB-Puffer (Elutionspuffer)

10 mM Tris/HCl, pH 8,5

3.1.8.2 Plasmidpräparation unter Verwendung des Qiagen-Kits

Die Isolierung und Aufreinigung der Plasmid-DNA basierend auf die spezifische Bindung an Silicagel bei hohen Konzentrationen von chaotropen Salzen¹⁰⁴ wurde sowohl manuell als auch automatisiert mit Hilfe des QIACube (*Qiagen*) unter Verwendung des QIAprep Spin Miniprep Kits (*Qiagen*) nach Protokoll durchgeführt. Das Elutionsvolumen betrug jeweils 30 μ L.

3.1.9 Übertragung freier Plasmid-DNA in das *E. coli* Expressionssystem

Im Gegensatz zum gram-positiven Modellorganismus *Bacillus subtilis* besitzt das in dieser Arbeit verwendete Expressionssystem *E. coli* keine natürliche Kompetenz, wodurch die Zellen nicht in der Lage ist, extrazelluläre DNA aus der Umgebung aufzunehmen. Da die verwendeten *E. coli*-Stämme ebenfalls kein Fertilitätsplasmid (F-Plasmid) besitzen, findet kein horizontaler Gentransfer durch Konjugation zwischen einzelnen Individuen statt. Die Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen erfolgte nach den im Folgenden beschriebenen Methoden.

3.1.9.1 Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen

Für die Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen wurde zunächst aus einer Glycerinkultur ein Ausstrich auf einer LB-Agarplatte mit einer Impföse hergestellt, um nach der Inkubation bei 37° C über Nacht eine Einzelkolonie zu erhalten. Am folgenden Abend wurde mit einem einzelnen Klon eine Übernachtskultur (50 mL bzw. 5 mL LB-Medium) inokuliert und bei 37° C und 225 rpm im Schüttelinkubator inkubiert.

3.1.9.2 Herstellung elektrokompetenter *E. coli* Zellen¹⁰⁵

Die Übertagkultur (1 L LB-Medium) wurde mit 10 mL der ÜNK angeimpft und bei 37° C und 225 rpm im Schüttelinkubator bis zu einer OD_{595nm} von ca. 0,8 inkubiert. Nach Abkühlen der Kultur im Eisbad für 20 min, wurde die Zellsuspension zentrifugiert (10 min, 4412 g, 4° C) und anschließend der Überstand verworfen. Daraufhin wurden die pelletierten Zellen in 450 ml ddH₂O (autoklaviert, im Eisbad gekühlt) resuspendiert und die Suspension erneut zentrifugiert (10 min, 4412 g, 4° C). Dieser Waschschrift wurde wiederholt und ein drittes Mal mit dem gleichen Volumen 10% (v/v) Glycerin (autoklaviert, im Eisbad gekühlt) durchgeführt. Nach dem Zentrifugationsschritt wurde das *E. coli*-Pellet in 2,5 mL 10% (v/v) Glycerin (autoklaviert, im Eisbad gekühlt) resuspendiert, in Aliquots zu je 50 µL (1,5 mL Reaktionsgefäße, autoklaviert) in N₂(l) schockgefroren und bei -80° C gelagert.

3.1.9.3 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* Zellen¹⁰⁶

Die Übertagkultur (50 mL LB-Medium) wurde mit 500 µL der ÜNK angeimpft und bei 37° C und 225 rpm im Schüttelinkubator bis zu einer OD_{595nm} von ca. 0,6 inkubiert. Nach der Zellernte (10 min, 3220 g, 4° C) wurde das Pellet in 15 mL TFBI-Puffer resuspendiert und für 2 h auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt (10 min, 3220 g, 4° C) und die Resuspension des Pellets in 2 mL TFBII-Puffer. Zuletzt wurden die kompetenten Zellen in Aliquots zu je 50 µL (1,5 mL Reaktionsgefäße, autoklaviert) in N₂(l) schockgefroren und bei -80° C gelagert.

TFBI-Puffer (steril filtriert)	
100 mM RbCl	1,21 g
50 mM MnCl ₂ *2H ₂ O	0,81 g
30 mM KAc	0,29 g
10 mM CaCl ₂ *2H ₂ O	0,15 g
15% (v/v) Glycerin	17,24 mL (87%)
add 100 mL ddH ₂ O	
TFBII-Puffer (steril filtriert)	
10 mM MOPS	0,21 g
10 mM RbCl	0,12 g
75 mM CaCl ₂ *2H ₂ O	1,13 g
15% (v/v) Glycerin	17,24 mL (87%)
add 100 mL ddH ₂ O	

3.1.9.4 Transformation elektrokompenter *E. coli* Zellen

Da die Transformationseffizienz elektrokompenter *E. coli* Zellen im Vergleich zu den chemisch kompetenten *E. coli* Zellen höher ist, werden diese vor allem verwendet, wenn das DNA-Material limitierend ist (z. B. nach einer DNA-Ligation) oder eine Vielzahl an unterschiedlichen Klonen benötigt wird (z. B. nach einer Mutagenese-PCR)¹⁰⁵.

Von einem DNA-Ligationsansatz oder einem *DpnI*-Verdau einer Mutagenese wurden 10 µL für 60 min gegen 10 mL ddH₂O unter Verwendung einer 0,025 µm Dialysemembran (*Millipore*) dialysiert. Ein Aliquot (50 µL) der elektrokompenten *E. coli* Zellen wurde anschließend mit 4 µL der dialysierten DNA versetzt, für 1 min auf Eis inkubiert und in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette überführt. Unter Verwendung des Elektroporationsgeräts *MicroPulser (Biorad)* und des Programms *Ec2* wurde die Zellsuspension einem Spannungsstoß von etwa 2,5 kV für 5-6 ms ausgesetzt.

3.1.9.5 Transformation chemisch kompetenter *E. coli* Zellen

Die Übertragung extrazellulärer DNA mittels chemischer Transformation erfolgte in den Fällen, in denen aufgereinigte Plasmid-DNA vorhanden war¹⁰⁷.

Ein Aliquot (50 µL) der chemisch kompetenten *E. coli* Zellen wurde in der Regel mit 0,2 µL der entsprechenden Plasmidlösung (~120 ng/µL) versetzt und anschließend für 30 min auf Eis inkubiert. Nach dem 90 s dauernden Hitzeschock bei 42° C in einem Wasserbad wurden die Zellen sofort auf Eis erneut abgekühlt. Nach der Zugabe von 950 µL LB-Medium wurde die Kultur für 60 min bei 37° C und 225 rpm im Schüttelinkubator inkubiert. Im Anschluss wurden jeweils 5% und 95% der Zellen auf einer LB-Agarplatte mit entsprechendem Selektionsmarker ausplattiert und über Nacht bei 37° C im Brutschrank inkubiert.

3.1.9.6 Co-Transformation chemisch kompetenter *E. coli* Zellen

Zur Transformation von *E. coli* Expressionsstämmen mit zwei unterschiedlichen Plasmiden wurde eine modifizierte Methode verwendet.

Die chemisch kompetenten Zellen wurden mit je 0,5 µL der jeweiligen Plasmidlösung versetzt, für 30 min auf Eis inkubiert und im Anschluss einem 90 s dauernden Hitzeschock ausgesetzt. Zur Kultivierung der Zellen bei 37° C und 225 rpm im Schüttelinkubator wurden 650 µL SOC-Medium und 10 µL Glucose (1 M) hinzugegeben. Nach 60 min wurden 100% der Zellen auf einer LB-Agarplatte mit beiden relevanten Selektionsmarkern ausplattiert und über Nacht bei 37° C inkubiert.

3.2 Proteinbiochemie Methoden

3.2.1 Bestimmung der Proteinlöslichkeit

Zur Bestimmung der Proteinlöslichkeit der jeweiligen rekombinanten Photolyase bei unterschiedlichen Expressionsbedingungen wurden zunächst sog. Testexpressionen und im Anschluss analytische Zellaufschlüsse bzw. Proteinaufreinigungen durchgeführt.

Von einer chemischen (Co-)Transformation mit der gewünschten Photolyase (**Tab. 2**) wurde eine 5 mL ÜNK (LB-Medium) mit den jeweiligen Antibiotika versetzt und mit einer einzelnen Kolonie inokuliert. Die Testexpressionen erfolgten in Erlenmeyerkolben (250 mL) mit 45 mL TB-Medium, 5 mL Phosphatpuffer und den jeweiligen Antibiotika bei verschiedenen Temperaturen. Die 50 mL Testexpressionskultur wurden mit 1 mL der ÜNK angeimpft und für 24 h bzw. 48 h bei 225 rpm inkubiert während die Genexpression durch die Methode der Autoinduktion¹⁰⁸ gestartet wurde. Nach der Zellernte durch Zentrifugation (30 min, 3220 g, 4° C) wurde das erhaltene Pellet kurzzeitig bei -20° C eingefroren. Für den analytischen Zellaufschluss mittels Sonotrode (*Branson*) auf Eiswasser oder FastPrep-24 Gerät (*MP Biomedicals*) wurde das Pellet in 2 mL Puffer I resuspendiert. Die Zellsuspension wurde nach dem Aufschluss zentrifugiert (30 min, 13792 g, 4° C) und eine Probe des Überstands für die analytische SDS-PAGE aufgearbeitet. Mit dem verbleibenden Überstand wurde eine analytische NiNTA-Affinitätschromatographie¹⁰⁹ mit den Ni-NTA Spin Säulen (*Qiagen*) am QIACube (*Qiagen*) bei Raumtemperatur oder manuell bei 4° C durchgeführt. Die Elution erfolgte in der Regel mit unverdünntem Puffer II. Von der Elutionsfraktion wurde ebenfalls eine Probe für die SDS-PAGE verwendet.

3.2.2 Produktion und Aufreinigung von rekombinanten Photolyasen

Sowohl für die heterologe Genexpression der apo*Mm*CPDII und der *Mm*CPDII-Mutanten als auch der holoPhotolyase (*Mm*CPDII•8-HDF) sowie der anderen untersuchten potentiellen PHR•8-HDF Komplexe wurde der Expressionstamm *E. coli* BL21-Gold(DE3) (*Stratagene*) verwendet. Nach erfolgreicher chemischer (Co-)Transformation der kompetenten Zellen mit den jeweiligen in **Tab. 2** aufgeführten Plasmiden wurde am Vorabend eine Übernachtskultur (50 mL LB-Medium) mit einer einzelnen Kolonie inokuliert und bei 37° C und 225 rpm inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Hauptkultur im Verhältnis 1:50 mit der ÜNK angeimpft. Die Kultivierung der *E. coli* Zellen erfolgte bei den in **Tab. 2** angegebenen Temperaturen und die Induktion der Genexpression erfolgte durch die Methode der Autoinduktion¹⁰⁸. Nach der Ernte der Zellen mittels Zentrifugation (20 min, 6354 g, 4° C,

JA-10) wurden die Pellets in 20 mL Puffer I je 1 L Hauptkultur resuspendiert und anschließend die Zellsuspension in $N_2(l)$ schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Photolyase-Konstrukt	Plasmid(e)	Expressionsbedingung
apo <i>Mm</i> CPDII	pET-28a-His ₆ <i>Mm</i> CPDII	25° C (24h)
holo <i>Mm</i> CPDII	pET-28a-His ₆ <i>Mm</i> CPDII pCDFDuet-His ₆ <i>ScFbiC</i>	25° C (24h)
<i>Mm</i> CPDII-W381F	pET-28a-His ₆ <i>Mm</i> CPDII-W381F	15° C (48h)
<i>Mm</i> CPDII-W360F	pET-28a-His ₆ <i>Mm</i> CPDII-W360F	25° C (24h)
<i>Mm</i> CPDII-W388F	pET-28a-His ₆ <i>Mm</i> CPDII-W388F	20° C (24h)
<i>Mm</i> CPDII-Y345F	pET-28a-His ₆ <i>Mm</i> CPDII-Y345F	20° C (24h)
<i>Mm</i> CPDII-Y380F	pET-28a-His ₆ <i>Mm</i> CPDII-Y380F	20° C (24h)
<i>Mm</i> CPDII-N403D	pET-28a-His ₆ <i>Mm</i> CPDII-N403D	15° C (24h)
<i>Mm</i> CPDII-N403L	pET-28a-His ₆ <i>Mm</i> CPDII-N403L	15° C (24h)
<i>Mm</i> CPDII-N403A	pET-28a-His ₆ <i>Mm</i> CPDII-N403A	15° C (24h)
holo <i>An</i> CPDI	pET-28a-His ₆ <i>An</i> CPDI pCDFDuet-His ₆ <i>ScFbiC</i>	21° C (24h)
holo <i>Dm</i> (6-4)	pET-28a-His ₆ <i>Dm</i> (6-4) pCDFDuet-His ₆ <i>ScFbiC</i>	18° C (24h)
holo <i>Tt</i> CPDI	pET-28a-His ₆ <i>Tt</i> CPDI pCDFDuet-His ₆ <i>ScFbiC</i>	25° C (24h)
holo <i>At</i> CPDII	pET-28a-His ₆ <i>At</i> CPDII pCDFDuet-His ₆ <i>ScFbiC</i>	25° C (48h)

Tab. 2 Expressionsbedingungen zur Produktion der rekombinanten Photolyasen in *E. coli* BL21-Gold(DE3).

Für den ersten Schritt der Proteinaufreinigung mittels NiNTA-Affinitätschromatographie¹⁰⁹ wurden die Puffer I und II verwendet. Sämtliche Arbeiten fanden bei 8°C im Kühlraum oder auf Eis statt. Nach Inkubation der Zellsuspension mit zugesetzten $30\ \mu\text{L}$ Lysozym ($50\ \text{mg/mL}$) für 10 min bei RT, erfolgte der Aufschluss der Zellen in einem Volumen von ungefähr $30\ \text{mL}$ entweder am Fluidizer (*Avestin*), an der French Press (*Thermo*) oder mit Hilfe des FastPrep-24 (*MP Biomedicals*) in Gegenwart von $0,02\ \text{mM}$ PMSF und $0,1\ \text{mM}$ EDTA. Nach Zentrifugation (30 min, $39086\ \text{g}$, 4°C , JA-20) wurde der Überstand mit einem $0,45\ \mu\text{m}$ Spritzenvorsatzfilter (*Sarstedt*) filtriert und anschließend auf eine selbst gegossene NiNTA-Säule (Säulenmaterial: Ni-NTA Superflow, Säulenvolumen: $\sim 5\ \text{mL}$, *Qiagen*) aufgetragen. Die Elution der gebundenen Proteine durch Verdrängung mit Imidazol erfolgte anfänglich in Form eines linearen Gradienten bis zu einer Konzentration von $500\ \text{mM}$ am

ÄKTA Purifier (*GE Healthcare*). Im Rahmen der Optimierung der Aufreinigungsmethode wurde die Peristaltikpumpe P-1 (*GE Healthcare*) mit HisTrap™-FF-Säulen (1 mL bzw. 5 mL Säulenvolumen, Flussrate: 1 ml/min, *GE Healthcare*) verwendet und die Photolyasen stufenweise mit den in **Tab. 3** angegebenen Schritten von der Säule eluiert und in 0,5 mL Fraktionen gesammelt. Nach Analyse der relevanten Fraktionen anhand der Gelbfärbung und/oder mittels SDS-PAGE wurden diese vereint und die Proteinlösung gegebenenfalls ankonzentriert. Vor der folgenden Gelfiltration¹¹⁰ wurde die Proteinlösung zur Entfernung von etwaigen Aggregaten durch einen 0,22 µm Ultrafree Filter (*Millipore*) filtriert. Als finalen Aufreinigungsschritt wurden Gelfiltrationsläufe am ÄKTA Purifier (*GE Healthcare*) zur Absorptionsmessung multipler Wellenlängen mit dem Superdex200-Säulenmaterial (Säulenvolumen: ~120 mL, *GE Healthcare*), Puffer III und einer Flussrate von 1 mL/min durchgeführt. Die erhaltenen Fraktionen wurden erneut anhand der Gelbfärbung und/oder mittels SDS-PAGE analysiert und je nach weiterer Verwendung vereint und ankonzentriert. Die Lagerung sämtlicher Photolyasen erfolgte bei 8° C im Kühlraum.

Schritt	Imidazol
W ₁	0 mM
W ₂	25 mM
Elution	250 mM
W ₃	500 mM

Tab. 3 Stufenweise Elution der *Mm*CPDII und der anderen Photolyasen.

Geringfügige Abweichungen von dem standardisierten Protokoll gab es bei der Aufreinigung der CPD-Photolyase aus *A. thaliana*. Neben der Tatsache, dass für die *At*CPDII die im **Kapitel 2.10.1** bzw. **2.10.2** aufgeführten *At*Puffer verwendet worden sind, erforderte die Sensibilität des Proteins gegenüber Imidazol eine andere Vorgehensweise bei der Elution während der NiNTA-Affinitätschromatographie. Aus diesem Grund wurde zur Verdrängung der His₆-getaggtten Photolyase von der HisTrap™-FF-Säule (1 mL Säulenvolumen, *GE Healthcare*) die Aminosäure L-Histidin verwendet. Diese Methode hatte jedoch den Nachteil, dass die komplexierten Ni²⁺-Ionen aus dem Säulenmaterial herausgewaschen wurden. Daher wurde das Protein alternativ mit etwa 125 mM Imidazol von der Säule eluiert und im Anschluss sofort auf das 4- bis 5-fache Volumen mit *At*Puffer I verdünnt. Nach dem Ankonzentrieren konnte die Gelfiltration wie bereits beschrieben mit *At*Puffer III durchgeführt werden.

3.2.3 Ankonzentrieren der Proteinproben

Sowohl nach der NiNTA-Affinitätschromatographie als auch nach der Gelfiltration wurden die Proteinlösungen mit Konzentratoren (Amicon Ultra, 4 mL bzw. 15 mL, 30 kDa cutoff, *Millipore*) ankonzentriert (5 min, 3220 g, 4° C). Zwischen den einzelnen Zentrifugationschritten wurde die Proteinlösung mehrmals auf- und abpipettiert, um lokale Konzentrationsmaxima und damit ein Ausfallen des Proteins zu vermeiden.

3.2.4 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli diente der qualitativen Proteinanalyse und der Kontrolle des zu reinigenden Proteins¹¹¹ mit Hilfe eines Standards. Bei dieser Methode werden die Proteine im Vorfeld durch das anionische Detergenz Natriumdodecylsulfat (*sodium dodecyl sulfate*, SDS) und das Reduktionsmittel β -Mercaptoethanol unter Einwirkung von Wärme vollständig denaturiert und linearisiert. Durch die stark negative Ladung des SDS wird außerdem die Proteinladung überlagert, wodurch neben einer uniformen, Gehstock-artigen Struktur alle aufzutrennenden Protein•SDS Komplexe ein ähnliches Massen-Ladungs-Verhältnis besitzen und somit nur über ihr Molekulargewicht aufgetrennt werden. Die SDS-PAGE wurde mit Gelen einer Kombination aus 12%-igen Trenngel und 4%-igen Sammelgel (**Tab. 4**) in einer Mighty Small II SE250 Apparatur (*Hoefler Scientific*) mit 25 mA pro Gel durchgeführt. Als Standard diente ein Proteinmarker definierter Zusammensetzung (*Fermentas*) und die Anfärbung der Proteinbanden erfolgte mit Coomassie Brilliant Blue R-250¹¹².

	12% Trenngel	4% Sammelgel
Trenngelpuffer	33,4 mL	
Sammelgelpuffer		20 mL
dH ₂ O	25 mL	64,5 mL
30% (v/v) Acrylamidlösung	40 mL	13,4 mL
10% (w/v) SDS	1 mL	1 mL
TEMED	100 μ L	100 μ L
10% (w/v) APS	500 μ L	1 mL

Tab. 4 Zusammensetzung der SDS-PAGE-Gele (Gesamtvolumen: 100 mL).

Zur Analyse wurde in der Regel die jeweilige Probe im Verhältnis 1:1 mit dem SDS-Probenpuffer gemischt und anschließend im Heizblock bei 95° C für 10 min

hitzenedenaturiert. In die Geltaschen wurden 5 μ L Standard bzw. 10 μ L der jeweiligen Probe aufgetragen.

Sammelgelpuffer	0,625 M Tris/HCl, pH 6,8
Trenngelpuffer	1,125 M Tris/HCl, pH 8,8 30% (w/v) Saccharose

SDS-PAGE Probenpuffer	62,5 mM Tris/HCl, pH 6,8 15% (v/v) Glycerin 4% (w/v) SDS Spatelspitze Bromphenolblau 4% (v/v) β -Mercaptoethanol
----------------------------------	--

SDS-PAGE Laufpuffer	25 mM Tris 200 mM Glycin 0,1% (w/v) SDS
--------------------------------	---

Färber	0,25% (w/v) Coomassie R-250 5% (v/v) Essigsäure 50% (v/v) Ethanol
---------------	---

Entfärber	5% (v/v) Essigsäure 28% (v/v) 2-Propanol
------------------	---

3.2.5 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte photometrisch mittels Bradford-Test¹¹³ (*Biorad*) bei einer Wellenlänge von 595 nm. Als Referenz diente eine BSA-Kalibriergerade.

3.2.6 *In vitro* Rekonstitution der apoMmCPDII

Zur Identifikation des Antennenchromophors wurde apoMmCPDII (53 μ M) mit verschiedenen potentiellen Cofaktoren (FAD, FMN, MTHF, F420 bzw. chemisch synthetisiertes 8-HDF) in äquimolaren Mengen versetzt. Als Negativkontrollen dienten

sowohl apoMmCPDII ohne zusätzlichen Cofaktor als auch entsprechender Cofaktor versetzt mit Puffer III. Der experimentelle Aufbau entsprach der Kristallisation mittels Mikrodialyse (**Abb. 20**). Die stabförmigen Mikrodialyseknöpfe mit einem Volumen von 10 μL (*Hampton Research*) wurden mit einer SnakeSkin[®] Dialysemembran der Ausschlussgröße 3,5 kDa (*Pierce*) verschlossen und anschließend auf eine gefettete VDX-Kristallisationsplatten gesetzt. Nach der Dialyse gegen 1,5 mL Puffer III für 24 h bei 8° C, wurde die *in vitro* Rekonstitution UV/Vis-spektroskopisch mittels NanoDrop 1000 (*Thermo Scientific*) analysiert.

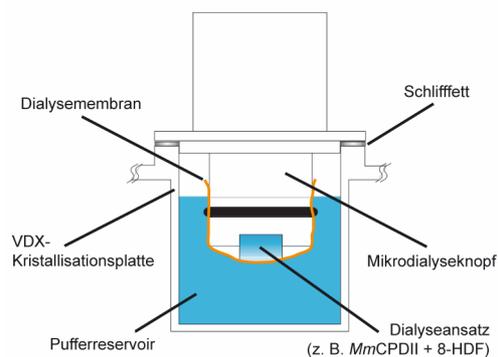


Abb. 20 Experimenteller Aufbau zur *in vitro* Rekonstitution von Photolyasen mit Cofaktoren mittels Mikrodialyse (modifizierte Abbildung von *Hampton Research*).

3.2.7 UV/Vis-Spektroskopie

Die UV/Vis-spektroskopischen Methoden wurden entweder mit dem Spektrometer V-660 (*Jasco*) oder mit dem Maya 2000 Pro Spektrometer (*OceanOptics*) und der DH-2000-BAL Lichtquelle (*Mikropack*) unter Verwendung einer 10 mm Quarzküvette (*Hellma*) durchgeführt. Die Kühlung des Spektrometers V-660 erfolgte über den angeschlossenen Durchlaufkühler DLK 1002 (*Fryka Kältetechnik*) in Kombination mit dem Peltier-Element ETCS-761 (*Jasco*). Als Referenz wurde Puffer III bzw. Puffer III mit entsprechender Konzentration an DTT verwendet. Die Darstellung bzw. Auswertung der spektroskopischen Daten erfolgte mit Origin 7 (*OriginLab Corporation*).

3.2.7.1 Aufnahme von Absorptionsspektren

Absorptionsspektren der charakterisierten Photolyasen bzw. der PHR•8-HDF Komplexe wurden in Puffer III und den aufgeführten Parametern mit dem Spektrometer V-660 (*Jasco*) aufgenommen.

Parameter der UV/Vis-Spektroskopie	
Temperatur	8° C
Datenintervall	0,5 nm
UV/Vis-Bandweite	1,0 nm
Rückmeldung	schnell
Geschwindigkeit	1000 nm/min
Akkumulation	3

3.2.7.2 Photoreduktion der *Mm*CPDII und der *Mm*CPDII-Mutanten

Die Probenvorbereitung für Experimente zur Photoreduktion der Photolyasen erfolgte unter Rotlicht. Das Enzym wurde im Verhältnis 1:1 mit Puffer III_{DTT} gemischt, um eine Endkonzentration von 25 mM DTT zu erreichen. Nach einer Inkubation im Dunkeln für 5 min wurde das erste Spektrum (t_0) aufgenommen und die Photolyase anschließend mit einer 450 nm *high power* LED (9,7 mW cm⁻² bei 10 cm Abstand, *Roithner Lasertechnik*) in einem Abstand von 15 cm kontinuierlich belichtet. Für die qualitative Analyse der Photoreduktion wurden Spektren nach 2 min bzw. 30 min aufgenommen. Um detaillierte Aussagen über den Photoreduktionsverlauf treffen zu können wurden Absorptionsspektren nach 1 min (t_1), 3 min (t_3), 10 min (t_{10}) und 30 min (t_{30}) Gesamtbelichtungszeit aufgenommen. Während der Aufnahme der Spektren wurde die *high power* LED ausgeschaltet.

3.2.7.3 Bestimmung von Photoreduktionskinetiken

Zur Ermittlung der Photoreduktionskinetiken wurde die Absorption bei 450 nm in Intervallen von 1 s über einen Zeitraum von 30 min bei 8° C, einer UV/Vis-Bandweite von 2,0 nm und einer kontinuierlichen Belichtung mit der 450 nm *high power* LED im Abstand von 15 cm aufgezeichnet. Die Messung für jedes Photolyase-Konstrukt wurde dreimal wiederholt und die Daten gegen einen exponentiellen Zerfall der ersten Ordnung mit Origin 7 (*OriginLab Corporation*) gefittet.

3.2.8 *In crystallo* UV/Vis-Spektroskopie

Die in dieser Arbeit dargestellten *in crystallo* UV/Vis-Spektren wurden an der *online cryobench* der *European Synchrotron Radiation Facility* (ESRF) in Grenoble (Frankreich) mit einer DH-2000-BAL Lichtquelle (*Mikropack*) und einem HR2000 Spektrometer (*OceanOptics*) bei 100 K aufgenommen. Für die *in crystallo* Photoreduktion wurden Proteinkristalle des *MmCPDII*•CPD-DNA Komplexes in einem Kryopuffer mit zusätzlichen 10 mM DTT eingefroren. UV/Vis-Spektren wurden sowohl nach Belichtung mit der 450 nm *high power* LED unter kryogenen Bedingungen als auch nach Belichtung bei Raumtemperatur aufgenommen. Für letztere Spektren wurde der Stickstoffstrom unterbrochen (*cryo annealing*). Zur Untersuchung der strahlungsinduzierten Photoreduktion wurden *MmCPDII*•CPD-DNA Kristalle ohne DTT im Kryopuffer verwendet. Die Aufnahme des Spektrums erfolgte nach der Bestrahlung mit Synchrotron-Strahlung (Flux: $\sim 5,0 \cdot 10^{10}$ Photonen/s) für 300 s bei 100 K. Alle *in crystallo* UV/Vis-Spektren wurden dreimal mit einer Mittelung von drei angrenzenden Datenpunkten geglättet.

3.2.9 Fluoreszenz-Spektroskopie

Fluoreszenzspektren der apo*MmCPDII* und des *MmCPDII*•8-HDF Komplexes in Puffer III wurden am Spektrofluometer FP-6500 (*Jasco*) mit einer 10 mm Fluoreszenzküvette (*Hellma*) bei 4° C aufgenommen. Die Anregung der Proteinproben erfolgte bei 420 nm mit einer UV/Vis-Bandweite von 3 nm. Die UV/Vis-Bandweite zur Detektion der Emission betrug 5 nm. Die Anregung der Referenzen erfolgte mit einer 385 nm *high power* LED (*Roithner Lasertechnik*). Die Fluoreszenzspektren wurden mit dem Maya 2000 Pro Spektrometer (*OceanOptics*) aufgezeichnet.

3.2.10 Transiente EPR-Spektroskopie der *MmCPDII*

Mit Hilfe der EPR-Spektroskopie (*electron paramagnetic resonance*) ist es möglich, Einblicke in die Struktur und die Dynamik paramagnetischer Moleküle zu bekommen^{114,115,116}. Für die Untersuchung müssen die Moleküle daher mindestens ein ungepaartes Elektron bzw. ein intrinsisch paramagnetisches Moment besitzen. In den von Andreas Schöppach (AG Prof. Weber, Albert-Ludwigs-Universität, Freiburg) durchgeführten transienten EPR-spektroskopischen Messungen an der apo*MmCPDII* und der Mutante *MmCPDII*-W360F sollte die Radikalpaarbildung zwischen katalytischem Kofaktor FAD und den Tryptophanen des Elektronentransferwegs untersucht werden. Die paramagnetischen

Zustände der Photolyase wurden durch einen kurzen Laserpuls (~ 6 ns) mit einer Wellenlänge von 460 nm und einer Leistung zwischen 0,2 W und 2 W induziert. Details zur Theorie und zur Durchführung der EPR-Spektroskopie sind in der Diplomarbeit von Andreas Schöppach zu finden¹¹⁷.

3.2.11 Zeitaufgelöste UV/Vis-Absorptionsspektroskopie der *Mm*CPDII

Untersuchungen mittels zeitaufgelöster UV/Vis-Absorptionsspektroskopie wurden in Kooperation mit Dr. Klaus Brettel und Dr. Pavel Müller am *Institute of Biology and Technology Saclay* (iBiTec-S) am CEA Saclay (Gif-sur-Yvette, Frankreich) durchgeführt. In den Experimenten wurden der lichtinduzierte Elektronentransfer zwischen katalytischem Kofaktor FAD und den elektronenleitenden Aminosäuren, die anschließenden Rekombinationen und die damit verbundenen Änderungen der Protonierungszustände im Zeitbereich von 300 ps bis 1 s analysiert. Der experimentelle Aufbau für Messungen im Zeitbereich von 300 ps bis 100 μ s entsprach im Prinzip **Abb. 21**. Eine Besonderheit dieser Apparatur ist die Verwendung von Dauerstrich-Lasern als Messlichtquellen, wobei das Messlicht mechanisch gepulst wird (Pulslänge: 140 μ s), um die Belastung der Probe durch das Messlicht zu begrenzen. Die hohe Lichtleistung der Laser ermöglicht es, bei einer für die konventionelle zeitaufgelöste Absorptionsspektroskopie ungewöhnlich hohen Zeitauflösung (300 ps; begrenzt durch die elektronische Bandbreite des Detektionssystems von 2 GHz) und entsprechend hohem Detektorrauschen noch ein befriedigendes Signal-zu-Rauschen Verhältnis zu erzielen. Details sind in der dazugehörigen Literatur beschrieben¹¹⁸.

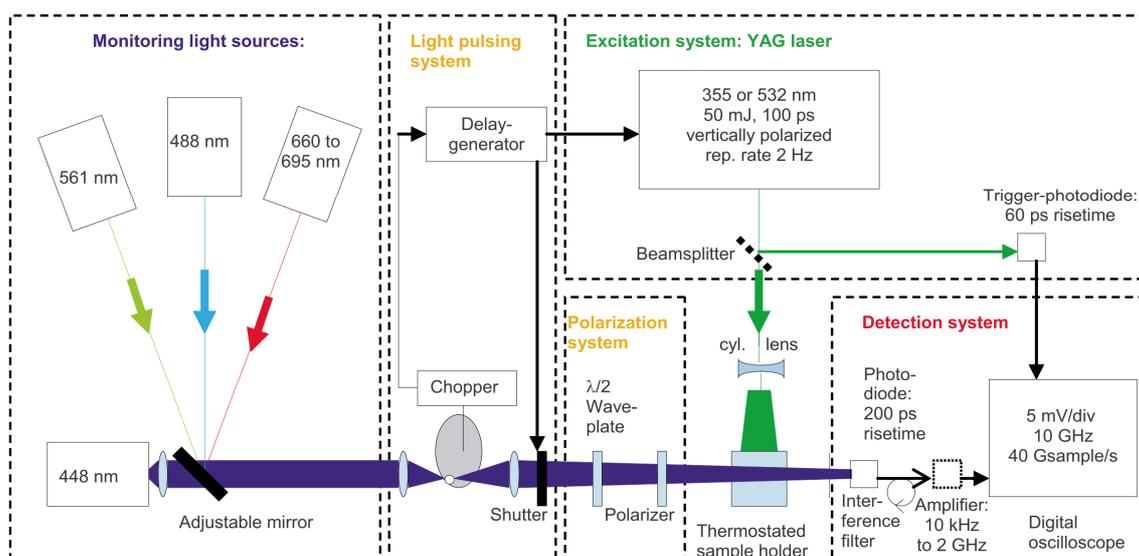


Abb. 21 Schematischer Aufbau zur Untersuchung der *Mm*CPDII mittels hoch-zeitaufgelöster UV/Vis-Absorptionsspektroskopie¹¹⁸.

Für Messungen im Zeitbereich von 1 μs bis 1 s wurde eine Glühlampe als Messlichtquelle und ein auf maximal 1 MHz begrenztes Detektionssystem verwendet⁷⁹. Untersucht wurden neben der apo*Mm*CPDII auch die Mutanten *Mm*CPDII-W360F und *Mm*CPDII-W388F. Die Proteinproben befanden sich in Puffer III in einer 10×2×8 mm (L×B×H) Quarzküvette und hatten für die jeweiligen Messungen bei 8° C eine Konzentration von etwa ~40 μM . Die Anregung der Proben erfolgte über einen Laserblitz von 100 ps Pulsdauer bei 355 nm durch das 10×8 mm Fenster der Küvette (optischer Weg für den Anregungsstrahl: 2 mm). Der Messlichtstrahl verlief im rechten Winkel zum Anregungsstrahl (optischer Weg für das Messlicht: 10 mm). Blitzinduzierte Transmissionsänderungen wurden von einer Photodiode detektiert, evtl. verstärkt und durch ein Digital-Oszilloskop als zeitlich aufgelöstes Spannungssignal $U(t)$ registriert. In der Regel wurden mehrere Anregungen mittels Laserblitz und die daraus resultierenden Spannungsverläufe gemittelt. Absorptionsänderungen wurden mit folgender Gleichung berechnet, wobei U_0 die kurz vor dem Anregungsblitz detektierte Spannung ist.

$$\Delta A(t) = -\log\left(\frac{U(t)}{U_0}\right)$$

Gleichung 1

Im ersten experimentellen Aufbau unter Verwendung von Laser-Messlicht wurde bei folgenden Wellenlängen detektiert: 562 nm, 457 nm und 403 nm. Im zweiten Aufbau, in dem eine Glühlampe als Messlichtquelle diente, wurden die Absorptionsänderungen unter Verwendung von Interferenzfiltern bei 610 nm, 560 nm, 520 nm, 450 nm, 410 nm und 380 nm verfolgt.

3.2.12 Überprüfung der Reparaturaktivität und Bestimmung der Affinität zu DNA

Sowohl die Experimente zum Nachweis der Reparaturaktivität als auch zur Bestimmung der Affinität zu ungeschädigter bzw. CPD-haltiger DNA wurden von Yann Geisselbrecht durchgeführt und mir freundlicherweise für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.

Für den qualitativen Nachweis der DNA-Reparaturaktivität der *Mm*CPDII wurde ein modifizierter Aktivitätstest durchgeführt¹¹⁹. Für diesen Zweck wurde die Photolyase (4,6 μM) mit einem leichten molaren Überschuss an CPD-Schaden (5 μM), in Oligonukleotid (dT)₁₈ induziert, für 5 min in Puffer III_{DTT} im Dunkeln inkubiert und anschließend mit einer 385 nm

high power LED (*Roithner Lasertechnik*) belichtet. Die DNA-Reparaturaktivität der Photolyase wurde anhand der Absorptionzunahme bei 265 nm verfolgt.

Zur Bestimmung der Affinität der *Mm*CPDII zu ungeschädigter als auch CPD-haltiger doppelsträngiger DNA wurden *electrophoretic mobility shift assays* (*EMSA*) durchgeführt²⁵. In diesem Zusammenhang fanden sämtliche Arbeiten mit IRDye700-gelabelter DNA unter Grünlicht statt, um eine Degradation des Fluorophors zu vermeiden. Um eine ungewollte DNA-Reparatur zu verhindern, wurden die Arbeiten in denen zusätzlich die Photolyase verwendet wurde, unter Rotlicht ausgeführt. Die Synthese des 50mer Oligonukleotids mit einem einzelnen CPD-Schaden fand nach der in der Literatur beschriebenen Methode statt. Der einzelne Ansatz hatte ein Gesamtvolumen von 10 µL und enthielt 2 nM doppelsträngige DNA mit oder ohne CPD-Schaden und ansteigende Konzentrationen (0 nM, 5 nM, 10 nM, 50 nM, 100 nM, 200 nM, 300 nM, 400 nM, 500 nM, 600 nM, 800 nM bzw. 1000 nM) an Photolyase. Nach einer Inkubation für 30 min auf Eis im Assaypuffer (10 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl, 10% (v/v) Glycerin, pH 8,0) wurde das Bindungsverhalten mittels nativer PAGE (5%) in TBE-Puffer (25 mM Tris, 25 mM Borsäure, 0,625 mM EDTA, pH 8,4) bei 4° C analysiert. Die fluoreszierenden Banden wurden anschließend mit dem *Odyssey Imaging System* (*LI-COR Biosciences*) analysiert und mit der Herstellersoftware quantifiziert. Die Daten aus insgesamt drei Messreihen wurden sowohl mit einer einfachen Hill-Gleichung¹²⁰ (**Gleichung 2**) als auch mit einer Formel, in der spezifische und unspezifische Bindung berücksichtigt wurde (**Gleichung 3**), zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten mittels *Origin 7* (*OriginLab Corporation*) ausgewertet.

$$\theta = \frac{[DNA]^n}{K_{D,NS}^n + [DNA]^n}$$

Gleichung 2

$$\theta = 0,5 \cdot \left(\frac{[DNA]}{K_{D,S} + [DNA]} + \frac{[DNA]^n}{K_{D,NS}^n + [DNA]^n} \right)$$

Gleichung 3

3.3 Proteinkristallisation & Strukturanalyse – Generelle Aspekte

Die Aufklärung der dreidimensionalen Struktur eines Proteins oder des Komplexes aus Protein und Ligand kann für das Verständnis der Funktion auf molekularer Ebene einen wesentlichen Beitrag liefern. Neben Methoden wie der Kleinwinkelröntgenstreuung (*small angle X-ray scattering*, SAXS)¹²¹ und der Kryoelektronenmikroskopie¹²², mit denen allerdings nur die Umhüllung eines Proteins bestimmt werden kann, gibt es für die Strukturaufklärung auf atomarer Ebene die NMR-Spektroskopie¹²³ an Proteinen und die in dieser Arbeit durchgeführte Proteinkristallstrukturanalyse. In der Strukturanalyse basierend auf dem Beugungsverhalten von hoch geordneten Proteinkristallen bei Verwendung monochromatischer Strahlung stellt jedoch der erste Schritt, die Kristallisation des Proteins, häufig den Engpass dieser Methode zur Strukturbestimmung dar.

3.3.1 Proteinkristallisation

Da es im Vorfeld nicht möglich ist anhand der biochemischen und biophysikalischen Eigenschaften des Proteins oder des Komplexes aus Protein und Ligand das Kristallisationsverhalten zu bestimmen, müssen zahlreiche unterschiedliche Kristallisationsbedingungen und -faktoren berücksichtigt werden. Das Herausfinden einer idealen Bedingung zur Kristallisation von Proteinen ist daher von empirischer Natur und hängt von unterschiedlichsten Parametern ab, die in **Tab. 5** zusammengefasst sind. Da in der Praxis neben der Proteinkonzentration und der Kristallisationstemperatur vor allem chemische Faktoren der Kristallisationsbedingung relativ leicht zu beeinflussen sind, hat die Einführung der sog. *sparse-matrix-screens*¹²⁴, in denen eine Reihe unterschiedlichster Fällungsmittel, Fällungsmittelkonzentrationen, Salze, pH-Werte etc. getestet werden, und der Einsatz von Robotik im Hochdurchsatzbetrieb zum erleichterten Auffinden geeigneter Bedingungen beigetragen.

physikalisch	chemisch	biochemisch
Temperatur bzw. Temperaturänderungen	pH-Wert	Reinheit bzw. Fremdstoffe
Oberfläche	Art des Präzipitans	Ligand, Inhibitor, Effektor
Methode zum Erreichen des Equilibriums	Konzentration des Präzipitans	Aggregationszustand
Schwerkraft	Ionenstärke	posttranslationale Modifikationen
Druck	Ionenspezifität	Ursprung des Makromoleküls
Zeit	Grad der Übersättigung	Proteolyse bzw. Hydrolyse
Vibrationen bzw. Erschütterungen	Redoxzustand der Umgebung	chemische Modifikationen
Elektrostatische bzw. magnetische Felder	Konzentration der Makromoleküle	genetische Modifikationen
dielektrische Eigenschaften des Mediums	Metallionen	inhärente Symmetrie
Viskosität des Mediums	Crosslinker bzw. Polyionen	Stabilität
Grad des Equilibriums	Detergenzien, Surfactants, Amphophile	isoelektrischer Punkt
(homogene/heterogene) Kristallisationskeime	nicht-makromolekulare Unreinheiten	Alter der Probe

Tab. 5 Überblick über physikalische, chemische und biochemische Faktoren, die die Kristallisation von Makromolekülen beeinflussen¹²⁵.

3.3.2 Das Phasenproblem der Kristallstrukturanalyse

Um das Modell eines Proteins und damit dessen dreidimensionale Struktur darstellen zu können, benötigt man die Elektronendichteverteilung innerhalb der Einheitszelle. Wie jede andere periodische Funktion, kann diese Elektronendichte $\rho(x,y,z)$ als Summe einer Fourierreihe beschrieben werden (**Gleichung 4**).

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

Gleichung 4

Ähnlich wie bei einer eindimensionalen Welle die als Kosinus- oder Sinusfunktion beschrieben werden kann (**Gleichung 5** bzw. **Gleichung 6**), ist auch jeder einzelne Strukturfaktor F_{hkl} , der eine vollständige Beschreibung einer gebeugten Welle ist, eine

periodische Funktion, die durch eine Amplitude, eine Frequenz und eine Phase charakterisiert wird.

$$f(x) = F \cos 2\pi(hx + \alpha)$$

Gleichung 5

$$f(x) = F \sin 2\pi(hx + \alpha)$$

Gleichung 6

Um die Elektronendichte $\rho(x,y,z)$ berechnen zu können, sind diese Informationen zwingend erforderlich. Da die Frequenz durch die Wellenlänge der verwendeten monochromatischen Strahlung bekannt und die Amplitude von F_{hkl} proportional zu der Quadratwurzel der Intensität ($I^{1/2}$) eines Reflexes ist, sofern Absorptions- und Polarisierungseffekte zunächst vernachlässigt werden, kann dadurch die Strukturfaktoramplitude direkt ermittelt werden. Es ist aber nicht möglich, die Phasen anhand der Diffraktionsbilder direkt zu bestimmen. Mit anderen Worten, die notwendige Phaseninformation zur Beschreibung der periodischen Funktion geht intrinsisch während der Datensammlung verloren. Wenn man nun berücksichtigt, dass jeder Reflex eine eigene Phaseninformation besitzt und somit in der Gesamtheit mehr Information trägt als die leichter zu bestimmende Intensität¹²⁶, wird deutlich wie zentral das Phasenproblem der Proteinkristallographie in der Praxis ist. Kevin Cowtan hat dies in seinem *Book of Fourier* sehr anschaulich illustriert¹²⁷. Mit Hilfe eines Farbkreises wird die Phase eines Reflexes als Winkel zwischen 0° und 360° codiert (**Abb. 22**). Die Farbe „Rot“ stellt z. B. einen Phasenwinkel von 0° dar, während die Farbe „Grün“ ein Winkel von ungefähr 135° ist. Die Intensität wiederum wird als Intensität der entsprechenden Farbe codiert. Somit steht ein „dunkles Rot“ für eine hohe Intensität bei einem Phasenwinkel von 0° . Auf diese Weise lässt sich ein Reflex vollständig beschreiben.

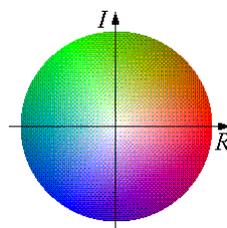


Abb. 22 Farbkreis zur Codierung der Phase und der Intensität eines Reflexes¹²⁷.

Wenn nun von einem beliebigen Molekül, z. B. Ethylbenzol, mit dieser Codierung eine Fourier-Transformation berechnet wird, erhält man folgendes Bild welches wieder zurückgerechnet werden kann (**Abb. 23**).

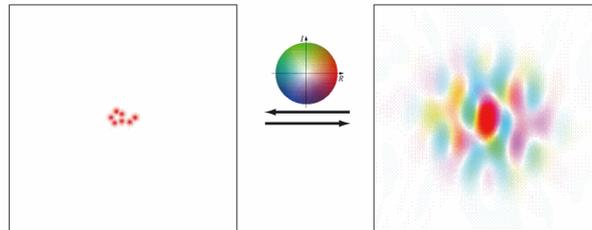


Abb. 23 Fourier-Transformation von Ethylbenzol mit Hilfe der Farbcodierung¹²⁷.

Diese Umrechnung ist nicht nur mit einem einzelnen Molekül möglich, sondern auch mit einem Cluster periodisch angeordneter Moleküle, so wie die Situation auch in einem Proteinkristall gegeben ist (**Abb. 24**).

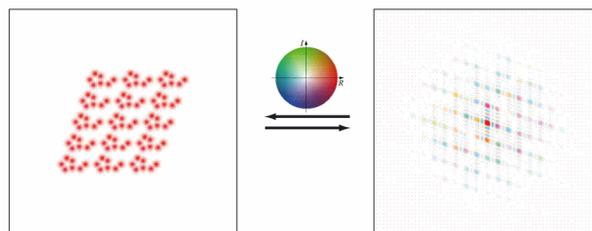


Abb. 24 Fourier-Transformation von einem Cluster periodisch angeordneter Ethylbenzolmoleküle mit Hilfe der Farbcodierung¹²⁷.

In röntgenographischen Experimenten geht jedoch die Phaseninformation aufgrund der nicht möglichen Fokussierung der gebeugten Strahlen verloren, wodurch die experimentell erhaltenen Diffraktionsbilder mit dem Ergebnis in (**Abb. 25**) gleichzusetzen sind.

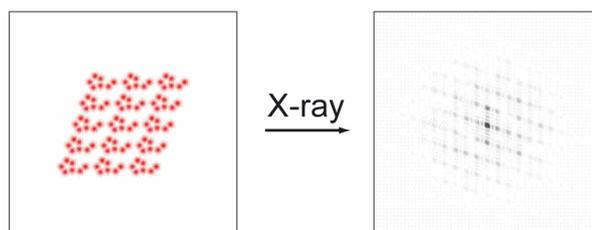


Abb. 25 In dem vorgestellten Schema kommt der Verlust der Phase dem Verlust der Farbinformation gleich¹²⁷. Es ist nicht mehr möglich die Struktur zu berechnen.

Mit dieser Darstellungsmethode lässt sich ebenfalls die Tatsache, dass die Phasen einen höheren und für die Strukturlösung wichtigeren Informationsgehalt besitzen als die messbaren Intensitäten, anschaulich illustrieren. In **Abb. 26** sind die nach dem Schema berechneten Fourier-Transformationen einer Katze und einer Ente dargestellt.

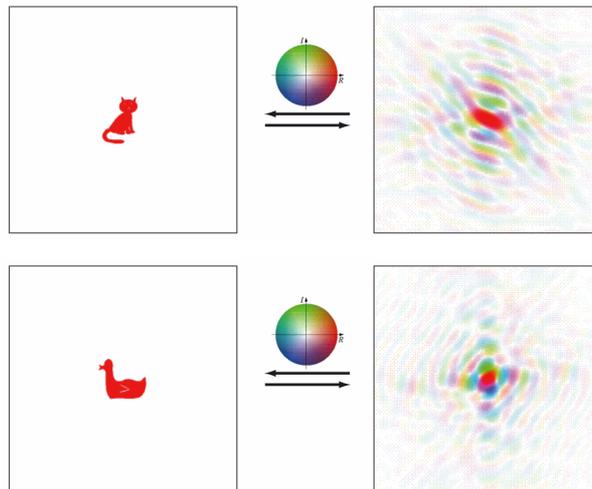


Abb. 26 Fourier-Transformation einer Katze und einer Ente mit Hilfe der Farbcodierung¹²⁷.

Kombiniert man nun die Intensitäten (Schattierungen) der Ente mit den Phasen (Farben) der Katze, so erhält man bei der Rückrechnung eine deutlich erkennbare Katze und keine Ente (**Abb. 27**). Die Phasen enthalten somit tatsächlich mehr Informationen.

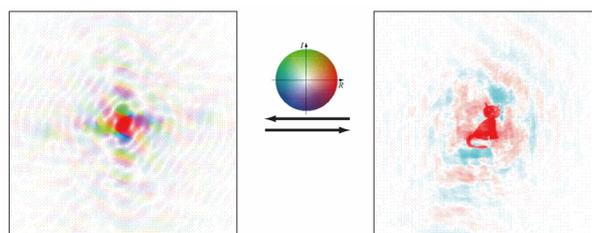


Abb. 27 Rückrechnung einer Kombination aus Intensitäten der Ente und Phasen der Katze¹²⁷.

3.3.3 Lösung des Phasenproblems

Die in dieser Arbeit verwendete Methode zur Lösung dieses zentralen Problems der kristallographischen Strukturaufklärung war die Methode des molekularen Ersatzes (*engl. molecular replacement, MR*)¹²⁸. Die Idee hinter dieser Methode ist, dass die Phasen und somit die Struktur eines bisher unbekanntes Proteins mittels den experimentell erhaltenen Intensitäten und den bereits bekannten Phasen eines strukturell ähnlichen Proteins bestimmt werden kann. Die (strukturelle) Verwandtschaft der Proteine untereinander drückt sich neben einer ähnlichen Funktion vor allem durch die paarweise Sequenzidentität aus. Dadurch kann

davon ausgegangen werden, dass bei Sequenzidentitäten von über 30% das *molecular replacement* erfolgreich ist. Allerdings können auch Suchmodelle mit 20% Sequenzidentität zum Erfolg führen¹²⁹. Diese Methode lässt sich ebenfalls nach der Idee von Kevin Cowtan visualisieren. In **Abb. 28** ist eine Katze zu sehen, deren Struktur bekannt ist. Folglich besitzt die Fourier-Transformation ebenfalls Phaseninformationen was sich in dem farbigen Bild widerspiegelt.

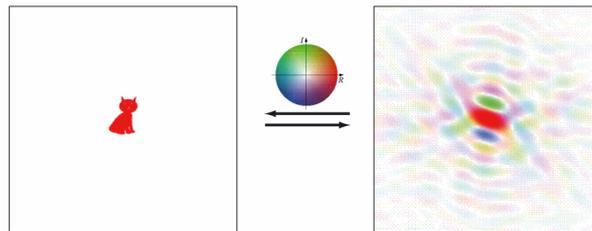


Abb. 28 Fourier-Transformation einer bekannten Katze mit Hilfe der Farbcodierung¹²⁷.

Die Informationen, die wir aus einem Beugungsexperiment mit einer unbekannt Katzenstruktur erhalten, enthalten allerdings keine Phaseninformationen und sind daher farblos (**Abb. 29**).

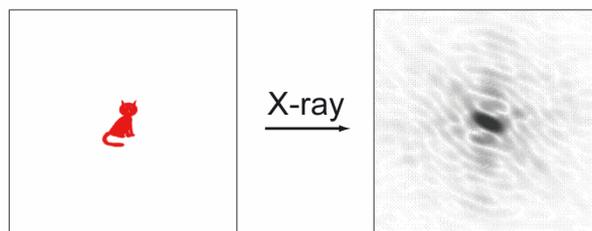


Abb. 29 Daten aus Beugungsexperimenten enthalten nur Intensitäten (Schattierungen) aber keine Phaseninformationen (Farben)¹²⁷.

Kombiniert man nun die Phaseninformation einer bekannten Struktur mit den Intensitäten einer unbekannt Katze, wird das Bild wieder sichtbar und die Information, die in den experimentellen Intensitäten steckt, ist ausreichend, um die Unterschiede zwischen den beiden Strukturen sichtbar zu machen (**Abb. 30**).

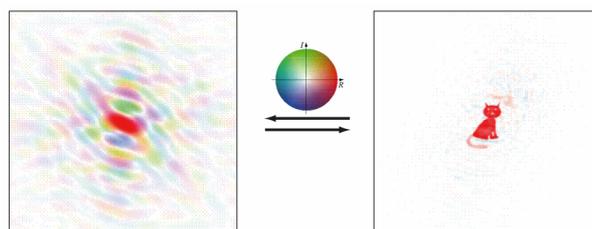


Abb. 30 Rückrechnung der experimentellen Intensitäten mit bekannten Phasen¹²⁷.

Generell kann beim *molecular replacement* von zwei unterschiedlichen Ansätzen gesprochen werden. Wenn das unbekannte Protein zu dem Modell, welches zur Phasierung herangezogen wird, isomorph ist, können die bekannten Phasen direkt genutzt werden, um die Elektronendichte $\rho(x,y,z)$ anhand der nativen Intensitäten zu berechnen (**Gleichung 7**). Dies ist in der Praxis z. B. beim *soaking* eines Liganden in bereits analysierte Proteinkristalle der Fall.

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

Gleichung 7

Wenn das Phasierungsmodell (auch: Suchmodell) allerdings nicht isomorph ist, stellt sich die Phasierung mittels *molecular replacement* etwas komplizierter dar: Es existieren sechs Freiheitsgrade (Rotation um die Winkel ϕ , ψ und χ bzw. Translation entlang der Achsen a , b und c), die die Position der neuen Struktur innerhalb der Einheitszelle definieren. Die Programme zur Phasierung mittels *molecular replacement* gehen in zwei aufeinanderfolgenden Schritten vor. Als erstes findet eine sog. Rotationsuche statt, in der das Suchmodell um alle drei Raumachsen gedreht wird. Anschließend wird die beste Position in der Translationssuche in alle drei Raumrichtungen bewegt, um die am besten zu den experimentell ermittelten Daten passende Position zu bestimmen. Zur Evaluierung der jeweils ermittelten Positionen wird eine Methode verwendet, die mit *maximum-likelihood*-Algorithmen arbeitet und auch in dem verwendeten Programm *PHASER*¹³⁰ aus dem *CCP4*-Programmpaket¹³¹ zum Einsatz kommt. Hierbei ist der ermittelte *z-score* ein Indiz für die Richtigkeit der Position innerhalb der Einheitszelle (**Gleichung 8**). Der *z-score* wird berechnet aus dem logarithmischen *likelihood gain* (LLG_L) der eventuellen Lösung abzüglich eines logarithmischen *likelihood gain* (LLG_R) einer willkürlichen Anordnung unter Berücksichtigung einer Standardabweichung einer zufälligen Auswahl an LLG -Werten ($rmsd_{LLG}$).

$$z - score = \frac{LLG_L - LLG_R}{rmsd_{LLG}}$$

Gleichung 8

Ein weiteres wichtiges Kriterium, auf das auch in der Praxis des *molecular replacements* eingegangen werden muss, ist die Anzahl der sog. *clashes*. Als *clash* bezeichnet man die

Überlappung von Atomen in einer Kristallpackung und kann im Rahmen des *molecular replacements* durch eine falsche Lösung (= hohe Anzahl an *clashes*) aber auch durch Loopstrukturen des Proteins (= geringere Anzahl an *clashes*) hervorgerufen werden. Aus diesem Grund kann entweder die Anzahl der tolerierten *clashes* für eine mögliche Lösung erhöht werden oder das verwendete Suchmodell wird von nicht erwarteten Proteinschleifen bereinigt. Ein abschließender Punkt bildet in diesem Zusammenhang die Bestimmung der Anzahl der Moleküle in der Einheitszelle und der damit verbundene Wassergehalt des Proteinkristalls. Diese Parameter sind für die Durchführung des *molecular replacement* ebenfalls von großer Bedeutung und können durch die Ermittlung des sog. Matthews-Koeffizienten bestimmt werden¹³².

3.4 Proteinkristallisation und Strukturanalyse – Praktische Umsetzung

3.4.1 Verwendung von Sicherheitslicht

Das Zusammengeben von *MmCPDII* mit CPD-DNA, das Auspipettieren der Kristallisationsansätze des *MmCPDII*•CPD-DNA Komplexes als auch die folgende Betrachtung der einzelnen Kristallisationsbedingungen, die Dokumentation der Proteinkristalle und das Einfrieren der Proteinkristalle für die Strukturanalyse erfolgte unter Rotlicht, um eine lichtinduzierte Reparatur des CPD-Schadens zu vermeiden. Dafür wurden Headlights mit entsprechenden LEDs (656 nm, *Roithner Lasertechnik*) modifiziert. Weitere Details zur Verwendung von Sicherheitslicht in der Proteinkristallisation sind in der Literatur zu finden¹³³.

3.4.2 Kokristallisation der *MmCPDII* mit CPD-DNA

Das einzelsträngige Oligonukleotid (14mer) mit einem zentralen, synthetisch über ein Formacetal verküpften Thymindimer⁸⁶ wurde mit dem entsprechenden Gegenstrang hybridisiert, anschließend in einem 1,25-fachen Überschuss zu der *MmCPDII* pipettiert und für >12 h vor dem Auspipettieren der Kristallisationsansätze im Dunkeln inkubiert.

3.4.3 Robotergestütztes Hochdurchsatz-Screening

Wie im theoretischen Teil bereits beschrieben, hängt die Kristallisation von Proteinen von einer Vielzahl unterschiedlicher Faktoren ab. Um ein möglichst großes Spektrum an unterschiedlichen Kristallisationsbedingungen empirisch zu untersuchen, wird in der Praxis ein robotergestütztes Hochdurchsatz-Screening mit kommerziell erhältlichen Screens

durchgeführt, welche entweder in der Proteinkristallisation bereits zum Erfolg geführt haben oder bei denen die Zusammensetzung systematisch variiert.

Erste Untersuchungen zur Bestimmung einer geeigneten Proteinkristallisationsbedingung wurden mit Hilfe des Microsys SQ4000 (*Cartesian Technologies*) bzw. Honeybee 963 (*Digilab*) Kristallisationsroboters und folgenden, kommerziell erhältlichen Screens der Firma *Qiagen* durchgeführt: Classics, Classics Lite, Cryo, JCSG+, JCSG Core I-IV, PACT, Anions, AmSO₄, MBClass I und MBClass II. Das Screening erfolgte im 96-well Format mit MRC2 Kristallisationsplatten (*Jena Bioscience*) unter Verwendung der *sitting drop* Dampfdiffusionsmethode mit 80 µL Reservoirlösung und 600 nl Kristallisationstropfen, die sich aus 300 nl Proteinlösung und 300 nl Kristallisationsbedingung zusammensetzten. Nach dem Auspipettieren der Kristallisationsplatten wurden diese luftdicht mit VIEWseal-Folien (*Greiner Bio-One*) verschlossen und sowohl bei 4° C als auch bei 18° C gelagert. Die Betrachtung der einzelnen Kristallisationsbedingungen erfolgte mittels Mikroskop (*Leica*). Im Fall der Kokristallisation der *MmCPDII* mit CPD-DNA geschah dies unter Verwendung der Headlights als Lichtquelle.

3.4.4 Optimierung und Reproduktion von Proteinkristallen

Die Optimierung und die Reproduktion von ersten Kristallisationsereignissen erfolgte im 24-well Format mit VDX-Platten (*Hampton Research*) oder EasyXtal-Platten (*Qiagen*) unter Verwendung der *hanging drop* Dampfdiffusionsmethode. Während für die Reproduktion teilweise auch Restvolumina der kommerziellen Kristallisationslösungen verwendet wurden, setzten sich die jeweiligen Kristallisationsoptimierungen aus selbst angefertigten Lösungen zusammen. Das Reservoirvolumen betrug in der Regel 800 µL und der Kristallisationstropfen setzte sich aus 1 µL Proteinlösung und 1 µL Kristallisationsbedingung zusammen. Die Inkubation und Dokumentation der Kristallisationsansätze erfolgte analog zu dem Hochdurchsatz-Screening.

3.4.5 Soaking von apo*MmCPDII*-Kristallen mit 8-HDF¹³⁴

Da durch die *in vitro* Rekonstitution der Anhaltspunkt gegeben war, dass die *MmCPDII* 8-HDF als Antennenchromophor bindet, wurden zur Identifizierung und für erste strukturelle Untersuchungen der Bindungstasche vorhandene apo*MmCPDII*-Kristalle für 30 min im Kristallisationstropfen, welcher zusätzlich mit 100 µM chemisch synthetisiertem 8-HDF versetzt wurde, inkubiert. Anschließend wurden die gesoakten Kristalle mit einem

Kryopuffer, der aus der Mutterlösung mit 30% (v/v) Glycerin bestand, direkt in $N_2(l)$ schockgefroren.

3.4.6 Datensammlung

Zur Datensammlung wurden die Proteinkristalle mit Cryoloops (*Hampton Research*) bzw. MicroMount Loops (*Jena Bioscience*) in Größen von 50 μm bis 300 μm unter Verwendung eines Mikroskops und teilweise Sicherheitslicht aus der Kristallisationsbedingung entnommen, die Mutterlauge durch einen Kryopuffer mit Glycerin ausgetauscht und anschließend in $N_2(l)$ schockgefroren. Der Kryopuffer setzte sich aus der Mutterlauge mit Glycerin als Kryoprotektant zusammen, das die Bildung von Eiskristallen während des Einfrierens verhindert. Die Datensammlung fand unter kryogenen Bedingungen (100 K) an den *beamlines* der *European Synchrotron Radiation Facility* (ESRF) statt. Der Transport der eingefrorenen Proteinkristalle erfolgte in einem sog. Trockendewar (*Taylor-Wharton*). Nach automatischer Montierung eines Kristalls auf den Goniometerkopf und der manuellen Zentrierung in der Synchrotronstrahlung, wurden in der Regel zwei Testbilder im Winkelabstand von 90° aufgenommen. Falls Reflexe zu sehen waren, konnten mit den Programmen *imosflm*^{135,136} oder *EDNA*¹³⁷ die Raumgruppe und die Zellparameter bestimmt werden. Gleichzeitig wurde mit diesen Informationen eine Strategie zur Datensammlung berechnet, um einen vollständigen, möglichst hochauflösenden Datensatz aufnehmen zu können.

3.4.7 Datenprozessierung

Die Prozessierung der gesammelten Diffraktionsbilder erfolgte mit den Programmen *XDS* und *XSCALE*¹³⁸. Der erste Schritt ist die Integration der vorhandenen Reflexe. *XDS* bestimmt hierbei die Position jedes einzelnen Reflexes (*hkl*) und ermittelt dessen Intensität I_{hkl} . *XDS* optimiert während der Prozessierung ebenfalls verschiedene Parameter wie z. B. die Position des Strahls, den Detektorabstand, die Kristallmosaizität oder die genauen Zelldimensionen. Am Ende dieses ersten Schrittes der Datenprozessierung erhält man eine Übersicht über verschiedene Qualitätsparameter und damit über die Qualität des Datensatzes. Anhand der Vollständigkeit des Datensatzes, dem mittleren, relativen Intensitätsunterschied (R_{merge}) zwischen symmetrieäquivalenten Reflexen sowie über das Verhältnis von Signal zu Rauschen ($I/\sigma(I)$) können außerdem Aussagen über die Richtigkeit der Raumgruppe gemacht werden. Das Zusammenfassen der symmetrieäquivalenten Reflexe und deren Skalierung erfolgte im zweiten Schritt mit *XSCALE* bzw. *SCALA*¹³⁹ aus dem *CCP4*-Programmpaket¹³¹. In diesem

Schritt wurde ebenfalls die maximale Auflösung des Datensatzes festgelegt. Dies geschah anhand der folgenden Informationen, die von den Programmen ausgegeben werden: In der höchsten Auflösungsschale sollte das Verhältnis von Signal zu Rauschen ($I/\sigma(I)$) einen Wert von 2 nicht unterschreiten und die Intensitätsdivergenz der symmetrieäquivalenten Reflexe (R_{merge}) unter einen Wert von 70% liegen. Gleichzeitig sollte der Wilson-Plot, der von *CTRUNCATE*¹⁴⁰ berechnet wird und ein Grad für die Ordnung im Proteinkristall darstellt, eine Linearität ab 3 Å hin zur höheren Auflösung zeigen. *CTRUNCATE* kann außerdem etwaiges *twinning* und ein anisotropes Beugungsverhalten des Proteinkristalls analysieren.

3.4.8 Lösen des Phasenproblems mittels PHASER

Die Phaseninformationen für die Photolyasestrukturen dieser Arbeit wurden allesamt mittels *molecular replacement* unter Verwendung des Programms *PHASER*¹³⁰ aus dem *CCP4*-Programmpaket¹³¹ erhalten. Als Phasierungsmodell für die apoMmCPDII-Struktur wurde ein vorläufiges Strukturmodell der *Methanosarcina barkeri* Klasse II CPD Photolyase verwendet. Für alle weiteren Strukturlösungen konnte dann diese benutzt werden. Nach Berechnung des Matthews-Koeffizienten¹³² mit dem Programm *MATTHEWS*¹⁴¹, welches ebenfalls im *CCP4*-Programmpaket enthalten ist, und der damit verbundenen Kenntnis über die Anzahl der Moleküle in der Einheitszelle und den entsprechenden Wassergehalt, wurde *PHASER* mit den Standardeinstellungen, aber unter Berücksichtigung aller möglichen alternativen Raumgruppen und einer Auflösung bis 2,5 Å, ausgeführt. Neben der Tatsache, dass im Idealfall nur eine einzige Lösung gefunden wird, müssen zur Validierung im Falle mehrerer Lösungen folgende drei Werte genauer betrachtet werden: *z-score* der Translationsfunktion (TFZ), *Log Likelihood Gain (LLG)* und die Anzahl der *clashes*. Der TFZ gibt an wie hoch die Wahrscheinlichkeit ist, dass die berechnete Lösung korrekt ist (**Tab. 6**).

TFZ	Struktur gelöst?
weniger als 5	nein
5 bis 6	unwahrscheinlich
6 bis 7	möglicherweise
7 bis 8	wahrscheinlich
mehr als 8	definitiv

Tab. 6 Übersicht über die Wahrscheinlichkeit einer Strukturlösung bei entsprechendem *z-score* der Translationsfunktion (TFZ)¹⁴².

Der *LLG* muss in jedem Fall einen positiven Wert haben, da sonst das Modell der Lösung schlechter ist als eine Zusammenstellung zusammengewürfelter Atome. Wenn mehrere Moleküle in der Einheitszelle vorhanden sind, muss der *LLG* außerdem mit jedem Molekül, das zur Lösung beiträgt, größer werden. Etwas schwieriger verhält es sich mit der Anzahl der *clashes*, die Überlappungen von Atompositionen in der Kristallpackung darstellen. Da die Anzahl der *clashes* auch von dem jeweiligen Phasierungsmodell abhängig sein kann, empfiehlt es sich unter gegebenen Umständen die maximale Anzahl zu erhöhen oder idealerweise bei bereits signifikanten TFZ-Werten Loopbereiche des Modells zu entfernen.

3.4.9 Strukturbau und –verfeinerung

Nach dem Erhalt der Phaseninformationen konnte bei geeigneter Auflösung ($<2 \text{ \AA}$) ein erstes Strukturmodell automatisiert mit Hilfe des Programms *ARP/wARP* konstruiert werden¹⁴³. Der Einbau von fehlenden Aminosäuren bzw. Molekülen und die Verfeinerung der Strukturen erfolgten manuell mit den Programmen *COOT*¹⁴⁴ bzw. *REFMAC5*¹⁴⁵. Das Programm *REFMAC5* basiert auf der *maximum likelihood*-Methode, bei der sowohl die Position jedes Atoms der Struktur als auch dessen Temperaturfaktor (B-Faktor), der in gewisser Weise die Ortsunschärfe darstellt, verfeinert wird. Die Validierung des Modells erfolgt neben geometrischen Parametern (z. B. Bindungswinkel und –längen) über die sogenannten *R*-Faktoren, die ein Indiz dafür sind, wie gut die anhand des Modells berechneten Strukturfaktoramplituden $|F_{calc}|$ zu den experimentellen Strukturfaktoramplituden $|F_{obs}|$ (**Gleichung 9**).

$$R = \frac{\sum ||F_{obs}| - |F_{calc}||}{\sum |F_{obs}|}$$

Gleichung 9

Die *R*-Faktoren unterscheiden sich dabei in R_{work} und R_{free} . Während R_{work} mit den für die in der Verfeinerung verwendeten Reflexe berechnet wird, erfolgt die Berechnung von R_{free} über die ausgewählten Testreflexe (~1000 Reflexe oder 5% der Gesamtreflexe), welche nicht für die Verfeinerung verwendet wurden¹⁴⁶. Die Auswahl der Testreflexe und das Einfügen des sog. *freeR-flags* erfolgten bei einem Molekül pro Einheitszelle zufällig mit dem Programm *FREERFLAG*^{146,147} aus dem *CCP4*-Programmpaket oder in Auflösungsschalen gegliedert mit dem Programm *DATAMAN*¹⁴⁸. Die Koordinaten und Strukturfaktoren wurden am Ende in der *RCSB PDB* (www.pdb.org) mit dem erhaltenen Kürzel hinterlegt¹⁴⁹.

3.4.10 Darstellung der Strukturen

Sämtliche Strukturabbildungen in dieser Arbeit wurden mit dem Programm *PyMOL*¹⁵⁰ erstellt. Zur Darstellung von Sekundärstrukturelementen wurde *STRIDE*¹⁵¹ und für die Berechnung bzw. Visualisierung der elektrostatischen Oberflächen wurde *APBS*¹⁵² verwendet. Die Analyse der Interaktionsflächen erfolgte mit folgendem Server: *Protein Interfaces, Surfaces and Assemblies (PISA)* vom *European Bioinformatics Institute (EBI)*¹⁵³.

3.5 Phylogenetische Analyse

Zur Bestimmung der paarweisen Sequenzidentitäten als auch zur phylogenetischen Einordnung der Klasse II CPD Photolyasen innerhalb der Phr/Cry-Familie und zur genaueren Analyse der *MmCPDII* wurde ein multiples Sequenzalignment mittels *ClustalW2*¹⁵⁴ mit Sequenzen aus der UniProtKB-Datenbank¹⁵⁵ durchgeführt. Anhand dieser Daten wurde ein phylogenetischer Baum (PHYLP) mit folgenden Parametern konstruiert:

- Kimura-Korrektur der Entfernungen
- kein Ignorieren von Lücken in dem Alignment
- *neighbor joining* Methode¹⁵⁶

Die Visualisierung des ungewurzelten phylogenetischen Baums erfolgte durch die Verwendung der *MEGA4*-Software¹⁵⁷.

Für die phylogenetische Auswertung des Klasse II Subtyps wurden 98 nicht redundante Sequenzen des Klasse II-spezifischen InterPro Profils 008148⁵⁹ in einem multiplen Sequenzalignment mit *KALIGN*¹⁵⁸ analysiert. Nach der manuellen Korrektur und Entfernung von Lücken wurden die Daten dieses Alignment ebenfalls zur Konstruktion eines phylogenetischen Baums mit den oben genannten Parametern in *ClustalW2* genutzt.

4 Ergebnisse

4.1 Phylogenetische Einordnung der *Mm*CPDII

Die phylogenetische Analyse von mehreren Vertretern der Phr/Cry-Familie ergab, dass die Klasse II CPD Photolyasen eine eigene, distinkte Gruppe bilden (**Abb. 31**), die sich in ihren Sequenzidentitäten zum Teil sehr deutlich von den bisher charakterisierten Klasse I CPD Photolyasen mit Sequenzidentitäten unter 16% unterscheiden (**Abb. 33**).

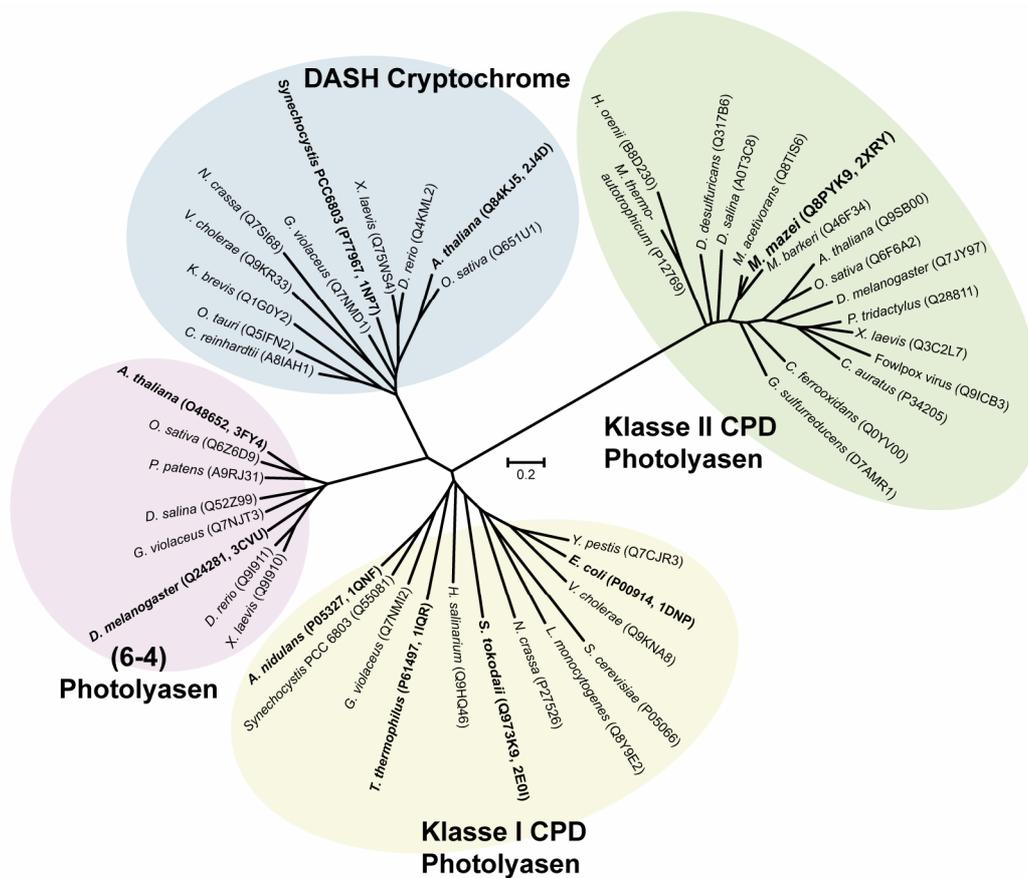


Abb. 31 Ungewurzelter phylogenetischer Stammbaum der Phr/Cry-Familie. Die Klasse II CPD Photolyasen bilden eine distinkte Gruppe innerhalb dieser Familie. In Klammern sind die entsprechenden UniProtKB-Einträge und gegebenenfalls der vorhandene PDB-Eintrag angegeben.

Die Analyse des Klasse II-spezifischen InterPro Profils 008148⁵⁹ ergab weiterhin, dass sich in dieser Gruppe neben den 117 eukaryotischen Vertretern z. B. aus *A. thaliana*, *O. sativa*, *D. melanogaster* oder *P. tridactylus*, ebenfalls 91 eubakterielle und sechs archaeale Vertreter dieses Subtyps befinden. Das Dendrogramm einer phylogenetischen Einordnung von 98 nicht redundanten Klasse II CPD Photolyasen zeigt außerdem, dass die Enzyme aus der archaealen Gattung *Methanosarcina* zusammen mit den eukaryotischen Proteinen auf einem tiefer liegenden Knoten clustern (**Abb. 32**).

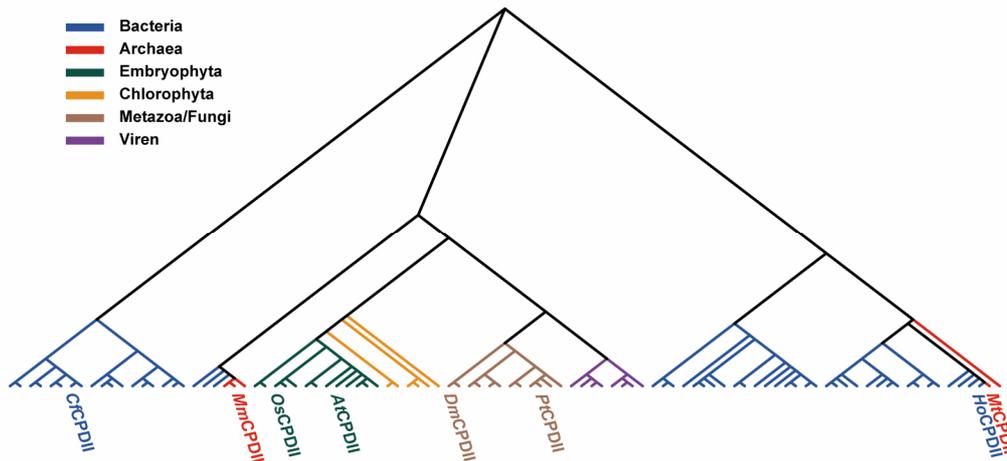


Abb. 32 Dendrogramm der phylogenetische Einordnung von 98 nicht redundanten Klasse II CPD Photolyasen.

Die Photolyase *MmCPDII* aus dem methanogenen Archaeon *Methanosarcina mazei* stellt mit paarweisen Sequenzidentitäten von 45% bis 48% zu den Photolyasen der oben genannten Organismen somit ein ideales Modell für die eukaryotischen Enzyme als auch für den gesamten Klasse II Subtyp dar (**Abb. 33**).

	<i>MmCPDII</i>	<i>MtCPDII</i>	<i>AtCPDII</i>	<i>OsCPDII</i>	<i>DmCPDII</i>	<i>PtCPDII</i>	<i>CjCPDII</i>	<i>HoCPDII</i>	<i>EcCPDI</i>	<i>AnCPDI</i>	
		39	48	46	45	45	53	39	16	14	<i>MmCPDII</i>
			36	39	38	38	41	54	11	10	<i>MtCPDII</i>
				63	45	45	48	34	10	12	<i>AtCPDII</i>
					44	44	47	36	11	16	<i>OsCPDII</i>
						53	51	36	11	12	<i>DmCPDII</i>
							48	35	11	11	<i>PtCPDII</i>
								41	13	17	<i>CjCPDII</i>
									13	10	<i>HoCPDII</i>
										36	<i>EcCPDI</i>
											<i>AnCPDI</i>

Abb. 33 Übersicht der paarweisen Sequenzidentitäten von Vertretern des Klasse I und Klasse II Subtyps. Klasse II CPD Photolyasen: *Methanosarcina mazei* (*MmCPDII*), *Methanobacterium thermoautotrophicum* (*MtCPDII*), *Arabidopsis thaliana* (*AtCPDII*), *Oryza sativa* (*OsCPDII*), *Drosophila melanogaster* (*DmCPDII*), *Potorous tridactylus* (*PtCPDII*), *Chlorobium ferrooxidans* (*CjCPDII*), *Haloferoxhalobium orenii* (*HoCPDII*), Klasse I CPD Photolyasen: *Escherichia coli* (*EcCPDI*), *Anacystis nidulans* (*AnCPDI*).

4.2 Klonierung, heterologe Expression und Aufreinigung der apo*MmCPDII*

Das Gen *Mm0852* aus *Methanosarcina mazei*, das dessen Klasse II CPD Photolyase codiert, wurde im Vorfeld von Petra Gnau aus genomischer DNA amplifiziert. Die Umklonierung in den Expressionsvektor pET-28a und das Auffinden einer geeigneten Expressionsbedingung zur Überproduktion der N-terminal His₆-getaggtten rekombinanten Photolyase in *E. coli* als lösliches Protein erfolgte im Rahmen dieser Arbeit. Die DNA-Sequenzierung des codierenden

Bereichs zeigt eine Transition von Thymin zu Cytosin an Position 1130, was eine Mutation in der Aminosäureprimärsequenz (M377T) zur Folge hat. Im Rahmen der strukturellen Charakterisierung stellte sich jedoch heraus, dass dieser Austausch sich an einer funktionell nicht relevanten Position befindet. Die Überproduktion der apo*Mm*CPDII in *E. coli* BL21-Gold (DE3) Zellen wurde in TB-Medium bei 25° C durchgeführt, der Start der Genexpression durch Autoinduktion eingeleitet und die Proteinausbeute betrug nach der Gelfiltration etwa 50 mg rekombinantes Protein pro Liter *E. coli*-Kultur. Die Elution des Enzyms in diesem letzten Aufreinigungsschritt erfolgte als Monomer mit einem apparenten Molekulargewicht von 66,2 kDa (berechnet 55,1 kDa) und die anschließende Analyse mittels SDS-PAGE stellte eine geschätzte Reinheit von >95% dar (siehe auch **Abb. 45**).

4.3 UV/Vis-Spektrum, Photoreduktion und DNA-Reparatur der apo*Mm*CPDII

Die intensive Gelbfärbung der rekombinanten apo*Mm*CPDII am Ende des Aufreinigungsprotokolls deutet auf die Anwesenheit des katalytischen Kofaktors FAD im oxidierten Zustand (FAD_{ox}) hin. Um den exakten Redox-Zustand des FAD zu bestimmen, aber auch um eine Mischung verschiedener Redox-Spezies oder einen etwaigen Antennenchromophor identifizieren zu können, wurde ein Absorptionsspektrum der Photolyase aufgenommen (**Abb. 34A**). Das Spektrum der *Mm*CPDII besitzt ausschließlich Maxima bei 362 nm (a) und 377 nm (b) als auch bei 421 nm (c), 444 nm (d) und 469 nm (e). Diese Absorptionscharakteristika sind typisch für Photolyase-gebundenes FAD_{ox} und unterscheiden sich deutlich von FAD_{ox} in Lösung mit Maxima bei 373 nm und 445 nm. Des Weiteren deutet das Spektrum nicht auf einen zusätzlichen Antennenchromophor hin, da relevante Maxima im Bereich von 370 bis 420 nm für einen Folat-Cofaktor bzw. von 430 nm bis 440 nm für ein Deazaflavin fehlen, weshalb diese Form als apo*Mm*CPDII zu bezeichnen ist. Die Belichtung der Photolyase in Anwesenheit von 25 mM DTT unter anaeroben Bedingungen mit einer Wellenlänge von 450 nm führte nach 2 min zu einer sichtbaren Anreicherung des neutralen semichinoiden Redoxzustand FADH[•] mit Absorptionsmaxima bei 590 nm (f) und 632 nm (g). Nach 30 min Gesamtbelichtungsdauer ist im Absorptionsspektrum nur noch ein einzelnes Maximum bei 360 nm (h) zu sehen, das für den voll reduzierten Zustand FADH⁻ charakteristisch ist (**Abb. 34B**). Im modifizierten DNA-Reparaturaktivitätstest¹¹⁹ konnte anhand der Zunahme der Absorption bei 265 nm qualitativ nachgewiesen, dass diese Klasse II CPD Photolyase eine UV-A/Blau-licht-abhängige CPD-Reparaturaktivität besitzt (**Abb. 34C**).

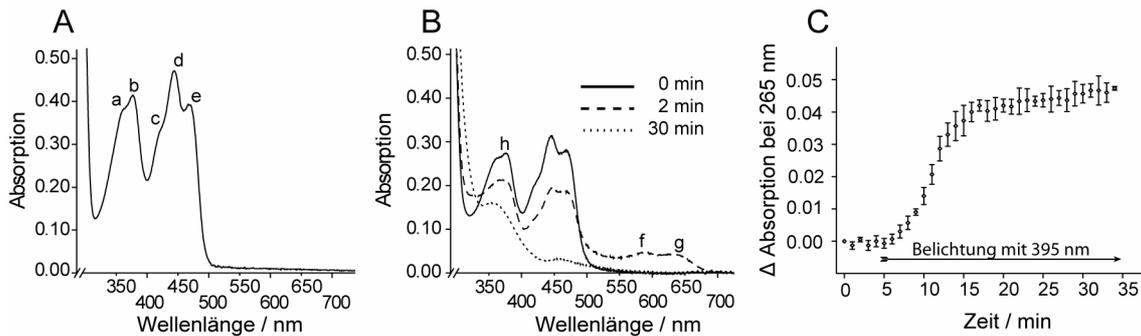


Abb. 34 (A) Absorptionsspektrum der *Methanosarcina mazei* CPD Photolyase mit charakteristischen Maxima für gebundenes FAD_{ox} bei 362 nm (a) und 377 nm (b) bzw. 421 nm (c), 444 nm (d) und 469 nm (e). (B) Anaerobe Photoreduktion der *MmCPDII* in Anwesenheit von 25 mM DTT und der Belichtung bei 450 nm. Der neutrale semichinoide Redoxzustand FADH^{\bullet} mit Absorptionsmaxima bei 590 nm (f) und 632 nm (g) geht mit zunehmender Belichtungsdauer in den voll reduzierten Zustand FADH^{-} mit einem einzelnen Maximum bei 360 nm (h). (C) Qualitativer Nachweis der CPD-Reparaturaktivität mit UV-geschädigtem Oligonukleotid $(\text{dT})_{18}$.

4.4 DNA-Bindungsverhalten der *MmCPDII*

Die DNA-Bindungsstudien mittels *EMSA* (**Abb. 35A**), welche für das CryDASH aus *Arabidopsis thaliana* etabliert worden sind²⁵, zeigten, dass die *MmCPDII* ab einer Konzentration von 200 nM mit dem ungeschädigten 50mer Oligonukleotid einen unspezifischen Protein-DNA Komplex ausbildet. Die spezifische Bindung an CPD-geschädigte, doppelsträngige DNA findet wiederum bereits bei einer Proteinkonzentration von 10 nM statt. Auch hier kommt es mit steigender Konzentration zur Ausbildung eines unspezifischen Photolyase-DNA Komplexes, allerdings bildet sich zuvor eine weitere distinkte Bindungspezies, die in der Abbildung mit einem Stern markiert ist. Die Quantifizierung der Bindungsdaten (**Abb. 35B**) ergab für die unspezifische Bindung an DNA eine Dissoziationskonstante von $K_{D,NS}=455\pm 7$ nM und eine Kooperativität, die einem Verhältnis von vier Photolyasemolekülen pro Oligonukleotid entspricht ($n=3,9\pm 0,2$). Dies bedeutet, dass ein Enzym unter Berücksichtigung der Gesamtlänge der DNA ungefähr zwölf Basen und damit eine Länge von etwa 42 Å abdeckt. Die Berechnung der spezifischen Dissoziationskonstante $K_{D,S}$ wurde aufgrund des kompetitiven, unspezifischen Bindungsverhalten im Konzentrationsbereich zwischen 100 nM und 400 nM mit zwei unterschiedlichen Gleichungen durchgeführt. Während die Verwendung der normalen Hill-Gleichung einen Wert von $K_{D,S}=141\pm 15$ nM ($n=1,4\pm 0,2$) ergab, kamen bei Berücksichtigung eines spezifischen 1:1-Bindungsverhaltens und einer weiteren, kooperativen unspezifischen Bindung folgende Werte heraus: $K_{D,S}=44\pm 12$ nM und $K_{D,NS}=305\pm 27$ nM ($n_{D,NS}=3,7\pm 0,9$). Verglichen mit den DNA-Bindungsdaten für *E. coli*⁵, ist im Fall der *MmCPDII* die unspezifische Bindung stärker (*EcCPDI*: $K_{D,NS}\sim 100$ μM), aber die spezifische Bindung an CPD-geschädigte DNA um zwei Größenordnungen schwächer

(*Ec*CPDI: $K_{D,S} \approx 1$ nM). Somit ist der Diskriminierungsgrad der Klasse II CPD Photolyase zwischen beiden DNA-Spezies mit einem Wert von $K_{D,NS}/K_{D,S} \approx 10$ deutlich geringer (*Ec*CPDI: $K_{D,NS}/K_{D,S} \approx 10^4$).

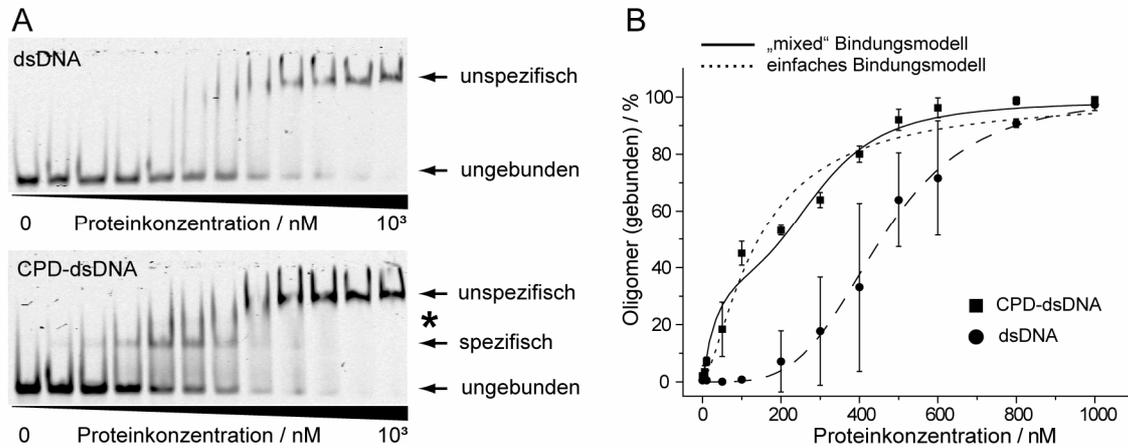


Abb. 35 Bestimmung der DNA-Bindungskonstanten mittels Gelshift-Experimenten. (A) Native EMSA-PAGE der Inkubation von *Mm*CPDII mit IRDye700-gelabelten Oligonukleotiden. Die CPD-dsDNA besitzt aufgrund ihrer Synthese genau einen CPD-Schaden pro DNA-Duplex. Die ausgebildeten Komplexe sind jeweils hervorgehoben. (B) Quantifizierung der Bindungsdaten zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten.

4.5 *In vitro* Rekonstitution der apo*Mm*CPDII

Die *in vitro* Rekonstitution zur Identifizierung des Antennenchromophors mit verschiedenen potentiellen Kofaktoren (FAD, FMN, MTHF, F420 bzw. chemisch synthetisiertes 8-HDF) mittels Mikrodialyse und die anschließende UV/Vis-spektroskopische Analyse zeigte, dass die apo*Mm*CPDII das Deazaflavin 8-HDF als zusätzlichen Chromophor bindet (Abb. 36). Während die Negativkontrolle (apo*Mm*CPDII plus Puffer III, schwarze Linie) das typische Absorptionsspektrum der apo*Mm*CPDII im oxidierten Zustand aufweist, ist das Spektrum der Positivprobe (apo*Mm*CPDII plus 8-HDF, rote Linie) durch das signifikante Absorptionsmaximum bei 435 nm gekennzeichnet. Im Gegensatz zu 8-HDF in Lösung ($\lambda_{\max}=420$ nm, graue Linie) ist das Maximum um 15 nm in den Rotbereich verschoben, was somit auf eine Interaktion des Deazaflavins mit der Photolyase hindeutet. Die Verschiebung des 8-HDF-Absorptionsmaximums in den längerwelligen Bereich ist charakteristisch für eine Bindung und damit einer Interaktion des Chromophors mit der Photolyase. Diese Beobachtung steht in Übereinstimmung mit den Untersuchungen für die nativ aufgereinigte *An*CPDI⁶⁶ als auch für die mit 8-HDF rekonstituierten Enzyme *An*CPDI^{82,159} und *Dm*(6-4)⁶⁸, welche heterolog in *E. coli* exprimiert worden sind. Zur weiteren Validierung und zur Identifizierung der Antennenchromophorbindungstasche wurde sowohl ein *soaking* mit apo*Mm*CPDII-Kristallen und dem chemisch synthetisierten 8-HDF durchgeführt

(Kapitel 4.12.4 bzw. 4.19) als auch ein System zur *in vivo* Rekonstitution in *E. coli* entwickelt (Kapitel 4.8-4.10).

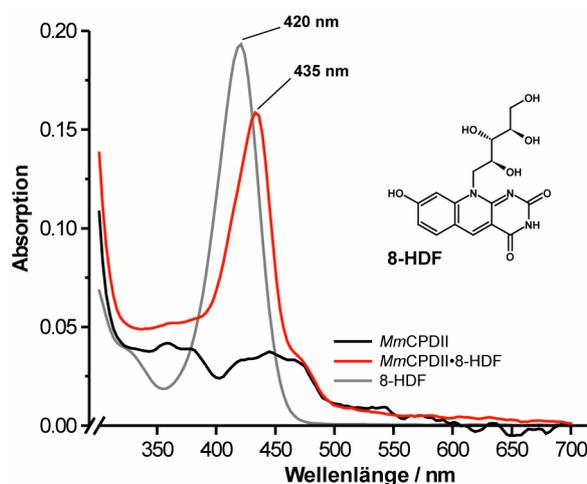


Abb. 36 UV/Vis-spektroskopische Auswertung der *in vitro* Rekonstitution mittels Mikro dialyse der apoMmCPDII mit chemisch synthetisierten 8-HDF.

4.6 Ergebnisse der transienten EPR-Spektroskopie

Die transiente EPR-Spektroskopie zur Untersuchung der Radikalpaarbildung zwischen dem katalytischen Kofaktor FAD und den Tryptophanen des Elektronenleitwegs in der MmCPDII fand in Kollaboration mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Stefan Weber (Albert-Ludwigs-Universität, Freiburg) statt. Die Ergebnisse waren Bestandteil der Diplomarbeit von Andreas Schöppach und basierten auf Material, das dafür zur Verfügung gestellt wurde¹¹⁷. Für diese Arbeit relevante Teile werden hier kurz zusammengefasst.

4.6.1 Radikalpaargenerierung in der MmCPDII

Der gepulste Laser der Wellenlänge 450 nm generierte in der apoMmCPDII kurzlebige, spinpolarisierte Radikalpaare. Die Auswertung ergab ein Spektrum mit einer Signalbreite von etwa 60 G (6 mT) mit zentralem E/A-Polarisationsmuster. Neben diesen beiden Maxima bei 3442 G und 3452 G gibt es im Bereich zwischen 3420 G-3430 G bzw. zwischen 3465 G-3475 G zu den Hauptmaxima jeweils umgekehrt polarisierte Seitenbanden¹¹⁷ (Abb. 37).

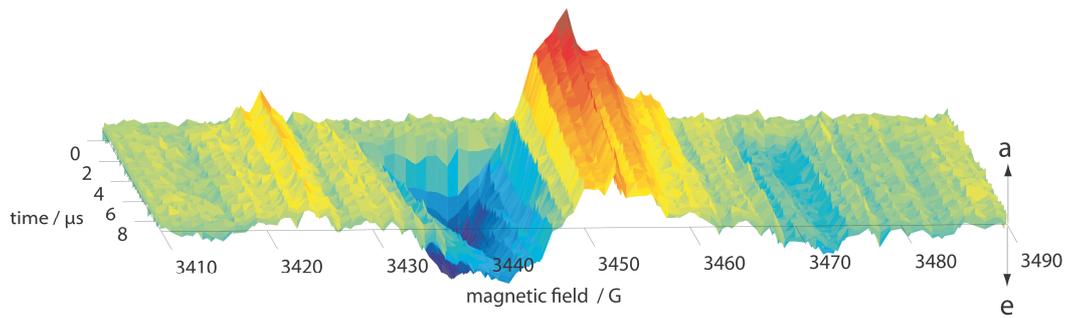


Abb. 37 Spektrum der apoMmCPDII-Radikalpaarbildung im zeitlichen Verlauf ausgehend vom katalytischen Kofaktor FAD im oxidierten Zustand¹¹⁷.

Damit ähnelt das tr-EPR-Spektrum der apoMmCPDII prinzipiell den bisher charakterisierten Proteinen, unterscheidet sich aber aufgrund des A/E/A/E-Polarisationsmuster z. B. von dem E/E/A/A-Polarisationsmuster des CryDASH aus *Xenopus laevis*^{117,160,161} (**Abb. 38**).

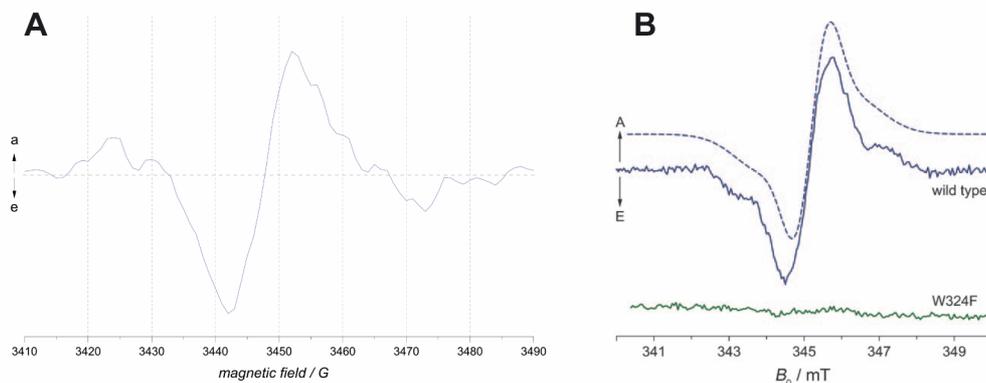


Abb. 38 Vergleich der tr-EPR-Spektren der apoMmCPDII¹¹⁷ (A) und des CryDASH aus *Xenopus laevis*¹⁶⁰ (B). Das Spektrum der apoMmCPDII besitzt ein A/E/A/E-Polarisationsmuster und unterscheidet sich damit von dem A/A/E/E-Polarisationsmuster des X/DASH (blaue, durchgezogene Linie). Die grüne, durchgezogene Linie ist das tr-EPR-Spektrum der X/DASH-Mutante, in der das terminale Tryptophan gegen ein redox-inertes Phenylalanin ausgetauscht wurde (W324F). Die blaue, gestrichelte Linie zeigt das simulierte Spektrum des Wildtyps.

Der ermittelte isotrope g -Wert von $g_{iso}=2,0033 \pm 0,0012$ deutet auf die Ausbildung eines FAD[•]...Trp[•] (W388) Radikalpaars hin und nicht auf ein FAD[•]...Tyr[•] Radikalpaar¹¹⁷. Im Gegensatz zu den Messungen mit der apoMmCPDII ergab die Anregung der Mutante MmCPDII-W360F kein Signal¹¹⁷ (**Abb. 39**).

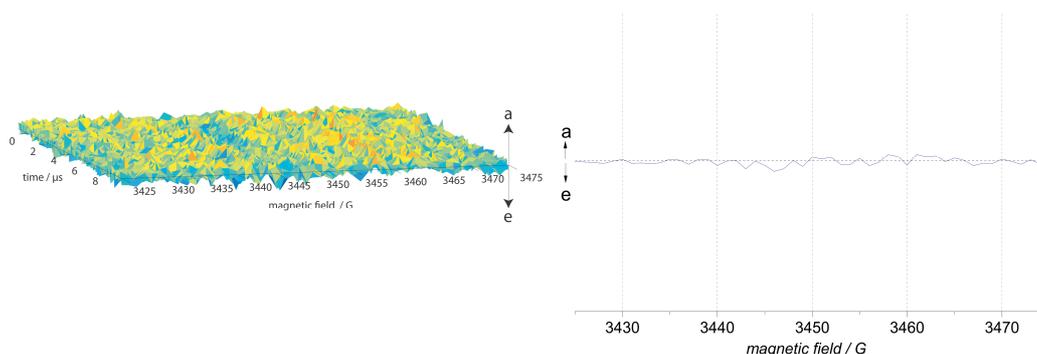


Abb. 39 Die Anregung der Mutante *MmCPDII-W360F* ergab kein Signal in der tr-EPR-Spektroskopie¹¹⁷.

Die Ursache für das nicht vorhandene Signal liegt wahrscheinlich in der relativ kurzen Dauer des auftretenden Radikalpaars $\text{FAD}^{\bullet-} \dots \text{TrpH}^{\bullet+}$ (vermutlich W381), das zu schnell rekombiniert, um den Vorgang mittels tr-EPR zeitlich aufzulösen^{117,162}.

4.6.2 Radikalpaargenerierung des apo*MmCPDII*•CPD-DNA Komplexes

Die Anregung der vollreduzierten Photolyase im Komplex mit der CPD-DNA (GCT<>TCG) geschah bei 20 K und nicht bei 273 K, um eine Reparatur des Thymindimers zu vermeiden.

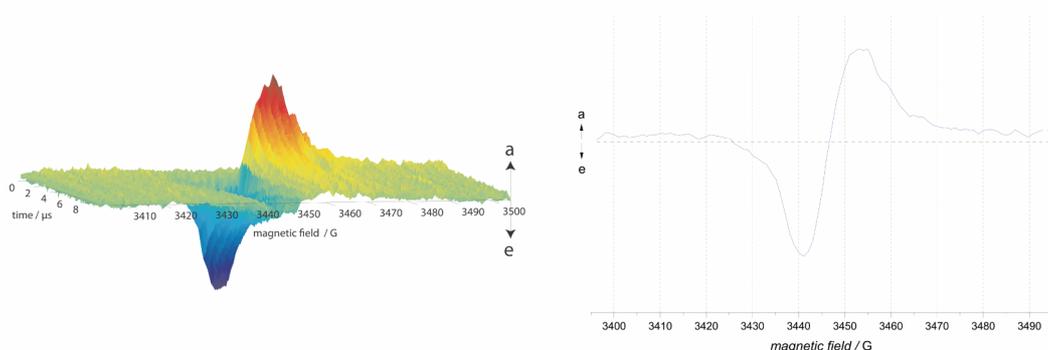


Abb. 40 Das tr-EPR-Spektrum des apo*MmCPDII*•CPD-DNA Komplexes besitzt im Vergleich zur apo*MmCPDII* keine umgekehrt polarisierten Flügel¹¹⁷.

Während die Signalbreite (60 G) und das Zentrum des Signals ($3447 \text{ G} \pm 2 \text{ G}$) vergleichbar mit der apo*MmCPDII* sind, besitzt das Spektrum des Komplexes keine umgekehrt polarisierten Flügel¹¹⁷ (**Abb. 40**). In diesem Zusammenhang ist ebenfalls interessant, dass sich das tr-EPR-Spektrum des apo*MmCPDII*•CPD-DNA Komplexes von dem einer vergleichbaren Messung mit der *TtCPDI* bei 40 K und verwendetem CPD-(dT)₁₈ deutlich unterscheidet¹¹⁷ (**Abb. 41**).

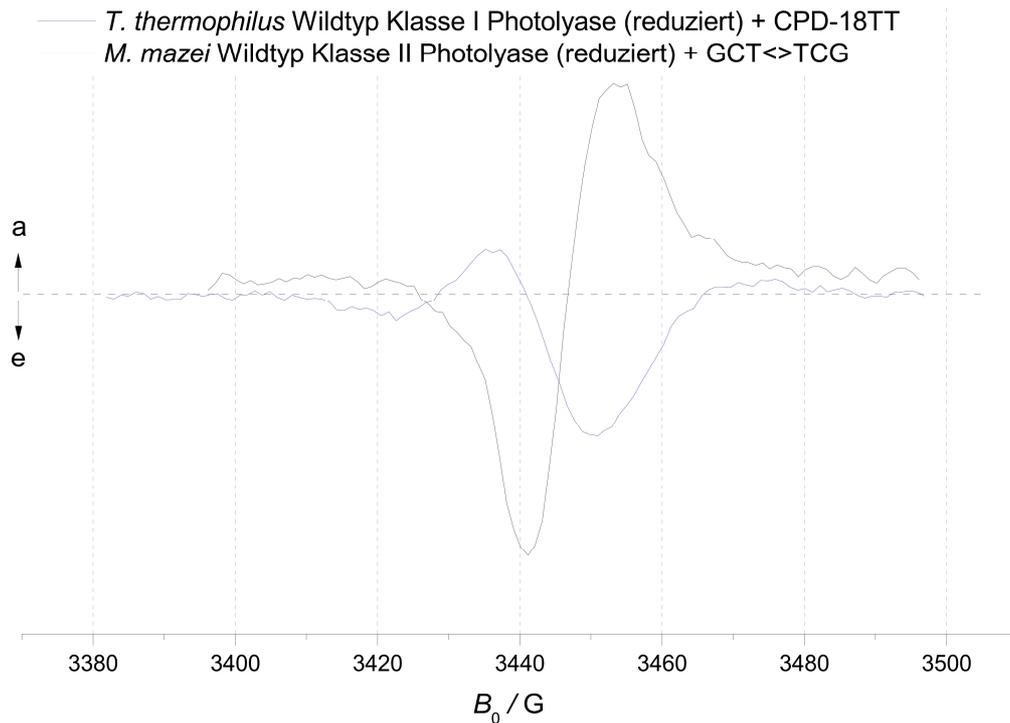


Abb. 41 Vergleich der tr-EPR-Spektren der untersuchten Phr•CPD-DNA Komplexe¹¹⁷.

Neben den unterschiedlichen Polarisationsmustern fällt vor allem die im Fall der *Mm*CPDII nicht vorhandene Asymmetrie der Polarisation auf¹¹⁷. Diese Asymmetrie des Polarisationsmusters der *Tt*CPDI wird als Triplett-Zustand gedeutet.

4.7 Ergebnisse der zeitaufgelösten UV/Vis-Absorptionsspektroskopie

Durch zeitaufgelöste UV/Vis-Absorptionsspektroskopie wurden die Elektronentransfer- und Rekombinationsvorgänge während der Photoreduktion des Kofaktors FAD der *Mm*CPDII untersucht. Leider war es bis zum Zeitpunkt der Fertigstellung der vorliegenden Arbeit nicht möglich, sämtliche Signale im Detail auszuwerten. Daher sind die im Folgenden dargestellten Ergebnisse als vorläufig zu betrachten. Die Absorptionsspektren der verschiedenen FAD-Redoxspezies, des Tyrosyl-Radikals und der beiden Protonierungszustände des Tryptophanyl-Radikals sind in **Abb. 42** skizziert.

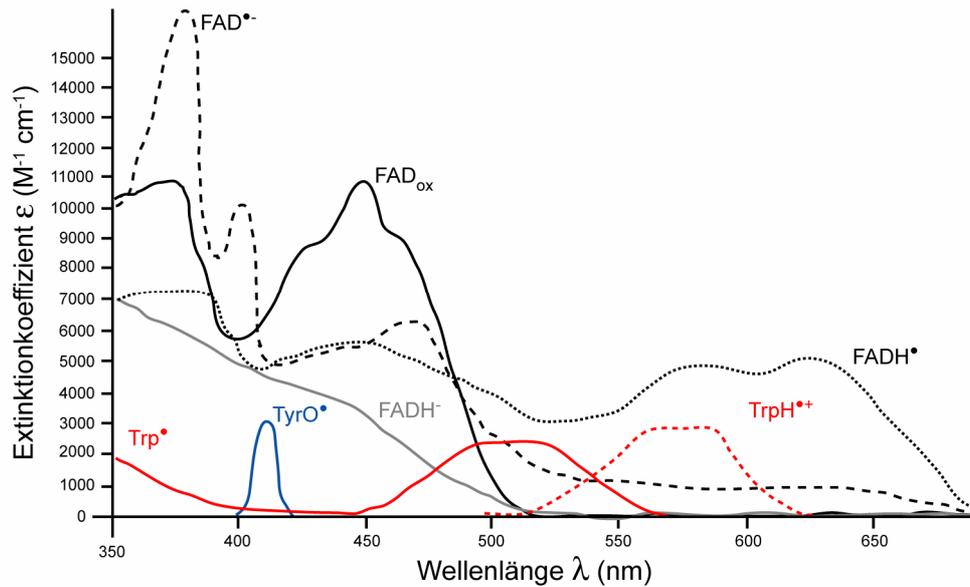


Abb. 42 Skizzierte Absorptionsspektren der verschiedenen FAD-Redoxspezies, des Tyrosyl-Radikals und der beiden Protonierungszustände des Tryptophanyl-Radikals. Die jeweiligen Extinktionskoeffizienten entsprechen in etwa den Literaturwerten: $^{163}\text{FAD}_{\text{ox}}$: $\epsilon_{450 \text{ nm}} \approx 11000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; $^{164}\text{TyrO}^\bullet$: $\epsilon_{410 \text{ nm}} \approx 3000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, $^{165}\text{Trp}^\bullet$: $\epsilon_{510 \text{ nm}} \approx 2300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, $^{165}\text{TrpH}^{\bullet+}$: $\epsilon_{560 \text{ nm}} \approx 3000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Um einen ersten Einblick in den zeitlichen Verlauf der Vorgänge während der Photoreduktion zu bekommen, wurde der Kofaktor FAD in Abwesenheit eines externen Reduktionsmittels mit einem Laserblitz bei 355 nm angeregt und Signale bei verschiedenen Wellenlängen (380 nm, 410 nm, 450 nm, 520 nm, 560 nm und 610 nm) im Zeitbereich von 10 μs bis 40 ms detektiert. Es zeigte sich, dass der dominierende Prozess in diesem Zeitfenster eine Rekombination von $\text{FAD}^{\bullet-}$ und Trp^\bullet mit einer Zeitkonstante von ca. 200 μs ist (**Abb. 43**).

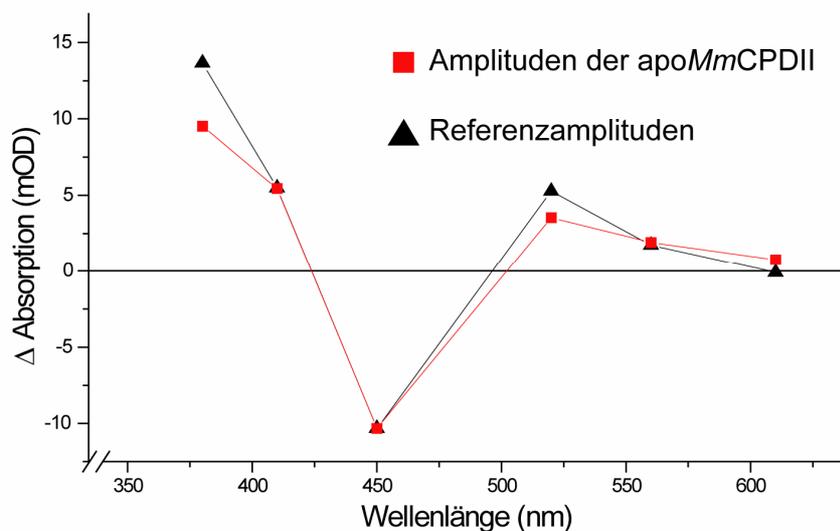


Abb. 43 Absorptionsamplituden der $\sim 200 \mu\text{s}$ Phase der apoMmCPDII zur Bestimmung der Natur dieses Prozesses. Die dargestellten Referenzamplituden ($\epsilon(\text{FAD}^{\bullet-}) - \epsilon(\text{FAD}_{\text{ox}}) + \epsilon(\text{Trp}^\bullet)$), normiert auf die Signalamplitude bei 450 nm) stammen aus einer persönlichen Kommunikation mit Dr. Klaus Brettel und Dr. Pavel Müller.

Die hohe Absorptionsamplitude bei 380 nm spricht für die Anwesenheit des $\text{FAD}^{\bullet-}$ -Radikals in den ersten 200 μs der Photoreduktion. Die höhere Amplitude bei 520 nm im Vergleich zu dem Wert bei 560 nm wiederum deutet auf die Präsenz des neutralen Trp^{\bullet} -Radikals in diesem Zeitraum hin. Die Beteiligung eines Tyrosins im Elektronentransferweg kann anhand der vorliegenden Daten ausgeschlossen werden, da die Absorptionsamplitude für ein TyrO^{\bullet} -Radikal bei 410 nm zu gering ist. Die ähnliche Amplitude zu dem Trp^{\bullet} -Radikal kommt durch den Anteil des $\text{FAD}^{\bullet-}$ -Radikals bei 410 nm zustande. Zur Bestimmung der Geschwindigkeit der Protonierung des $\text{FAD}^{\bullet-}$ -Radikals wurden von der apoMmCPDII bei 520 nm, 450 nm und 380 nm zeitaufgelöste Absorptionsänderungen in Anwesenheit von 25 mM DTT aufgenommen. Die Zugabe des externen Reduktionsmittels DTT erfolgte mit Puffer III_{DTT}, was eine Verdünnung der Proteinkonzentration zur Folge hatte, die allerdings in der Darstellung der Daten herausgerechnet wurde. Das Reduktionsmittel war erforderlich, um das Trp^{\bullet} -Radikal schnell genug zu reduzieren, um dessen Rekombination mit $\text{FAD}^{\bullet-}$ zu einem großen Teil zu verhindern. Dies ist daran ersichtlich, dass ein großer Teil des Zerfalls der Ausbleichung bei 450 nm in Abwesenheit von DTT durch die Zugabe des Reduktionsmittels in eine langlebige Ausbleichung überführt wurde (**Abb. 44A**).

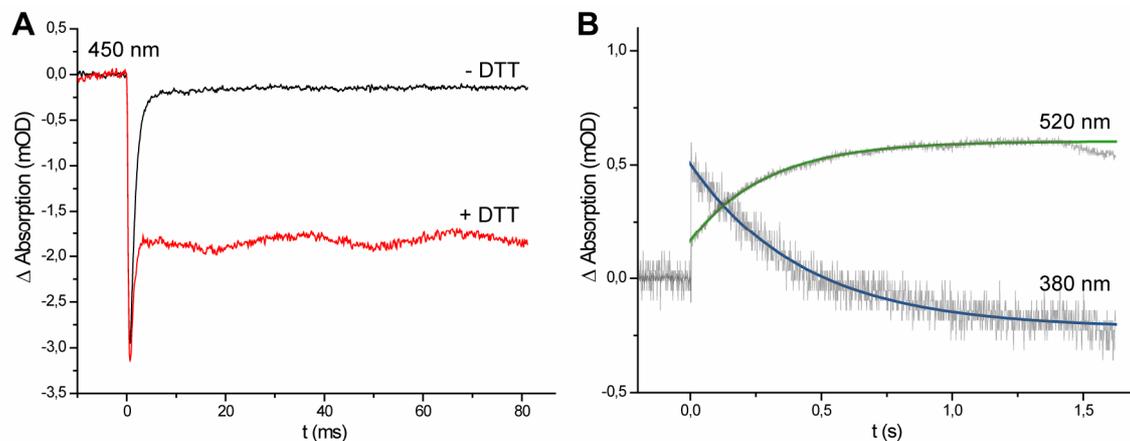


Abb. 44 Protonierung des $\text{FAD}^{\bullet-}$ -Radikals in der apoMmCPDII. (A) Die Unterschiede in der Ausbleichung bei 450 nm für \pm DTT zeigen, dass das externe Reduktionsmittel DTT die Reduktion des Trp^{\bullet} -Radikals bewirkt und so dessen Rekombination mit dem $\text{FAD}^{\bullet-}$ -Radikal verhindert, so dass $\text{FAD}^{\bullet-}/\text{FADH}^{\bullet}$ langlebig wird (>100 ms gegenüber ~ 200 μs in Abwesenheit von DTT). Die Signale wurden dreimal mit einer Mittelung von drei angrenzenden Datenpunkten geglättet. (B) Durch die Absorptionsänderungen bei 380 nm bzw. 520 nm in Anwesenheit von DTT konnte die Geschwindigkeit der Protonierung des $\text{FAD}^{\bullet-}$ -Radikals bestimmt werden.

Die Auswertung der Absorptionsänderungen bei 380 nm bzw. 520 nm mittels exponentialen Fit ergab eine Protonierung des $\text{FAD}^{\bullet-}$ -Radikals mit $\tau_{380\text{ nm}} = 430,5\text{ ms} \pm 8,3\text{ ms}$ ($R^2 = 0,92$) bzw. $\tau_{520\text{ nm}} = 288,5\text{ ms} \pm 2,0\text{ ms}$ ($R^2 = 0,99$), wobei die etwas langsamere Kinetik des Fits bei 380 nm am schlechten Signal-zu-Rauschen Verhältnis liegen kann (**Abb. 44B**). Die Richtung

der Absorptionsänderungen entspricht den Erwartungen für die Protonierung des $\text{FAD}^{\bullet-}$ -Radikals und die Amplitudenverhältnisse sind kompatibel. Als erste Annäherung lässt sich somit sagen, dass die Protonierung des $\text{FAD}^{\bullet-}$ -Radikals während der Photoreduktion in Anwesenheit eines externen Reduktionsmittels mit $\tau \approx 300$ ms erfolgt.

4.8 Klonierung der FO-Synthase und Aufreinigung der Holophotolyasen

Das Einfügen des codierenden Gens der FO-Synthase aus *Streptomyces coelicolor* (ScFbiC) in die *multiple cloning site 1* des pCDF-Duet1-Vektors erfolgte über die Methode der TOPO-Klonierung¹⁶⁶. Nach erfolgreicher Cotransformation des jeweiligen Photolyase-codierenden Expressionsplasmids mit dem Plasmid zur Synthese von 8-HDF erfolgte die Überproduktion der potentiellen $\text{Phr} \bullet 8\text{-HDF}$ Komplexe in *E. coli* BL21-Gold (DE3) Zellen unter den in **Tab. 2** angegebenen Bedingungen. Die Abtrennung der N-terminal His₆-getaggtten FO-Synthase (His₆-ScFbiC) fand nach der NiNTA-Affinitätschromatographie in der abschließend durchgeführten Gelfiltration statt. Exemplarisch für die Aufreinigung der Holophotolyasen ist das Elutionsdiagramm des *Mm*CPDII•8-HDF Komplexes und dessen Analyse mittels SDS-PAGE nachstehend gezeigt (**Abb. 45**).

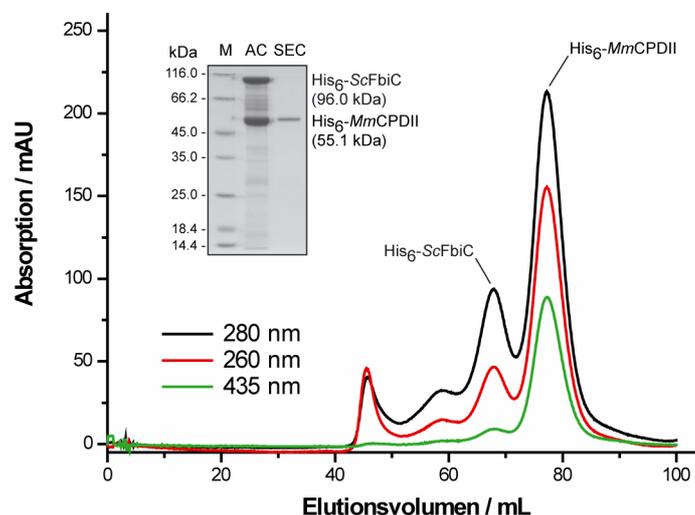


Abb. 45 Elutionsdiagramm der Gelfiltration als finaler Aufreinigungsschritt der Holophotolyasen und der damit verbundenen Abtrennung der FO-Synthase am Beispiel der *Mm*CPDII. Das Gel zeigt den Aufreinigungsfortschritt nach der NiNTA-Affinitätschromatographie (AC) bzw. nach der Gelfiltration (SEC).

4.9 Spektroskopische Charakterisierung der holo*Mm*CPDII

Nach erfolgreicher Abtrennung der FO-Synthase während der Gelfiltration wurde von der potentiellen holo*Mm*CPDII ein UV/Vis-Spektrum aufgenommen, um die Ergebnisse aus der *in vitro* Rekonstitution zu bestätigen. Das Absorptionsspektrum der Photolyase zeigte ebenfalls das ausgeprägte Absorptionsmaximum bei 435 nm wie es bereits in der *in vitro* Rekonstitution zu sehen war (**Abb. 46**, schwarze Linie), wodurch sowohl das System zur *in vivo* Rekonstitution etabliert als auch der Charakter des Deazaflavins als Antennenchromophor der *Mm*CPDII verifiziert wurde.

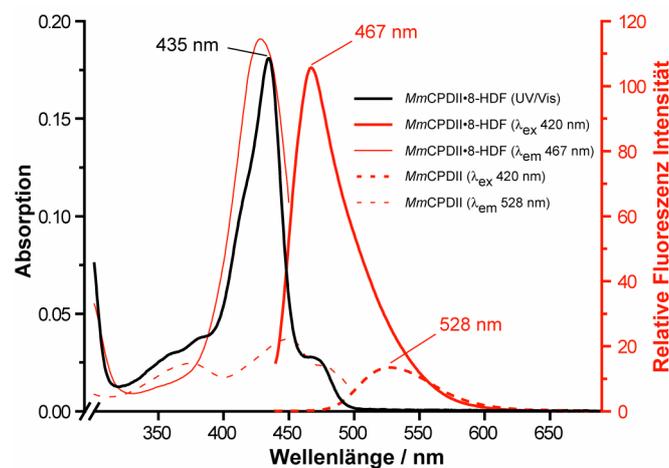


Abb. 46 UV/Vis-Spektrum des *Mm*CPDII•8-HDF Komplexes (schwarze Linie) und Vergleich der Fluoreszenzeigenschaften von apo- und holo*Mm*CPDII (rote gestrichelte bzw. rote durchgezogene Linie)

Das Fluoreszenzemissionsspektrum der holo*Mm*CPDII zeigt bei einer Anregung mit 420 nm ein Maximum bei 467 nm und unterscheidet sich damit deutlich von dem Spektrum der apo*Mm*CPDII, die bei identischer Anregungswellenlänge einen breiten Emissionsbereich um 528 nm besitzt (**Abb. 46**). Das Emissionsmaximum bei 467 nm des Photolyase-gebundenen 8-HDF weicht nur geringfügig von dem des Deazaflavin in Lösung mit 470 nm ab (**Abb. 47**) und steht damit in Übereinstimmung mit den Fluoreszenzdaten der bisher charakterisierten Photolyasen *An*CPDI^{66,159} und *Dm*(6-4)⁶⁸. Die Fluoreszenzemission der apo*Mm*CPDII ähnelt wiederum der Fluoreszenz von freiem FAD mit dem bereits erwähnten Emissionsbereich um 528 nm (**Abb. 47**).

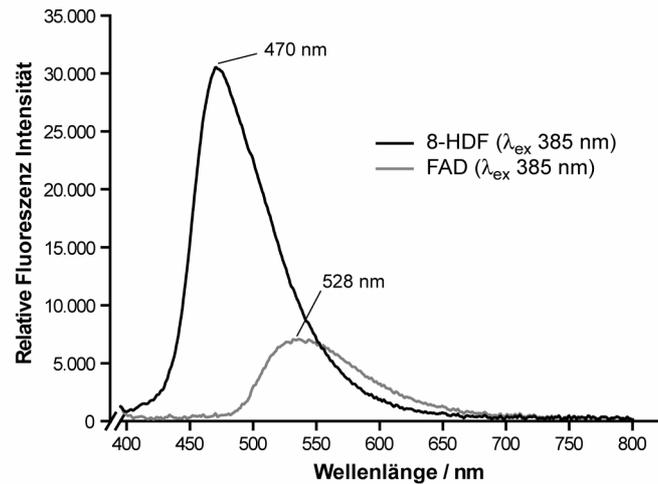


Abb. 47 Fluoreszenzemissionsspektren von freiem 8-HDF und FAD bei einer Anregung mit 385 nm.

4.10 *In vivo* Rekonstitution unterschiedlicher Photolyasen

Die Coexpression der verschiedenen Photolyasen (*An*CPDI, *Dm*(6-4), *Tt*CPDI und *At*CPDII) und deren Aufreinigung als potentielle Holoenzyme konnte mit den für die *Mm*CPDII etablierten Methoden durchgeführt werden und resultierte in *Sc*FbiC-freiem Protein nach der Gelfiltration (Abb. 48B). Die UV/Vis-spektroskopische Analyse der Photolyasen (Abb. 48A) zeigte, dass die Absorptionsspektren der *An*CPDI (grüne Linie) und der *Dm*(6-4) (rote Linie) prominente Maxima im Bereich zwischen 435 nm und 450 nm aufwiesen, was auf eine Bindung des von *E. coli* hergestellten 8-HDF als Antennenchromophor zurückzuführen ist. Während das Absorptionsmaximum des *An*CPDI•8-HDF Komplexes bei 438 nm in Übereinstimmung steht mit der Literatur^{66,82,159}, ist das Maximum des *Dm*(6-4)•8-HDF Komplexes bei 448 nm im Vergleich zu dem *in vitro* rekonstituierten Enzym (λ_{\max} =440 nm) leicht in den Rotbereich verschoben⁶⁸. Im Gegensatz zu den Ergebnissen der *in crystallo* Rekonstitution⁶⁴, zeigt das UV/Vis-Spektrum der *Tt*CPDI (orange Linie) jedoch keine Anzeichen für den Einbau des Deazaflavins als Antennenchromophor. Das Absorptionsspektrum der *At*CPDII (blaue Linie) besitzt ebenfalls kein prominentes Maximum über den gesamten Wellenlängenbereich und entspricht somit Photolyase-gebundenem FAD_{ox} wie es auch bei der apo*Mm*CPDII zu sehen ist. Das Spektrum der *At*CPDII ist somit vergleichbar mit den Daten der bereits zuvor durchgeführten Charakterisierung des in *E. coli* produzierten Enzyms¹⁶⁷. Anhand der SDS-PAGE kann außerdem ausgeschlossen werden, dass der nicht stattgefundene Antenneneinbau im Falle der *Tt*CPDI und der *At*CPDII am fehlenden Deazaflavin lag und somit keine Folge von unlöslichem *Sc*FbiC wäre.

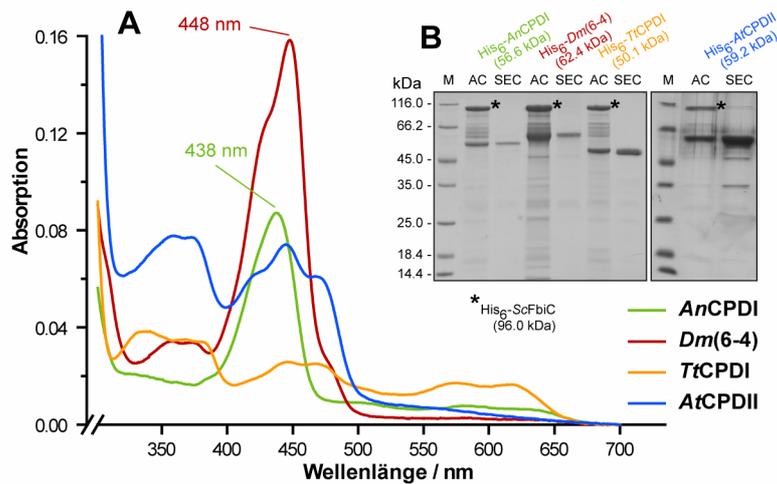


Abb. 48 (A) UV/Vis-spektroskopische Analyse der *in vivo* Rekonstitution der untersuchten Photolyasen. (B) Das Gel zeigt den Aufreinigungsfortschritt der jeweiligen Photolyase nach der NiNTA-Affinitätschromatographie (AC) bzw. nach der Gelfiltration (SEC).

4.11 Proteinkristallisation

4.11.1 Kristallisation der apoMmCPDII

In einem Kristallisationsscreening bei 4° C und einer Proteinkonzentrationen von 7,7 mg/mL bzw. 14,8 mg/mL bildeten sich innerhalb von 24 h die ersten Proteinkristalle in einer Bedingung mit 0,5 M Lithiumsulfat und 7,5% (w/v) PEG 8000. Die anschließende Optimierung im 24-well Format unter Verwendung der *hanging drop* Dampfdiffusionsmethode brachte intensiv gefärbte, gelbe Proteinkristalle nach 3-5 Tagen bei einer Proteinkonzentration von 7,0 mg/mL in einer Bedingung mit 0,5 M Lithiumsulfat und 7,5% (w/v) PEG 6000 (**Abb. 49**). Die Verwendung dieser Kristallisationsbedingung und Proteinkonzentrationen zwischen 6 mg/mL und 12 mg/mL waren für die Reproduktion von apoMmCPDII-Kristallen bei 4° C geeignet. Die Verwendung von 35% (v/v) Glycerin als Kryoprotektant erfüllte die Anforderungen.

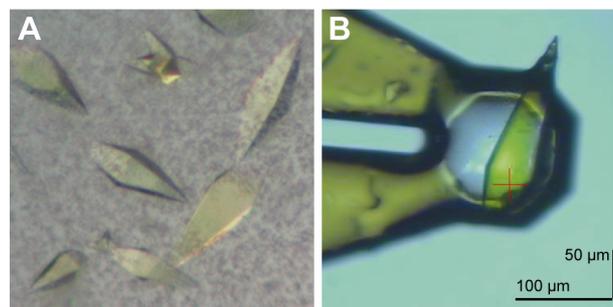


Abb. 49 Proteinkristalle der apoMmCPDII in (A) der Kristallisationsbedingung und (B) montiert in einem MicroMount Loop während der Datensammlung.

4.11.2 Kristallisation des *Mm*CPDII•CPD-DNA Komplexes

Im Rahmen eines ersten Kristallisationsscreenings bei 4° C und einer finalen Proteinkonzentration von 6,2 mg/mL kam es innerhalb von zwei bis drei Tagen in drei ähnlichen Kristallisationsbedingungen zur Bildung von Mikrokristallen (**Tab. 7**).

Bedingung 1	Bedingung 2	Bedingung 3
0,2 M (NH ₄) ₂ SO ₄	0,2 M (NH ₄) ₂ SO ₄	0,1 M LiSO ₄
0,1 M NaAc pH 4,6	0,1 M NaAc pH 4,6	0,1 M NaCl
12,5% (w/v) PEG 4000	10% (w/v) PEG 4000	0,1 M NaAc pH 4,5
		12% (w/v) PEG 4000

Tab. 7 Übersicht über die Kristallisationsbedingungen, welche zur Bildung von Mikrokristallen des *Mm*CPDII•CPD-DNA Komplexes führten.

Die intensive Optimierung der Kristallisationsbedingung im *24-well* Format unter Verwendung der *hanging drop* Dampfdiffusionsmethode zeigte, dass sowohl die Variation der Konzentration an PEG 4000 (4-10%) und die Verwendung von Glycerin (5-20%), aber vor allem die Inkubation bei 18° C zur Bildung von geeigneten Proteinkristallen für die Strukturaufklärung führte (**Abb. 50**).

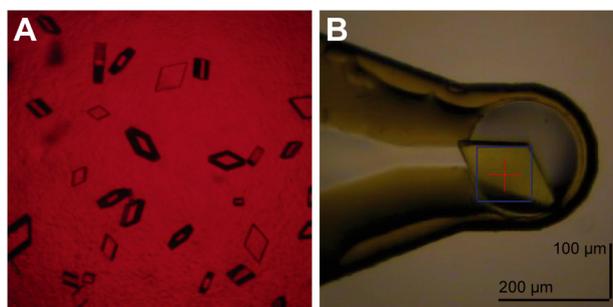


Abb. 50 Proteinkristalle des *Mm*CPDII•CPD-DNA Komplexes in (A) der Kristallisationsbedingung unter Sicherheitslicht und (B) montiert in einem MicroMount Loop während der Datensammlung.

Ein ideales Raster zur Reproduktion von Kristallen des *Mm*CPDII•CPD-DNA Komplexes bei einer finalen Konzentration von ~5 mg/mL und einer Temperatur von 18° C ist in **Tab. 8** dargestellt.

0,2 M AmSO₄
0,1 M NaAc pH 4,6

		Glycerin		
		5%	10%	15%
PEG 4K	4%			
	6%			
	8%			

Tab. 8 Reproduktionsraster für Kristalle des *Mm*CPDII•CPD-DNA Komplexes bei 18° C.

4.11.3 Kristallisation der holo*Mm*CPDII

Ein Kristallisationsscreening mit einer Proteinkonzentration von 6,1 mg/mL bzw. 11,0 mg/mL bei 18° C ergab Proteinkristalle innerhalb von 48 h in einer Bedingung mit 0,1 M Lithiumsulfat, 0,1 M Natriumcitrat pH 5,6 und 12% (w/v) PEG 6000. Unter Verwendung der *hanging drop* Dampfdiffusionsmethode im 24-*well* Format und einer Proteinkonzentration von 11,8 mg/mL brachte diese Kristallisationsbedingung in der Reproduktion Proteinkristalle hervor, welche für die weitere Strukturaufklärung verwendet werden konnten (**Abb. 51**). Zum Einfrieren wurde Glycerin als Kryoprotektant in einer finalen Konzentration von 33% (v/v) zu der Bedingung hinzugefügt.

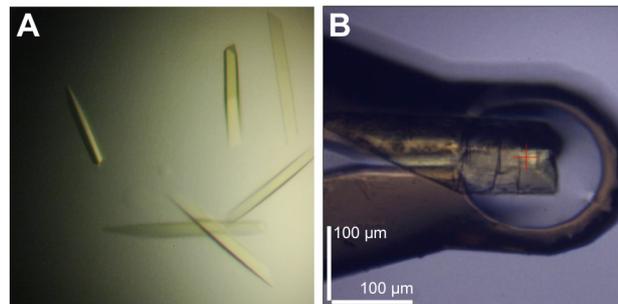


Abb. 51 Proteinkristalle des *Mm*CPDII•8-HDF Komplexes in (A) der Kristallisationsbedingung und (B) montiert in einem MicroMount Loop während der Datensammlung.

4.12 Strukturlösung und Verfeinerung

4.12.1 *Mb*CPDII

Von einem zuvor erzeugten Kristall der Kokristallisation der *Methanosarcina barkeri* Photolyase mit einzelsträngiger CPD-DNA (T5-Oligo) wurde ein Datensatz am ESRF aufgenommen und anschließend prozessiert¹⁶⁸. Der berechnete Matthews-Koeffizient der erhaltenen trigonalen Kristallform ($P3_1$; $a=b=119,4 \text{ \AA}$, $c=100,3 \text{ \AA}$) ergab drei Moleküle pro

asymmetrische Einheitszelle bei einem Solvenzgehalt von 50,1%. Die Lösung des Phasenproblems mittels molekularen Ersatzes wurde in einem ersten Schritt automatisiert mit dem Programm *MRBUMP*¹⁶⁹ durchgeführt. Auf Grundlage dieser Ergebnisse wurden die endgültigen Phaseninformationen letztendlich mit Strukturdaten der *Anacystis nidulans* Klasse I CPD Photolyase (1TEZ) und des Programms *PHASER* erhalten. Dafür wurde mit dem Programm *CHAINSAW*¹⁷⁰ ein Modell erstellt, bei dem anhand des paarweisen Sequenzalignments mit der *MbCPDII* die Seitenketten auf das letzte gemeinsame Atom gekürzt waren. Der erste Ansatz ergab allerdings aufgrund einer zu hohen Anzahl an *clashes* nur eine partielle Lösung mit zwei Molekülen pro Einheitszelle und folgenden *z-scores*: RFZ=3,8 TFZ=5,7 (LLG=42) bzw. RFZ=4,3 TFZ=7,9 (LLG=93). Ein Strukturmodell dieser beiden Moleküle konnte in einem nächsten Ansatz mit *PHASER* unter Verwendung der Orientierung und Position aus der partiellen Lösung erstellt werden. Abschließend wurde das fehlende dritte Molekül manuell mittels *COOT* an die nicht besetzte Position innerhalb der nicht-kristallographischen Symmetrie eingebaut. Die Struktur der *MbCPDII* wurde aktuell bei einer Auflösung von 2,3 Å bis zu R-Faktoren von R=18,3% und R_{free}=22,9% verfeinert.

4.12.2 apo*Mm*CPDII

Die Berechnung des Matthews-Koeffizienten der erhaltenen tetragonalen Kristallform (*P*4₃2₁2; a=b=69,8 Å, c=243,1 Å) deutete auf das Vorhandensein von nur einem Molekül pro asymmetrische Einheitszelle und einem Solvenzgehalt von 54,3% hin. Die Bestimmung der Phasen für das Modell war mittels molekularen Ersatzes unter Verwendung eines vorläufigen Strukturmodells für die zuvor gelöste Klasse II CPD Photolyase aus *M. barkeri* erfolgreich. Das Programm *PHASER* ermittelte mit Daten bis zu 2,5 Å eine einzige Lösung (LLG=2503) mit *z-scores* von 16,9 für die Rotations- und 38,5 für die Translationsfunktion. Nach einem ersten, automatisch mittels *ARP/wARP* erstellten Modell konnte die Struktur der apo*Mm*CPDII bei einer Auflösung von 1,5 Å zu R-Faktoren von R=18,5% und R_{free}=21,0% manuell verfeinert werden und mit dem Kürzel 2XRY als erste Klasse II CPD Struktur in der Datenbank hinterlegt werden.

4.12.3 *Mm*CPDII•CPD-DNA Komplex

Die Anzahl der Moleküle des in einer orthorhombischen Raumgruppe auftretenden Komplexes (*P*2₁2₁2₁; a=71,7 Å, b=116,2 Å, c=168,3 Å) betrug unter Berücksichtigung des DNA-Anteils nach Ermittlung des Matthews-Koeffizienten zwei Komplexe pro asymmetrische Einheitszelle bei einem Solvenzgehalt von 59,8%. Die Strukturlösung erfolgte

durch molekularen Ersatz mit den Strukturdaten der apoMmCPDII (2XRY) und dem Programm PHASER mit Daten bis zu 2,5 Å. Die einzige Lösung (LLG=6023) hatte *z-scores* von 21,2 und 17,4 für die Rotations- bzw. 36,0 und 66,4 für die Translationsfunktion des jeweiligen Komplexes. Die Verfeinerung der Struktur bei einer Auflösung von 2,2 Å führte zu R-Faktoren von R=17,0% und R_{free}=20,8%. Die Koordinaten und Strukturdaten wurden in der Datenbank mit dem Kürzel 2XRZ hinterlegt.

4.12.4 MmCPDII•8-HDF_{soak}

Da es sich hierbei um ein *soaking* handelte und somit die tetragonalen MmCPDII•8-HDF_{soak} Kristalle isomorph zur apoMmCPDII Struktur war, konnte die Elektronendichte $\rho(x,y,z)$ direkt mit den experimentellen Daten berechnet werden. In diesem Fall wurden die ausgewählten Testreflexe aus dem nativen Datensatz übernommen, was allerdings eine sehr geringe Anzahl (216 Reflexe; 1,4%) aufgrund der geringeren Auflösung zur Folge hatte. Die Struktur wurde aktuell bei einer Auflösung von 2,7 Å bis zu R-Faktoren von R=20,6% und R_{free}=27,0% verfeinert.

4.12.5 MmCPDII•8-HDF Komplex

In Kristallen des MmCPDII•8-HDF Komplexes waren nach Ermittlung des Matthews-Koeffizienten zwei Proteinmoleküle pro asymmetrische Einheitszelle und einem Solvenzgehalt von 57,7% vorhanden. Interessanterweise erschienen diese Kristalle in einer neuartigen orthorhombischen Raumgruppe ($P2_12_12_1$; a=79,0 Å, b=114,7 Å, c=141,4 Å) und waren deshalb nicht isomorph zu denen der apoMmCPDII bzw. der 8-HDF *soakings*. Die Struktur wurde mittels molekularen Ersatzes mit dem Programm PHASER, Daten bis zu 2,5 Å und Strukturdaten der apoMmCPDII (2XRY) gelöst. Die einzige Lösung (LLG=9060) hatte *z-scores* von 25,7 und 26,2 für die Rotations- bzw. 45,9 und 79,7 für die Translationsfunktion des jeweiligen Proteinmoleküls. Nach der Konstruktion des ersten Strukturmodell des MmCPDII•8-HDF Komplexes mittels ARP/wARP führte die weitere manuelle Verfeinerung bei einer Auflösung von 1,9 Å aktuell zu R-Faktoren von R=15,5% und R_{free}=18,6%.

4.12.6 Datensammlung, Strukturlösung und Verfeinerung der *Mm*CPDII-Strukturen

Eine tabellarische Zusammenfassung der wichtigsten Daten hinsichtlich Datensammlung, Datenprozessierung und Modellverfeinerung der vorgestellten Strukturen ist in **Tab. 9** dargestellt.

	<i>Mb</i> CPDII	apo <i>Mm</i> CPDII (2XRY)	<i>Mm</i> CPDII•CPD-DNA (2XRZ)	<i>Mm</i> CPDII•8-HDF _{soak}	<i>Mm</i> CPDII•8-HDF
Datensammlung & -prozessierung					
Strahlenquelle	ID14-2	ID29	ID14-1	ID23-2	ID23-1
	<i>European Synchrotron Radiation Facility (ESRF), Grenoble, Frankreich</i>				
Detektor	ADSC Q4	ADSC Q315r	ADSC Q210	MarCCD 225	ADSC Q315r
Wellenlänge (Å)	0,9330	0,88567	0,93400	0,87260	0,97625
Raumgruppe	<i>P</i> ₃ <i>I</i>	<i>P</i> ₄ ₃ <i>2</i> ₁ <i>2</i>	<i>P</i> ₂ <i>1</i> ₂ <i>1</i>	<i>P</i> ₄ ₃ <i>2</i> ₁ <i>2</i>	<i>P</i> ₂ <i>1</i> ₂ <i>1</i>
Zellparameter (<i>a, b, c</i> in Å)	119,41 119,41 100,26	69,77 69,77 243,08	71,70 116,20 168,30	69,89 69,89 245,52	78,97 114,74 141,36
Auflösung (Å)	51,71-2,30 (2,42-2,30)	19,94-1,50 (1,58-1,50)	29,48-2,20 (2,32-2,20)	30,00-2,70 (2,85-2,70)	35,00-1,90 (2,00-1,90)
Reflexe _{Total}	205222	515668	354320	64763	407726
Multiplizität	2,9 (2,9)	5,4 (5,4)	4,9 (4,9)	4,2 (2,9)	4,1 (4,1)
Reflexe _{Einzigartig}	71031	95566	72130	15494	99823
<i>R</i> _{merge} (%)	7,0 (48,9)	8,5 (39,3)	7,9 (68,7)	9,0 (32,0)	4,5 (43,3)
Vollständigkeit (%)	99,9 (100,0)	98,4 (98,8)	99,9 (100,0)	89,3 (84,9)	98,5 (98,7)
<i>I</i> / σ (<i>I</i>)	11,0 (2,3)	11,8 (4,4)	17,5 (2,6)	14,7 (4,5)	23,3 (3,2)
Mosaizität (°)	0,230	0,197	0,099	0,166	0,175
Wilson B-factor (Å ²)	41,5	12,6	35,6	38,3	25,6
Verfeinerung					
Auflösung (Å)	51,3-2,30	15,0-1,50	29,5-2,20	29,2-2,70	34,5-1,90
<i>R</i> _{factor} / <i>R</i> _{free} (%)	18,3/22,9	18,5/21,0	17,0/20,8	20,6/27,0	15,5/18,6
Reflexe (working/test set)	70082/897	94089/1416	70962/1094	15081, 216	97726, 2022
Vollständigkeit (%)	99,9	98,3	99,9	88,1	98,1
rmsd-Werte					
Bindungslängen (Å)	0,012	0,012	0,012	0,010	0,012
Bindungswinkel (°)	1,369	1,378	1,363	1,278	1,308
Anzahl der Atome	10500	4270	8978	3826	8191
mean <i>B</i> value (Å ²)	21,7	11,4	29,7	24,6	22,6

Tab. 9 Zusammenfassung der röntgenographischen Untersuchungen.

4.13 Kristallstruktur der Photolyase aus *Methanosarcina mazei*

Die Gesamtstruktur der *Mm*CPDII ähnelt den bereits strukturell charakterisierten Photolyase-Subtypen^{52,61,62,67,171,172} bzw. Cryptochromen^{21,48,56,173} und spiegelt mit ihrem bilobalen Aufbau die allgemeine Architektur dieser Enzymklasse wieder (**Abb. 52A**). Die N-terminale α/β Domäne (M3-S185) besitzt als Supersekundärstruktur eine sog. Rossmann-Faltung in der Dinukleotide als mögliche Cofaktoren gebunden sein können und ist mit der C-terminalen, α -helikalen Domäne (P232-Y461) über einen Linkerbereich verbunden. Im Vergleich zu den charakterisierten Klasse I CPD Photolyasen ist dieser Linker (V186-E231, 46 aa) deutlich länger (*Ec*CPDI: 25 aa, *Tt*CPDI: 20 aa, *An*CPDI: 36 aa) und aufgrund seiner erhöhten Flexibilität teilweise nicht strukturell aufgelöst. Dies äußert sich in Form von nicht eindeutig definierter Elektronendichte, wodurch das Proteinmodell in diesem Bereich eine Lücke zwischen E189-V197 aufweist. Die C-terminale Domäne, die auch als katalytische bzw. FAD-bindende Domäne bezeichnet wird, enthält den katalytischen Kofaktor FAD in der typischen, U-förmig angeordneten Form. Ein zusätzlicher Cofaktor bzw. Chromophor im Antennenbereich war in der ersten Kristallstruktur der *Mm*CPDII nicht vorhanden, was deren Bezeichnung als apo*Mm*CPDII bekräftigt.

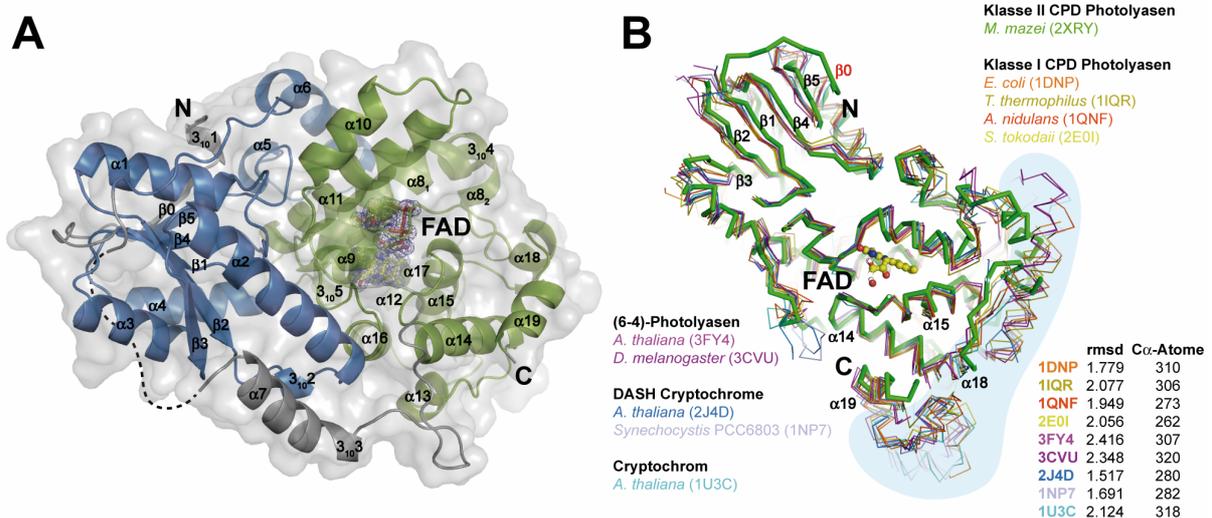


Abb. 52 (A) Gesamtstruktur der Klasse II CPD Photolyase aus *Methanosarcina mazei*. Die N-terminale α/β -Domäne ist in blau, die C-terminale, FAD-bindende Domäne in grün und der Linkerbereich in grau dargestellt. Die gezeigte Elektronendichte ($2F_{obs}-F_{calc}$, SigmaA-gewichtet) ist auf 1σ konturiert. (B) Strukturelle Überlagerung der Mitglieder der Phr/Cry-Familie. Die Klasse II CPD Photolyase zeigt die gemeinsame Architektur, besitzt aber einen zusätzlichen β -Strang (β_0) und keine zusätzliche α -Helix am C-Terminus (hellblau hervorgehoben).

Der Vergleich mit den bisher charakterisierten Enzymen der Phr/Cry-Familie zeigt die hohe strukturelle Ähnlichkeit der Proteinfaltung mit *rmsd*-Werten von $<2,5\text{ \AA}$ bei der Überlagerung

der C α -Atome trotz der zum Teil sehr geringen paarweisen Sequenzidentitäten von z. B. 14% im Falle der *An*CPDI. Neben dem bereits angesprochenen Linkerbereich gibt es dennoch zwei weitere Besonderheiten: Zum einen besitzt die Rossmann-Faltung einen zusätzlichen β -Strang am N-Terminus des Enzyms, zum anderen ist der C-Terminus um ungefähr 50 Aminosäuren im Vergleich zu den übrigen PhrCPDI verkürzt, wodurch keine terminale α -Helix vorhanden ist (**Abb. 52B**).

4.14 Details der FAD-Bindungstasche

Die strukturelle Umgebung des katalytischen Kofaktors FAD in der *Mm*CPDII ähnelt denen der zuvor charakterisierten Vertretern der Phr/Cry-Familie: Die Hälfte (8/16) der Aminosäuren wie z. B. die Salzbrücke zwischen R378 und D409 ist konserviert. Allerdings gibt es eine PhrCPDII-spezifische, topologische Änderung des Asparagins, welches für die Stabilisierung des neutralen semichinoiden FADH $^{\bullet}$ -Zustands und der DNA-Reparatur von Bedeutung ist⁵⁴. Die Überlagerung der Kristallstrukturen der einzelnen Subtypen (*Ec*CPDI, *Dm*(6-4) und *At*DASH) zeigt, dass sich das funktionell analoge N403 in der *Mm*CPDII auf einer anderen Helix (α 16) befindet und an der äquivalenten Position ein Glycin (G415) vorhanden ist (**Abb. 53**).

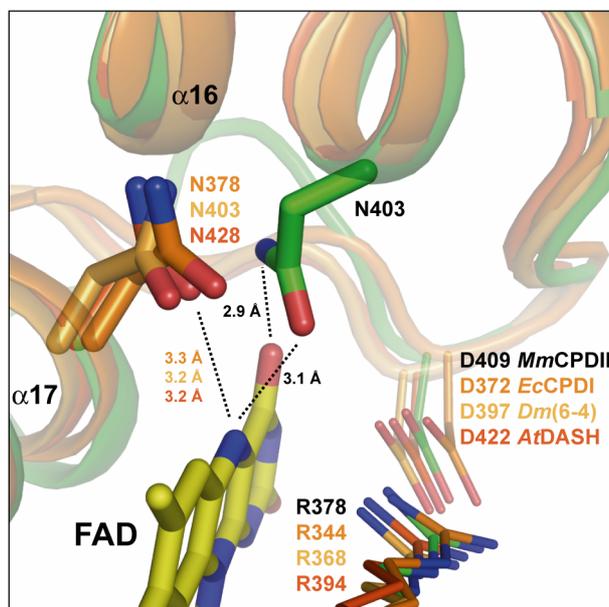


Abb. 53 Details der FAD-Bindungstasche. Im Vergleich zu den übrigen Vertretern der Phr/Cry-Familie (orange) befindet sich das Asparagin (N403), welches für die Stabilisierung des katalytischen Kofaktors FAD während der Photoreduktion bzw. der DNA-Reparatur notwendig ist, auf einem anderen Strukturelement (α 16) in der *Mm*CPDII.

Im Gegensatz zu den Asparaginen der anderen Enzyme kann N403 eine zusätzliche Wasserstoffbrücke zwischen der Amidgruppe der Seitenkette und dem O4-Sauerstoff des FAD ausbilden. Durch diese strukturelle Variation ist die Stabilisierung des protonierten N5-Stickstoffs des katalytischen Kofaktors FAD während der Photoreduktion jedoch nicht betroffen, da der Abstand zu der Carboxygruppe der Seitenkette nur geringfügig (0,1 Å bzw. 0,2 Å) vergrößert ist.

Zur Überprüfung der Funktionalität von N403 wurde diese Aminosäure sowohl gegen ein nicht-funktionelles Alanin (*Mm*CPDII-N403A) als auch ein hydrophobes Leucin (*Mm*CPDII-N403L) ausgetauscht. Das Resultat in beiden *Mm*CPDII-Mutanten war ein kompletter Verlust oder fehlender Einbau des katalytischen Kofaktors FAD, was anhand des Absorptionsverhältnisses 280 nm/450 nm während der Gelfiltrationschromatographie zu beobachten war. Der Austausch des Asparagins durch eine saure Asparaginsäure (*Mm*CPDII-N403D) führte hingegen nur zu einer geringfügigen Abnahme der Besetzung des katalytischen Kofaktors FAD auf etwa 70% im Vergleich zum Wildtyp. Der Verlauf der Photoreduktion von *Mm*CPDII-N403D in Anwesenheit von DTT mit Hilfe von Blaulicht (450 nm) zeigte jedoch ein Verbleib des Kofaktors im neutralen semichinoiden FADH[•]-Zustands und keine weitere Reduktion in den voll reduzierten Zustand FADH⁻ (**Abb. 54**). Interessanterweise sind in dieser Mutante zusätzlich die Absorptionsmaxima der FADH[•]-Spezies von 590 nm/632 nm in Richtung kürzerer Wellenlänge nach 552 nm/588 nm verschoben und es kommt des Weiteren innerhalb von 24 h zu einem Verlust des katalytischen Kofaktors FAD.

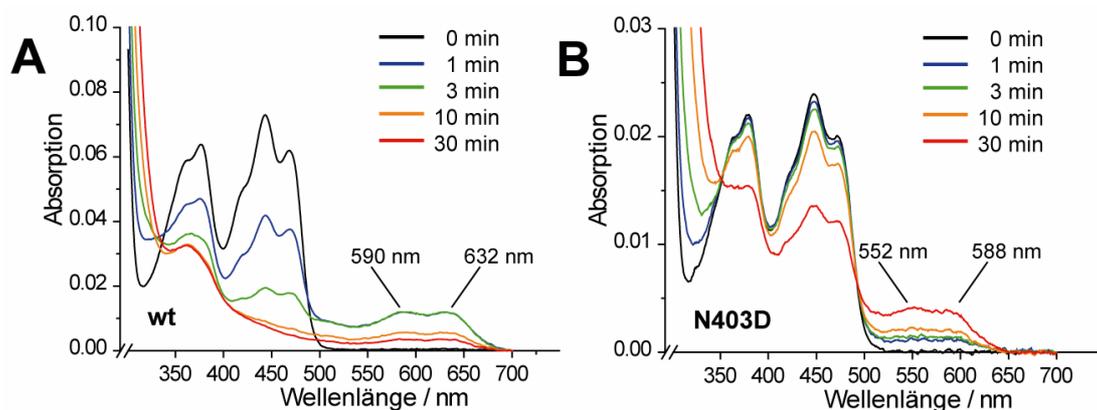


Abb. 54 Photoreduktion von *Mm*CPDII-WT bzw. *Mm*CPDII-N403D. Während der Wildtyp (wt) den typischen Photoreduktionsverlauf zeigt, verharrt *Mm*CPDII-N403D im neutralen semichinoiden FADH[•]-Zustand mit blau-verschobenen Absorptionsmaxima bei 552 nm und 588 nm.

4.15 Der Elektronentransfer in *Mm*CPDII

Die strukturelle Überlagerung der einzelnen Subtypen der Phr/Cry-Familie zeigte ebenfalls die Unterschiede im Elektronentransferweg zum katalytischen Kofaktor FAD während der Photoreduktion. Vergleichbar zu den bisher charakterisierten Vertretern (orange) existiert eine Tryptophan-Triade (z. B. *E. coli* W306→W359→W382) in der *Mm*CPDII (W388→W360→W381), die sich aber auf anderen Sekundärstrukturelementen befindet (**Abb. 55**). Während die Abstände zwischen den einzelnen Tryptophanen in der *Mm*CPDII mit denen der übrigen Vertreter vergleichbar oder kürzer ist, so ist die Entfernung des proximalen Tryptophans W381 zum katalytischen Kofaktor FAD mit 9,6 Å größer (z. B. *E. coli* 8,5 Å).

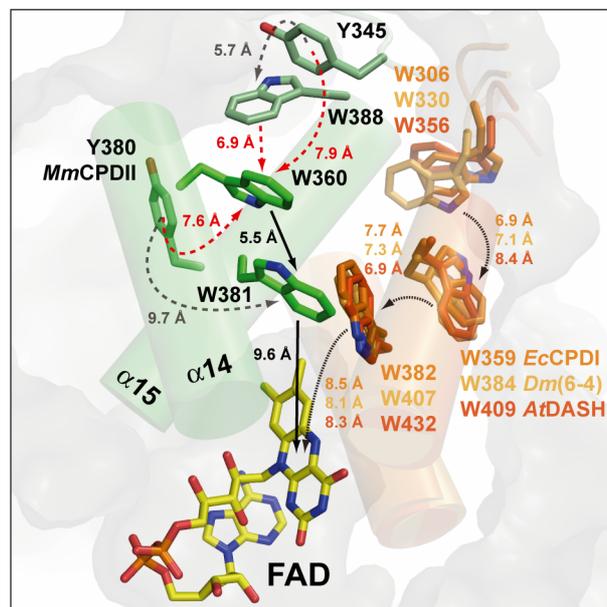


Abb. 55 Vergleich des Elektronentransferwegs in den unterschiedlichen Subtypen der Phr/Cry-Familie.

Zur Überprüfung der funktionellen Relevanz dieser Triade wurden sowohl die beteiligten Tryptophane als auch die umgebenden Tyrosine Y345 und Y380 zu redox-inerten Phenylalaninen ausgetauscht. Alle *Mm*CPDII-Mutanten, außer *Mm*CPDII-W381F mit etwa 30%, zeigten anhand des Absorptionsverhältnisses von 280 nm/450 nm einen zum Wildtyp vergleichbaren Einbau des katalytischen Kofaktors FAD und die UV/Vis-Spektren sämtlicher Varianten entsprachen ebenfalls dem Absorptionsspektrum der *Mm*CPDII-WT mit FAD im voll oxidierten Zustand (**Abb. 56A-D**).

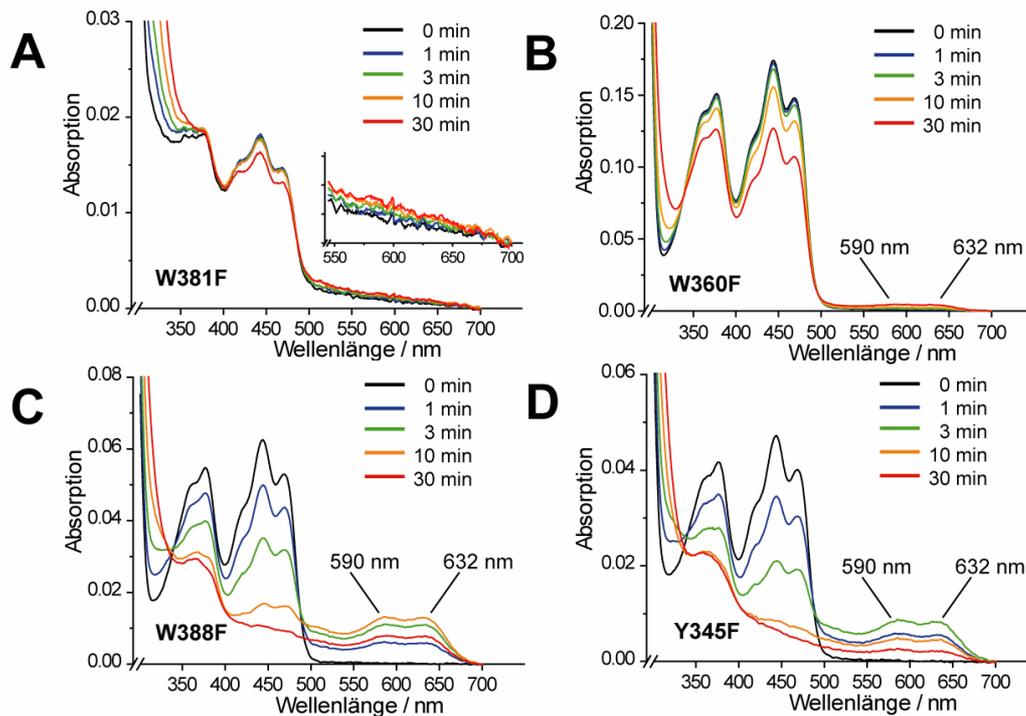


Abb. 56 Photoreduktion der *MmCPDII*-Mutanten mit möglichem Einfluss auf den Elektronentransfer zum katalytischen Kofaktor FAD.

Im Fall der *MmCPDII*-W381F sorgt der Austausch des proximalen Tryptophans in ein Phenylalanin zu einer Blockade des Elektronenstransfers und damit zu einem kompletten Verlust der Photoreduktionsaktivität (**Abb. 56A**). Der Austausch des medialen Tryptophans (*MmCPDII*-W360F) führte bereits zu einer 22-fach verlangsamten Photoreduktion (**Abb. 57▲**) im Vergleich zum Wildtyp (**Abb. 57■**) und zeigt während der gesamten Belichtungsdauer keine nennenswerte Bildung des neutralen semiquinoiden FADH^\bullet -Zustands (**Abb. 56B**). Im Gegensatz zu diesen beiden im Inneren der *MmCPDII* liegenden Tryptophanen, hat das Ausschalten des an der Oberfläche exponierten W388 (*MmCPDII*-W388F) eine nur etwa zweifach reduzierte Photoreduktionsaktivität (**Abb. 57▼**) zur Folge und die Bildung des voll reduzierten Zustands FADH^- ist nicht beeinflusst (**Abb. 56B**). Einen noch geringeren Einfluss hat der Austausch des ebenfalls sich an der Oberfläche befindlichen Tyrosins Y345 (*MmCPDII*-Y345F) auf die Photoreduktion (**Abb. 56D**). Die Restaktivität beträgt für diese Variante 66% (**Abb. 57●**) im Vergleich zu *MmCPDII*-W388F mit 46% und *MmCPDII*-W360F mit 4,6%. Die ebenfalls in diesem Zusammenhang charakterisierte Variante *MmCPDII*-Y380F zeigt mit einer ermittelten Halbwertszeit von $t_{1/2}=74,3 \text{ s} \pm 0,6 \text{ s}$ eine dem Wildtyp vergleichbare Photoreduktionsaktivität.

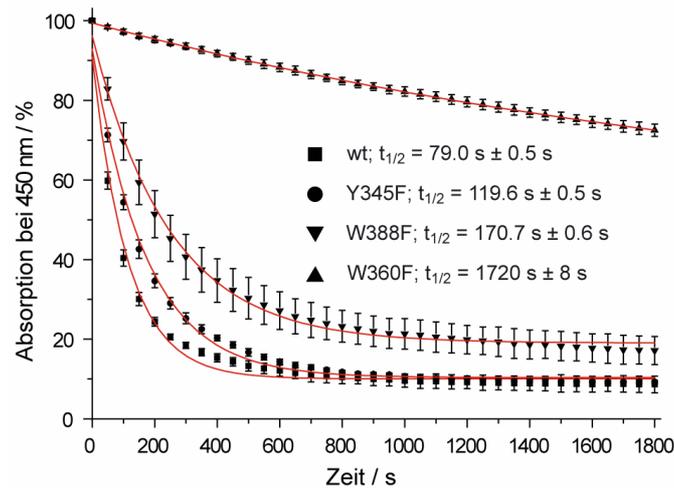


Abb. 57 Absorptionsverlauf bei 450 nm während der Photoreduktion zur Bestimmung der Halbwertszeiten von *MmCPDII*-WT und den Varianten.

4.16 *In crystallo* UV/Vis-Spektroskopie

Zum Nachweis der Photoreduzierbarkeit der *MmCPDII* im kristallinen Zustand und damit zum Nachweis der Funktionalität wurden Proteinkristalle sowohl mit Blaulicht belichtet (**Abb. 58A**) als auch der Synchrotron-Strahlung exponiert (**Abb. 58B**). Das *in crystallo* UV/Vis-Spektrum des *MmCPDII*•CPD-DNA Komplexes entspricht unter kryogenen Bedingungen dem Spektrum der apo*MmCPDII* in Lösung (**Abb. 58A**, schwarze Linie). Die 30-sekündige Belichtung mit 450 nm in Anwesenheit von 10 mM DTT im Kryopuffer bei 100 K induziert jedoch keine Photoreduktion der Photolyase (blaue Linie). Eine Photoreduktion findet dagegen nur bei Raumtemperatur während des *cryo annealings* statt und manifestiert sich in der kumulativen Zunahme des neutralen semichinoiden Redoxzustands FADH^\bullet während der weiteren Belichtung (grüne, gelbe, rote Linie). Die Synchrotron-Strahlung (Flux: $\sim 5,0 \cdot 10^{10}$ Photonen/s) induziert innerhalb der 300-sekündigen Bestrahlung bei 100 K eine DTT-unabhängige Reduktion des katalytischen Kofaktors FAD, was anhand der Abnahme der Absorptionsmaxima zwischen 400 nm und 500 nm deutlich wird (**Abb. 58B**).

Im weiteren Verlauf wird vom CPD-Schaden ausgehend die 5'-Seite der DNA als 5'-Arm und die gegenüberliegende Seite als 3'-Arm bezeichnet. Interessanterweise bilden die Komplexe im Kristall eine quasi-kontinuierliche Anordnung der doppelsträngigen DNA über den jeweiligen 3'-Arm (**Abb. 59B**). In beiden Komplexen ist sowohl der CPD-enthaltende Strang als auch der Gegenstrang deutlich über die Elektronendichte definierbar. Nur am Ende des jeweiligen 5'-Arms sind folgende Nukelotide nicht definiert und somit nicht in der Struktur dargestellt: A1-T2 im Komplex A bzw. A1-C3 im Komplex B des CPD-Strangs und T14 im Komplex B des Gegenstrangs. Die Überlagerung der beiden Komplexstrukturen mit der Struktur der apo*Mm*CPDII zeigt, dass durch die Bindung der CPD-DNA keine großen strukturellen Veränderungen in der Photolyase stattfinden. Dies wird bei Betrachtung der *rmsd*-Werte von 0,43 Å (396 C α -Atome) für Komplex A und 0,41 Å (352 C α -Atome) für Komplex B deutlich und entspricht den Beobachtungen für den *An*CPDI•CPD-DNA Komplex⁸⁶. Durch die Bindung der Photolyase an die geschädigte DNA wird der Knick, der bereits durch den CPD-Schaden selbst verursacht wird, von etwa 27°-30°^{13,14,15} auf ~50° erweitert und entspricht damit in etwa dem des *An*CPDI•CPD-DNA Komplexes (**Abb. 60**).

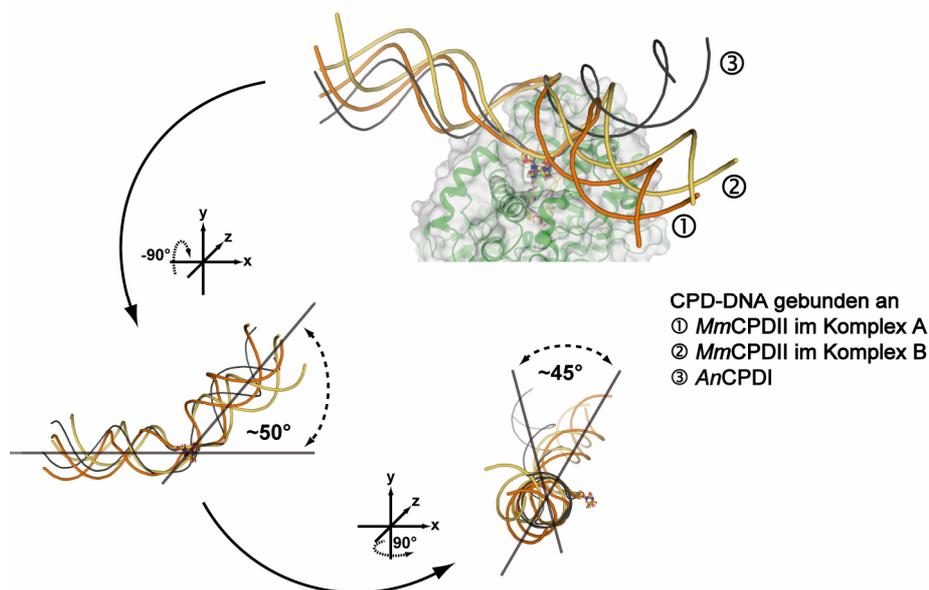


Abb. 60 Überlagerung der CPD-DNA aus den beiden Komplexen der *Mm*CPDII•CPD-DNA Struktur und der *An*CPDI•CPD-DNA Struktur. Als Überlagerungspunkt wurde der CPD-Schaden gewählt und der 5'- bzw. 3'-Arm anschließend mit doppelsträngiger B-DNA verlängert.

Anhand der Überlagerung der CPD-DNA aus Komplex A und Komplex B wird außerdem deutlich, dass sich trotz der sehr hohen strukturellen Ähnlichkeit der Winkel des 3'-Arms in beiden Komplexen um etwa 11° unterscheidet, was an einer gewissen Plastizität der DNA-Erkennung entlang der Proteinoberfläche liegen kann. Im Vergleich zu der DNA im

*An*CPDI•CPD-DNA Komplex ist der 3'-Arm außerdem um weitere 45° verknickt, was durch die Drehung um 90° entlang der y-Achse sichtbar wird. Im Folgenden beziehen sich die Ergebnisse auf Komplex A der *Mm*CPDII•CPD-DNA Struktur. Durch die Bindung der Photolyase an die geschädigte DNA wird der CPD-Schaden in die aktive Tache hineingedreht und die doppelsträngige DNA teilweise entwunden, wodurch wiederum eine Lücke von ~120 Å² geformt wird. Das π -stacking der komplementären Adenine bleibt jedoch dabei intakt und lediglich der Bereich zu den benachbarten Basen ist teilweise beeinflusst. Die mit dem Server *PISA*¹⁵³ ermittelten Interaktionsflächen zwischen *Mm*CPDII und der CPD-DNA betragen für Komplex A 1241 Å² bzw. für Komplex B 1354 Å² und sind somit größer als für die Komplexe der *An*CPDI⁸⁶ mit 1123 Å² bzw. der *Dm*(6-4)¹⁷² mit 1182 Å². Die Berechnung der elektrostatischen Oberflächen mit *APBS*¹⁵² und einer Konzentration von 0,1 M an monovalenten Ionen und einem Solvenzradius von 1,4 Å zeigte eine positiv geladene Oberfläche im Bereich der katalytischen Tasche (**Abb. 61A**), die auf das Vorhandensein von basischen Aminosäuren hindeutet und somit elektrostatische Interaktionen mit dem Desoxyribosephosphatrückgrat eingehen kann (**Abb. 61B**).

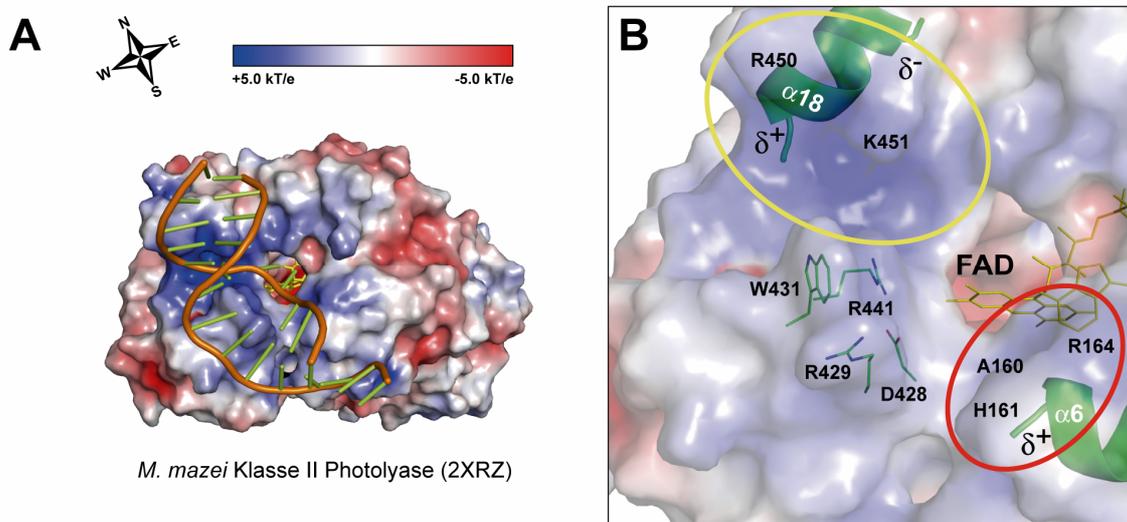


Abb. 61 Elektrostatische Oberflächeneigenschaften der *Mm*CPDII berechnet mit *APBS*¹⁵². (A) An der Gesamtstruktur des *Mm*CPDII•CPD-DNA Komplexes sieht man den positiv geladenen Bereich der Oberfläche, der für die Interaktion mit dem Rückgrat der CPD-DNA zuständig ist. (B) Detailsicht des entsprechenden Bereichs mit vorwiegend basischen Aminosäuren, die für die Interaktionen verantwortlich sind (farbige Kreise).

4.18 Details der Klasse II CPD-Bindungstasche

Der hineingedrehte CPD-Schaden ist in der C-terminalen katalytischen Tasche in einer ähnlichen Weise gebunden wie in den zuvor charakterisierten Komplexen der *A. nidulans* Klasse I Photolyase⁸⁶ bzw. des DASH Cryptochroms aus *A. thaliana*²⁵. Im Gegensatz zu diesen beiden Komplexstrukturen ist jedoch der CPD-Schaden in der *Mm*CPDII•CPD-DNA

Struktur intakt, was anhand der eindeutig definierten Elektronendichte zwischen den Atomen C5-C5 und C6-C6 des Thymindimers zu sehen ist (**Abb. 62**). Aus diesem Grund unterscheidet sich der Winkel um den die beiden Thyminbasen zueinander verkippt sind mit 34° deutlich von den Winkeln ($\sim 13^\circ$) der beiden reparierten Dimere in *AnCPDI*⁸⁶ bzw. *AtDASH*²⁵.

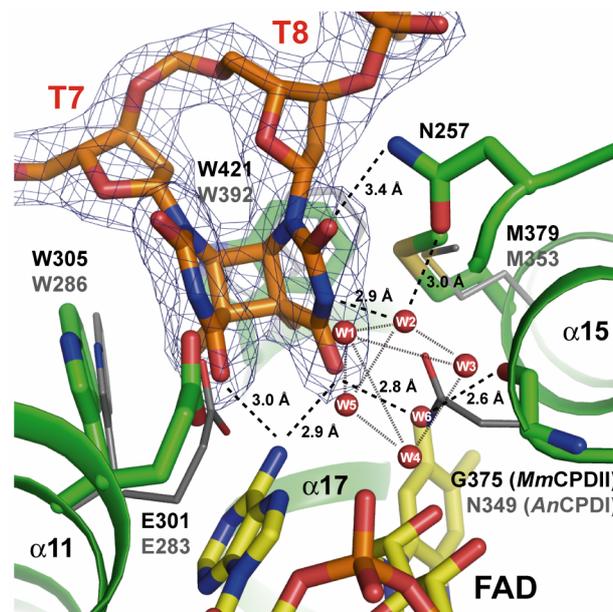


Abb. 62 Details der katalytischen Bindungstasche der *MmCPDII* mit intakten CPD-Schaden und struktureller Vergleich mit dem *AnCPDI*•CPD-DNA Komplex⁸⁶. Der CPD-Schaden (orange) stammt vom *MmCPDII*•CPD-DNA Komplex. Die gezeigte Elektronendichte ($2F_{obs}-F_{calc}$, SigmaA-gewichtet) ist auf 1σ konturiert.

Trotz der geringen Gesamtsequenzidentitäten zwischen Klasse II und Klasse I CPD Photolyasen bzw. DASH Cryptochromen, ist der Konservierungsgrad der Aminosäuren in der katalytischen Bindungstasche sehr hoch, was anhand der strukturellen Überlagerung in **Abb. 62** ersichtlich wird und bereits in der Literatur für *AnCPDI* und *AtDASH* beschrieben wurde^{25,86}. Der CPD-Schaden in seiner Gesamtheit ist in der *MmCPDII* von hydrophoben Aminosäuren umgeben. Die beiden konservierten Tryptophane W305 und W421 bilden eine L-förmige Abgrenzung und halten zusammen mit dem konservierten Methionin M379 den CPD-Schaden in der aktiven Tasche. Neben diesen Interaktionen gibt es eine Reihe von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Photolyase und Thymin-dimer. So bilden die C4-Carbonylgruppen der beiden Thymine des CPD-Schadens mit der N6-Aminogruppe des Adenins des katalytischen Kofaktors FAD eine H-Brücke aus. Das 5'-Thymin (T7) wiederum ist über das konservierte Glutamat E301 verbrückt, welches einen Einfluss auf die CPD-Bindungsaffinität und die Reparaturaktivität besitzt⁸⁸. Eine andere Situation ist gegeben für die Interaktionen zwischen Photolyase und CPD-Schaden am 3'-Thymin. Während in

*An*CPDI (N349) bzw. *At*DASH (N391) jeweils ein Asparagin Wasserstoffbrücken mit dem N3-Amid und dem C4-Carbonyl ausbildet, befindet sich in *Mm*CPDII an der äquivalenten Position ein nicht-funktionelles Glycin (G375). Stattdessen befindet sich im Bereich zwischen 3'-Thymin und der *Mm*CPDII ein *cluster* aus sechs Wassermolekülen, von denen ein Wasser (W6) die Seitenkette des fehlenden Asparagins einnimmt (**Abb. 62**). Damit stellt dieses Wassermolekül über H-Brücken nicht nur eine Verbindung mit dem C4-Carbonyl des Thymins und dem Rückgrat des Protein her, sondern über das C2'-Hydroxyl der Ribitylgruppe auch mit dem katalytischen Kofaktor FAD. Die fünf weiteren Wassermoleküle (W1-W5) sind quadratisch-pyramidal zwischen dem 3'-Thymin und dem Diphosphat des FAD angeordnet. Interessanterweise existiert dieser *cluster* bereits vor der Bindung an CPD-geschädigter DNA, da diese Wassermoleküle ebenfalls in der apo*Mm*CPDII Struktur vorhanden sind. Zusätzlich werden zwischen einem konservierten Asparagin (N257) und dem 3'-Thymin des *Mm*CPDII•CPD-DNA Komplexes Wasserstoffbrücken ausgebildet. Zum einen findet dies indirekt mit dem N3-Atom über den *cluster* statt, zum anderen geschieht dies direkt über das C2-Carbonyl. Ein weiterer Rest, Arginin R256, der allerdings in **Abb. 62** nicht gezeigt ist, liegt nahe der Oberfläche und befindet sich ebenfalls in einer hinreichend nahen Entfernung zum 3'-Thymin zur Ausbildung einer H-Brücke.

Eine schematische Zusammenfassung der Interaktionen zwischen der *Mm*CPDII und CPD-DNA ist in **Abb. 63** dargestellt. Gezeigt sind sowohl Wechselwirkungen zwischen der Photolyase und dem Desoxyribosephosphatrückgrat der DNA als auch die direkten Interaktionen innerhalb der katalytischen Tasche. Hierbei fällt sofort auf, dass die photolyase-vermittelten Interaktionen mit doppelstängiger, CPD-haltiger DNA fast ausschließlich mit dem geschädigten Strang stattfinden.

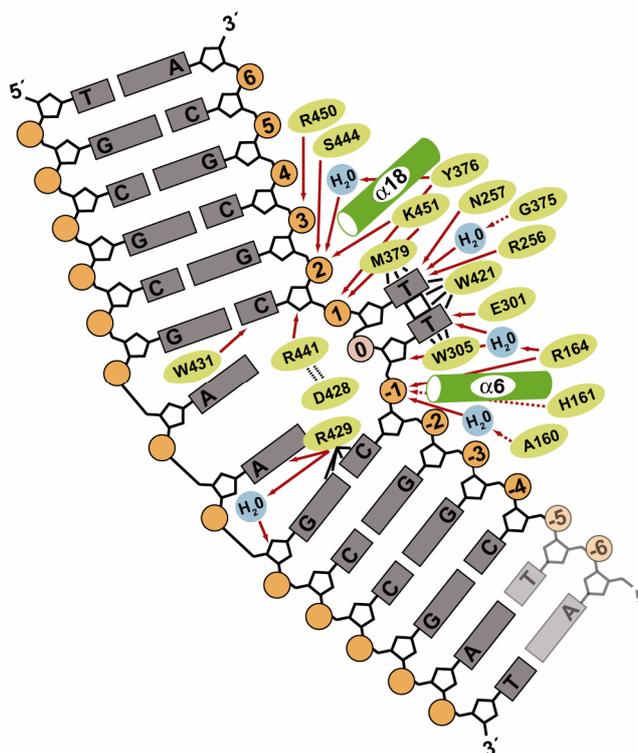


Abb. 63 Schematische Zusammenfassung der Interaktionen zwischen *MmCPDII* und doppelsträngiger CPD-DNA. Während gestrichelte Pfeile für Wechselwirkungen mit dem Proteinrückgrat stehen, entspricht ein durchgezogener Pfeil einer Interaktion mit der jeweiligen Seitenkette. Andere Wechselwirkungen sind mit schwarzen Linien dargestellt. Nicht strukturell aufgelöste Nucleotide sind verblasst illustriert.

4.19 Soaking von apo*MmCPDII*-Kristallen mit 8-HDF

Das *soaking* der apo*MmCPDII* Kristalle mit synthetischem 8-HDF zur strukturellen Charakterisierung der Antennenbindungsstasche verursachte innerhalb von 30 min sichtliche Veränderungen an den Proteinkristallen in Form von Rissen. Ein Verlust der inneren Ordnung der Kristalle wurde ebenso anhand der geringeren Auflösung von 2,7 Å im Vergleich zu den apo*MmCPDII* Kristallen mit 1,5 Å deutlich. Trotz allem deutete die Elektronendichte auf das Vorhandensein des Deazaflavins in der N-terminalen α/β -Domäne hin (**Abb. 64C**), obwohl dieser im Gegensatz zu den Ergebnissen mit der *TtCPDI* schlechter definiert war⁶⁴. Aus diesem Grund wurde in der Verfeinerung der Struktur eine Besetzung von lediglich 70% für den Antennenchromophor gewählt. Interessanterweise war in der *MmCPDII*•8-HDF_{soak} Struktur eine konformationelle Änderung des Loopbereichs zwischen dem β -Strang $\beta 2$ und der α -Helix $\alpha 2$ zu beobachten, welche als Folge der *in crystallo* Rekonstitution mit 8-HDF stattgefunden hat. Der Bereich zwischen Glutamat E60 und Alanin A64 wurde daher in zwei unterschiedlichen Konformationen modelliert und während der Verfeinerung eine Besetzung von jeweils 50% gewählt, damit die Temperaturfaktoren des Chromophors (18,4) mit denen der Loops bzw. die Loopbereiche untereinander (Loop A: 14,1 bzw. Loop B: 15,1) vergleichbar sind. Die weitere Charakterisierung der Holophotolyase und der

Antennenbindungsstasche wurde jedoch mit der Struktur der *in vivo* rekonstituierten *Mm*CPDII durchgeführt.

4.20 Struktur des *in vivo* rekonstituierten *Mm*CPDII•8-HDF Komplexes

Im Gegensatz zur Struktur des *soakings* ist die Elektronendichte des Antennenchromophors im *Mm*CPDII•8-HDF Komplex eindeutig definiert und das Deazaflavin 8-HDF kann ohne Zweifel mit einer Besetzung von 100% in die N-terminale α/β -Domäne modelliert werden (**Abb. 64A, D**). Durch die Präsenz des zusätzlichen Kofaktors gibt es keine Änderung an der Gesamtstruktur der *holoMm*CPDII was anhand der geringen *rmsd*-Werte für Komplex A mit 0,20 Å (330 C α -Atome) bzw. für Komplex B mit 0,29 Å (361 C α -Atome) im Vergleich zur *apoMm*CPDII Struktur deutlich wird. Der Antennenchromophor 8-HDF befindet sich innerhalb der N-terminalen Domäne in einer Distanz von 16,7 Å zum katalytischen Kofaktor FAD und sollte damit in der Lage sein, Energie über einen resonanten Energietransfer-Mechanismus auf diesen zu übertragen. Die Lage der Antenne in der α/β -Domäne entspricht der Position, an der sowohl das Deazaflavin in *An*CPDI⁶⁷, *Ti*CPDI⁶⁴ und *Dm*(6-4)⁶⁸ als auch das Ribityllumazin in CryB aus *R. sphaeroides*²⁷ und der Riboflavinanteil des FAD in der *S. tokodaii* Klasse I CPD Photolyase⁶² gebunden ist.

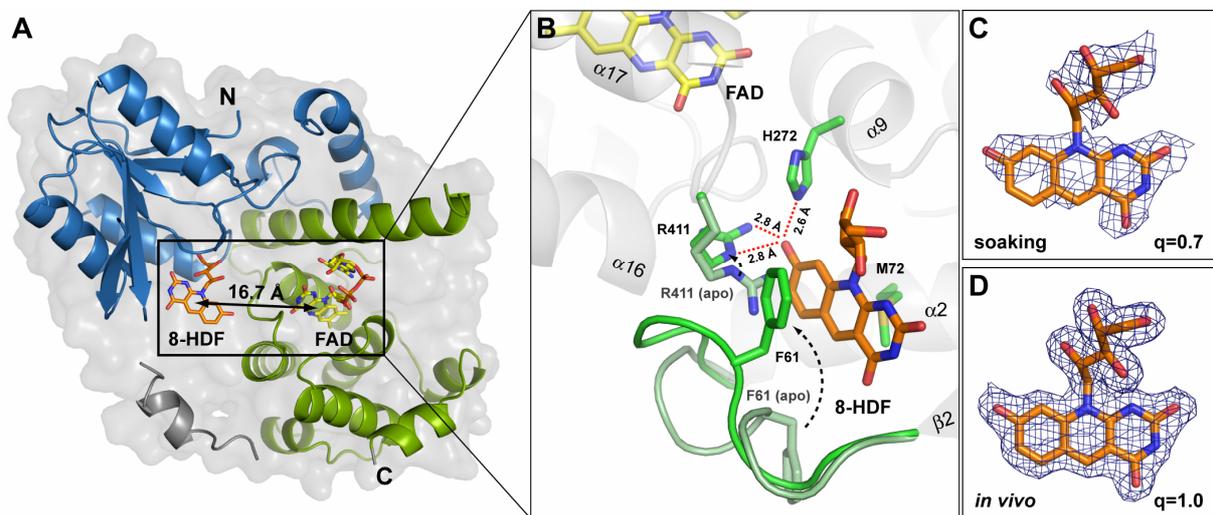


Abb. 64 (A) Angeschlossene Ansicht der Gesamtstruktur des *Mm*CPDII•8-HDF Komplexes. Die Farbgebung entspricht der *apoMm*CPDII-Struktur. Das Deazaflavin 8-HDF befindet sich in der N-terminalen α/β -Domäne in einem Abstand zum katalytischen Kofaktor FAD, der den Förster-Energietransfer möglich macht. (B) Strukturelle Details der Antennenchromophorbindungsstasche. Das gebundene 8-HDF induziert eine konformationelle Änderung in der Chromophor Umgebung. (C, D) Vergleich der Chromophorbesetzung in beiden Strukturen durch *soaking* von *apoMm*CPDII-Kristallen bzw. durch die Methode der *in vivo* Rekonstitution in *E. coli*. Die gezeigte Elektronendichte ($2F_{obs} - F_{calc}$, SigmaA-gewichtet) ist auf 1 σ konturiert.

Die in der *Mm*CPDII•8-HDF_{soak} Struktur beobachtete konformationelle Änderung des Loopbereichs zwischen Glutamat E60 und Alanin A64 ist durch die vollständige *in vivo* Rekonstitution mit dem Deazaflavin eindeutig in der Elektronendichte definiert und wurde daher wie in **Abb. 64B** dargestellt modelliert. Die aromatische Seitenkette des Phenylalanin F61 befindet sich nun in einer Position, so dass ein π -stacking mit dem aromatischen System des 8-HDF möglich ist. Neben dieser konformationellen Änderung des Loopbereichs zwischen β 2 und α 2 findet noch eine zusätzliche strukturelle Änderung in Form einer Reorientierung einer funktionell relevanten Aminosäure statt. Die Position des Arginin R411 ist so verändert, dass die basische Guanidiniumgruppe nun in der Lage ist Wasserstoffbrücken mit dem 8-Hydroxyrest des Deazaflavins auszubilden. Dieses Arginin führt in Verbindung mit dem ebenfalls basischen Histidin H272 zur Deprotonierung der 8-Hydroxygruppe innerhalb der Photolyase. Durch die Delokalisation des resultierenden Anions innerhalb des aromatischen 5-Deazaflavins wird aus 8-HDF somit ein chromogener Kofaktor. Generell ist die Antennenbindungstasche in der Umgebung des 5-Deazaflavin von aromatischen bzw. hydrophoben Seitenketten dominiert, die diesen Bestandteil des 8-HDF innerhalb der Antennenbindungstasche positionieren (**Abb. 65**).

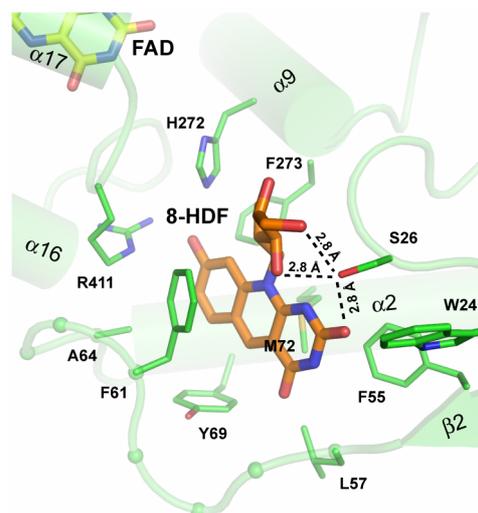


Abb. 65 Detailansicht der Deazaflavinbindungstasche mit Schwerpunkt auf den Aminosäuren in der Chromophorumgebung. Das 5-Deazaflavin wird vor allem durch aromatische bzw. hydrophobe Seitenketten positioniert, während das Serin S26 über Wasserstoffbrücken den Ribitylrest ausrichtet.

Ein anderes Bild stellt sich im Bereich des Ribitylrestes dar. Während auf der Seite der 8-Hydroxyrestes die Hydroxygruppen der C2'- und C4'-Atome des Ribityls indirekt H-Brücken über Wassermoleküle mit den umgebenden Seitenketten bzw. dem Proteinrückgrat ausbilden, befindet sich auf der gegenüberliegenden Seite ein zentraler, polarer Rest, das Serin S26. Die Seitenkette des Serins befindet sich in einer Entfernung, um

direkte Wasserstoffbrückenbindungen sowohl zu den C3'- und C5'-Hydroxygruppen des Ribityls als auch eine H-Brücke zu dem C2-Carbonyl ausbilden zu können (**Abb. 65**). Daher spielt diese Aminosäure wahrscheinlich eine wesentliche Rolle in der Bindung und der Positionierung der gesamten 8-HDF in der Antennenchromophorbindungstasche.

5 Diskussion

5.1 Eine archaeale Photolyase als Modell für eukaryotische Enzyme

Die phylogenetische Analyse macht deutlich, dass die Photolyasen der archaealen Gattung *Methanosarcina* aufgrund der hohen Sequenzhomologien für den gesamten Klasse II Subtyp und somit auch für die in dieser distinkten Gruppe vertretenen pflanzlichen und tierischen Enzyme ein geeignetes Modell darstellen (Abb. 66).

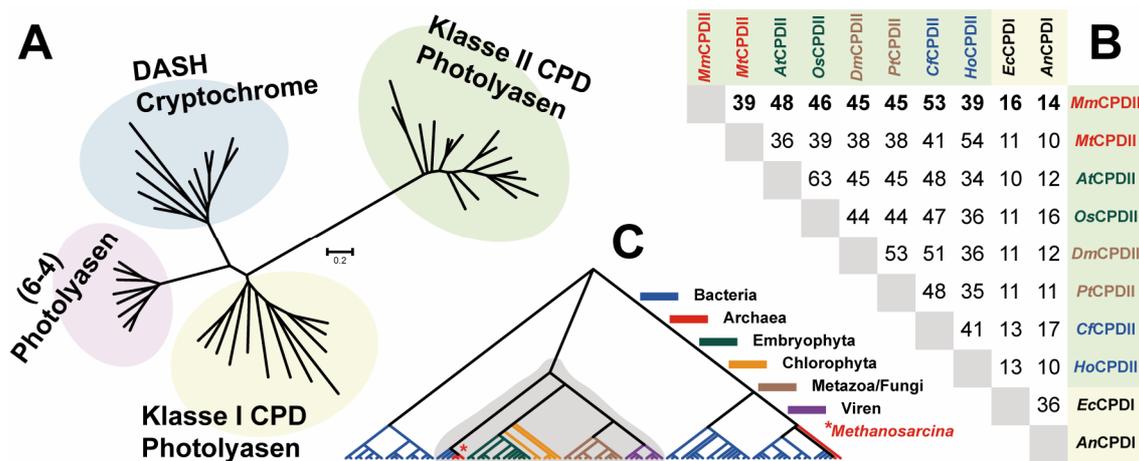


Abb. 66 Zusammenfassung der phylogenetischen Analyse der Vertreter der Phr/Cry-Familie mit DNA-Reparaturaktivität. (A) Die Klasse II CPD Photolyasen bilden eine distinkte Gruppe zu den übrigen Subtypen. (B) Die Sequenzhomologie innerhalb des Klasse II Subtyps ist signifikant höher im Vergleich zu den Klasse I Photolyasen. (C) Die archaeale *Mm*CPDII bildet mit den eukaryotischen und viralen Klasse II Photolyasen eine monophyletische Gruppe (grau hinterlegt).

Die geringen paarweisen Sequenzidentitäten (Abb. 66B) zwischen den Klasse I und Klasse II CPD Photolyasen zeigen auf, dass der sowohl funktionell als auch strukturell intensiv charakterisierte Klasse I Subtyp nicht als Maßstab für sämtliche CPD-Photolyasen genommen werden kann. Strukturelle Vorhersagen anhand von Homologiemodellen auf Grundlage verfügbarer Klasse I Strukturen, die Rückschlüsse auf funktionelle Aspekte liefern könnten, sind daher nur unter Vorbehalt zu verwenden. Die Bildung einer monophyletischen Gruppe mit den eukaryotischen bzw. viralen Photolyasen innerhalb des Klasse II Subtyps hebt wiederum den besonderen Modellcharakter der Photolyasen der archaealen Gattung *Methanosarcina* wie z. B. der *Mm*CPDII hervor (Abb. 66C). Die Ursache für die hohen paarweisen Sequenzidentitäten von über 45% zwischen diesen archaealen Photolyasen und den pflanzlichen bzw. tierischen Orthologen liegt möglicherweise in einem horizontalen Gentransfer, der zu einem relativ späten Zeitpunkt in der Evolution stattgefunden hat. Diese Art der Übertragung von Photolyasegenen zwischen verschiedenen Organismengruppen ist nicht unwahrscheinlich, da dieser Vorgang ebenfalls als Ursache für die Existenz einer

Klasse II CPD Photolyase in einem eukaryotischen, intrazellulären Parasiten als auch für das singuläre Auftreten des Klasse I Subtyps in Ascomyceten angenommen wird^{29,36,39}. Das Sequenzalignment der drei *Methanosarcina* Photolyasen zeigt untereinander eine hohe Sequenzhomologie mit paarweisen Sequenzidentitäten von 70% bis 80%. Insgesamt sind 300 Aminosäuren in dem multiplen Alignment identisch (64,7%) und 87 Positionen ähnlich (18,8%). Die verbleibenden, gering konservierten 77 Positionen (16,6%) befinden sich vor allem in der variablen Loopregion (*MmCPDII*: V186-E232) zwischen der N-terminalen Antennendomäne und der C-terminalen, katalytischen FAD-Bindungsdomäne (**Abb. 67**).

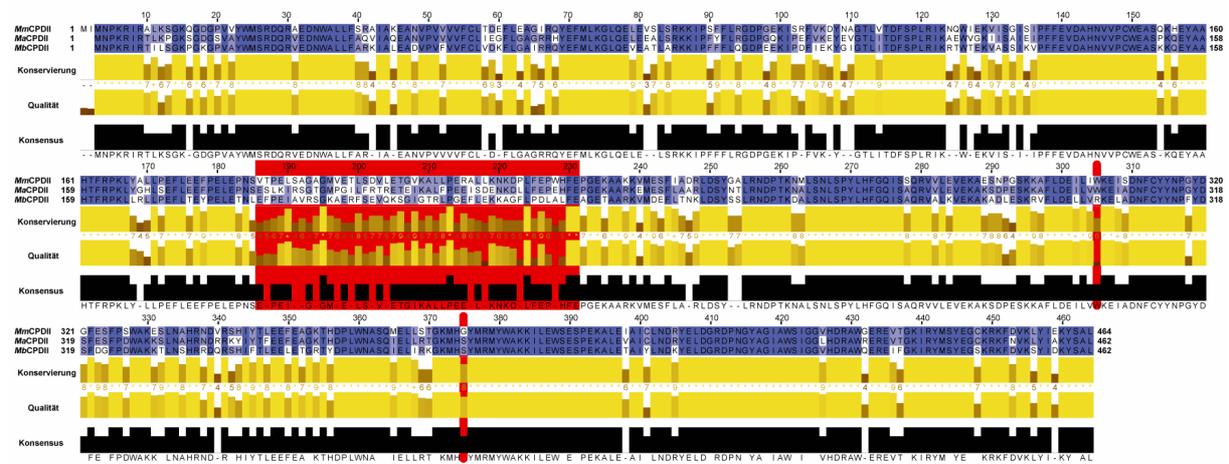


Abb. 67 Sequenzalignment der CPD-Photolyasen aus der archaealen Gattung *Methanosarcina*. Sowohl der variable Linkerbereich zwischen der N-terminalen und der C-terminalen Domäne als auch zwei Unterschiede in der Substratbindungstasche sind rot hervorgehoben.

Trotz des hohen Konservierungsgrads innerhalb der *Methanosarcina* Photolyasen gibt es im Bereich der Substratbindungstasche zwei Variationen auf Aminosäureebene, die ebenfalls im gesamten Klasse II Subtyp zu finden sind (**Abb. 67**, **Abb. 69**). Diese Variabilität wird in **Kapitel 5.6** anhand der ebenfalls im Rahmen dieser Arbeit gelösten *MbCPDII*-Struktur genauer betrachtet.

5.2 Photolyaseaktivität und Struktur der *MmCPDII*

Die Klasse II CPD Photolyase aus *Methanosarcina mazei* zeigt im UV/Vis-Spektrum nach der Proteinaufreinigung die Absorptionscharakteristika für Photolyase-gebundenes FAD_{ox} mit Absorptionsmaxima bei 362 nm und 377 nm bzw. bei 421 nm, 444 nm und 469 nm und unterscheidet sich damit vom Absorptionsspektrum von FAD_{ox} in Lösung mit Maxima bei 373 nm und 445 nm⁵³. Da dieses Flavin bisher in allen Vertretern der Phr/Cry-Familie als katalytischer Kofaktor gefunden wurde und der C-Terminus des Klasse II Subtyps ebenfalls

aus der universalen, FAD-bindenden Domäne (IPR005101⁵⁹) gebildet wird, war davon auszugehen, dass auch in der *Mm*CPDII FAD als Kofaktor vorhanden ist. Den Hinweis auf einen weiteren Antennenchromophor konnte zu diesem Zeitpunkt weder die UV/Vis- noch die Fluoreszenzspektroskopie liefern. In Anwesenheit eines externen Elektronendonors kann die Photolyase durch Belichtung (450 nm) aus den oxidierten Zustand zunächst in den neutralen semichinoiden Zustand FADH[•] überführt werden, der unter andauernder Belichtung in den vollreduzierten Zustand FADH⁻ übergeht. Entsprechende Photoreduktionen des katalytischen Kofaktors FAD wurden bisher nicht nur für Klasse I CPD Photolyasen⁵, sondern auch für *At*DASH¹⁷⁴ und pflanzliche Photolyasen des Klasse II Subtyps⁸⁰ gezeigt. Neben dieser Photoaktivierung des Kofaktors definieren die Affinität zu ungeschädigter bzw. CPD-geschädigter DNA und die Fähigkeit der DNA-Reparatur ein Enzym mit CPD-Photolyaseaktivität. Während der qualitativ durchgeführte Nachweis auf Reparaturaktivität mit dem modifizierten Aktivitätstest die sequenzbasierte Einordnung als CPD-Photolyase bestätigte, zeigten die Bindungsstudien der *Mm*CPDII, dass der Diskriminierungsgrad zwischen ungeschädigter und geschädigter DNA des Klasse II Subtyps (*Mm*CPDII: $K_{D,NS}/K_{D,S} \sim 10$) im Vergleich zu Klasse I Photolyasen (*Ec*CPDI: $K_{D,NS}/K_{D,S} \sim 10^4$)⁵ deutlich geringer ist. Dieser Unterschied und die Tatsache, dass die spezifische Bindung zu CPD-geschädigter DNA ungefähr um zwei Größenordnungen schwächer ist, stellt allerdings kein generelles Defizit des Klasse II Subtyps dar. Die geringeren Enzymkonzentrationen unter *in vivo* Bedingungen sind zu limitierend, um ein kompetitives, kooperativ verlaufendes unspezifisches Bindungsverhalten an doppelsträngige DNA zu ermöglichen.

Die Klasse II CPD Photolyase aus *Methanosarcina mazei* ist ein gutes Beispiel, dass zum Teil erhebliche Unterschiede in der Primärsequenz innerhalb einer Proteinfamilie nicht zwangsläufig eine andersartige Faltung und damit eine abweichende Gesamtstruktur hervorrufen. Trotz Sequenzidentitäten von teilweise weit unter 20% zu den übrigen Vertretern der Phr/Cry-Familie (**Abb. 66B**) besitzt die *Mm*CPDII die charakteristische, bilobale Enzymarchitektur und unterscheidet sich strukturell mit *rmsd*-Werten von $< 2,5$ Å bezogen auf die C α -Atome (**Abb. 52, Ergebnisse**) global nur geringfügig von den bisher strukturell charakterisierten Enzymen dieser Proteinfamilie¹⁷. Das strukturbasierte Alignment prominenter Vertreter der Phr/Cry-Familie mit Photolyaseaktivität zeigt, dass die *Mm*CPDII im Vergleich zu den übrigen Subtypen einen verkürzten C-Terminus besitzt, wodurch keine zusätzliche, terminale α -Helix ausgebildet wird (**Abb. 68**).

MmCPDII 217 LKLNKDPLEF PWHF--EPGE KAARKVMESF IAD--RLDSY GAI DPTK- ---NMLSNLS PYLHFGQISS QRVVLEVEKA ESN-----P GSKKAFLE 301
EcCPDI 186 -ITLNYPRQS FDTAHFPVEE KAATAQLRQF CQN--GAGEY EQQRDFPAV- ---EGTSRLS ASLATGGLSR RQCLHRLLEA QPQA---LDG GAGSVWLNR 274
AnCPDI 200 -----WDG GF--PVEPEGE TAAATARLQEF CDR--AIADY DPQRNFPAE- ---AGTSGLS PALKFGAIGI RQAWQASAA HALSR--SDEAR NSIRVWQCR 283
TtcPDI 172 ----- --LPLPEPEGE EAALAGLRAF LEA--KLPRY AERDRLLD- ---EGGSRLS PYFALGVLSR RLAAMEAERR G-----G EGARKWVAE 244
AtDASH 243 -----TR GMRF--VQGE SAGVGRVFEY FWKDLKLVY KEATRNGMLG- ---PDYSTKFS PWLAGPCISF RFIYEEVQRY EKE---RVAN NSTYVWLF 325
Dm(6-4) 215 -----LG PNKR--PGGE TEALRMEES LKDEIWARF E--KPNTAFN SLEPSTTVLS PYLFGCLSA RLFNQKLKEI IKR---QPKHS QPPVSLIG 299

MmCPDII 302 ILLKKEISDM FCYINPGYD- --GFESFSPW AKESLNNAHRN DVARSH DLE EPEAGKTHDP I NASQEMELL STGKMHGSTR M AKKIL-E SESPEKALE 397
EcCPDI 275 LI--WREFYRH LITYHPSLC- --KHFPIANT DRV----- QSNPAHLQ AMQEGKTGYP IVDAAARQLN STGKMHNRRL MITASFLW-K DL--LIDNR 360
AnCPDI 284 LA--WREFYQH ALYHPPSLA- -DGPYRSLWQ QFP----- NENREALFT AMTQAQTGYP IVDAAARQLT ETGMMNRRCR MIVASFLT-K DL--IIDNR 368
TtcPDI 245 LL--WRDFSYH LLYHPPWMA- -----ERPLDPR FQAFP----- QDEALFQ AWYEGKTGYP LVDAAARLH ATGFLSNRRC MNAQFAVKH LL---LIDNR 329
AtDASH 326 LI--WRDYFRF LSIKCGNSL- -FHLGGPRNV Q-----G KSDQKLFQ SWRDAKTGYP LIDANMKELS TTGFMNRGR QIVCSFLW-R DM---GLEWR 410
Dm(6-4) 300 LM--WREFYTT VAAAEPNFDR MLGNVYCMQI P-----G QEHPDHLQ AWTHGRTGYP FIDAIMRQLR QEGWIHLAR HAVACFLTRG DL--WISWC 385

MmCPDII 398 IAICLDRYE LDGRDPEYA GIAMSIGGVH DRAWGEREVT GKIRYM--SY EGCKRKFV- KLYIEKYS- ----- 462
EcCPDI 361 EGERYFMSQL IDGDLAANG GKWVASTGT DAAP----- YPRIF--NP TQGEKFDHE GEFIRWLPE LRDVGRKVVH EPWKQAQAG VTLDPQPIV EHKEARVQLT AAEEAARK-- 469
AnCPDI 369 RGEQFFMQHL VDGDLAANG GKWVASSGM D-----P KPLRIF--NP ASQARKFDAT ATYIKRWLPE LHHVHPKDLI SGEITPIERR GYPAPIVNHN LRQKQKALY NQLKAAI--- 475
TtcPDI 330 RCEAEFRHLL LDGDRAWLQ GKWVNGSLGV DAAPIF---- --RVF--NP VLQGERHDPE GWLKRWAFE YFSYAPKDPV VOLEARRRY LRLAR---- 416
AtDASH 411 MGAWEFETCL LDYDFCANG NHTVAGV- NDPRE---- --DRYF--SI FKQQRNTDPE GEIVAFWLOQ LRLPKEKRH WEGRLMYMT VVFLKHGNG- 499
Dm(6-4) 386 EGQRVFEQLL LDQDVALRG NHTV SASAF -----FH QYFR-VYSPF AFG-KKTDQ GHYIRKYVE LSKYPAGCIY EPWKASLVDQ RAYGCVLTD YPHRIVKHEV VHKENIKRMG AAYKVNREVR 505

Abb. 68 Strukturbasiertes Alignment der *MmCPDII* mit Klasse I CPD Photolyasen aus *E. coli* (1DNP), *A. nidulans* (1TEZ) und *T. thermophilus* (1IQR), dem CryDASH aus *A. thaliana* (2VTB) und der (6-4)-Photolyase aus *D. melanogaster* (3CVV). Die C-terminale, helikale Erweiterung ist in hellblau hervorgehoben. Konservierte, funktionelle Elemente sind für die *MmCPDII* in grün und für alle anderen Subtypen in orange hervorgehoben. (1) Tryptophane (rot) der Dyade (*MmCPDII*) und der Triade (sonstige Photolyasen), (2) oberflächenexponierte Aminosäuren, die an der Photoreduktion beteiligt sind (lila), (3) Asparagin zur Stabilisierung des neutralen Radikalzustands FADH^{*} (weiß) und Klasse II-spezifisches Glycin (braun), (4) Glutamat am 5'-Thymidin und Asparagin am 3'-Thymidin (blau), (5) alternatives Asparagin am 3'-Thymidin (*MmCPDII* N257, gelb) und stabilisierendes Arginin (*MmCPDII* R256, gelb). Die Aminosäuren der katalytischen Bindungstasche sind rot umrandet.

Aktuell konnte anhand der Struktur des *Drosophila* Cryptochromes gezeigt werden, auf welche Weise eine solche C-terminale Elongation, die ein Sekundärstrukturelement wie z. B. eine Helix ausbildet, ihre Funktion als Signal-übertragendes Element ausüben kann⁵⁰. In der fehlenden helikalen Erweiterung am C-Terminus liegt bei einem Blick auf die phylogenetischen Verwandtschaftsbeziehungen (Abb. 7, Einleitung) eine mögliche Ursache, warum aus dem Klasse II Subtyp keine Cryptochrome und somit keine Photorezeptoren im klassischen Sinne abstammen.

5.3 Konservierte Funktionsprinzipien – Strukturelle Unterschiede

Der strukturelle Vergleich des Klasse II CPD Subtyps am Beispiel der *MmCPDII* mit den übrigen Vertretern der Phr/Cry-Familie mit Photolyaseaktivität zeigt, dass die beiden grundlegenden Prinzipien, welche die DNA-Reparaturaktivität gewährleisten, funktional konserviert sind: Die Stabilisierung des katalytischen FAD erfolgt durch ein Asparagin und die Photoreduktion des Kofaktors über einen Elektronenweg entlang redoxaktiver Tryptophane. Anhand der strukturellen Informationen der *MmCPDII* als Beispiel für den Klasse II-Subtyp konnte gezeigt werden, dass sich innerhalb dieser distinkten Gruppe diese funktionellen Elemente allerdings topologisch unterscheiden⁸¹. In einem Taxa-übergreifenden, Klasse II-spezifischen Sequenzalignment wiederum wird die Konservierung dieser einzelnen funktionellen Elemente deutlich (Abb. 69).

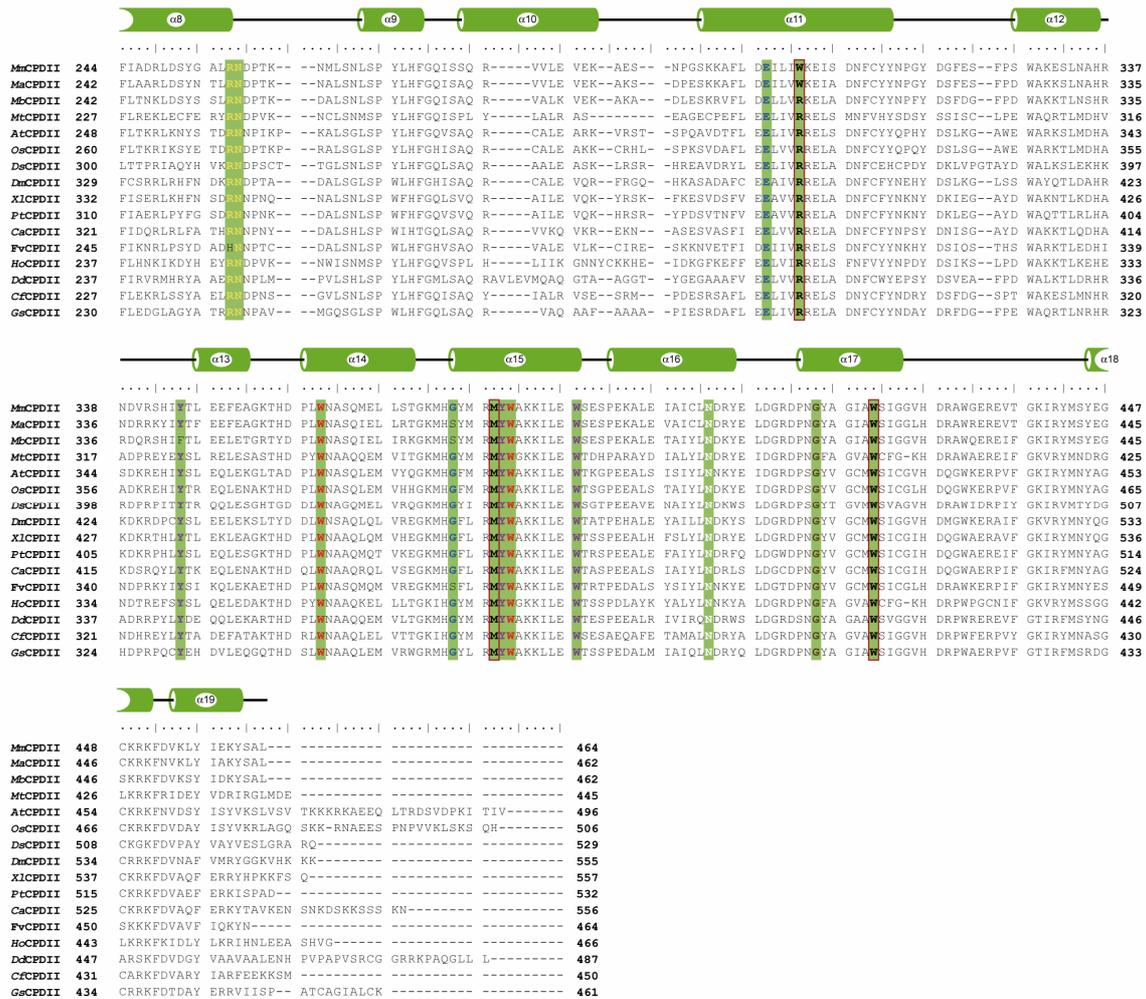


Abb. 69 Taxa-übergreifendes, Klasse II-spezifisches Sequenzalignment. Konservierte, funktionelle Elemente sind entsprechend **Abb. 68** farblich hervorgehoben. Klasse II CPD Photolyasen: *Methanosarcina mazei* (*MmCPDII*), *Methanosarcina acetivorans* (*MaCPDII*), *Methanosarcina barkeri* (*MbCPDII*), *Methanobacterium thermoautotrophicum* (*MtCPDII*), *Arabidopsis thaliana* (*AtCPDII*), *Oryza sativa* (*OsCPDII*), *Dunaliella salina* (*DsCPDII*), *Drosophila melanogaster* (*DmCPDII*), *Xenopus laevis* (*XiCPDII*), *Potorous tridactylus* (*PtCPDII*), *Carassius auratus* (*CaCPDII*), Fowlpox virus (*FvCPDII*), *Halothermothrix orenii* (*HoCPDII*), *Desulfovibrio desulfuricans* (*DdCPDII*), *Chlorobium ferrooxidans* (*CfCPDII*), *Geobacter sulfurreducens* (*GsCPDII*).

5.3.1 Stabilisierung des katalytischen Kofaktors

Die Stabilisierung der unterschiedlichen Redoxzustände erfolgt in den bisher charakterisierten Vertretern der Phr/Cry-Familie mit DNA-Reparaturaktivität durch ein Asparagin über eine einzelne H-Brücke zum N5-Stickstoff des katalytischen Kofaktors FAD. In der *MmCPDII* befindet sich das funktionell analoge Asparagin jedoch auf einem anderen Strukturelement mit einer quasi koplanaren Ausrichtung der funktionellen Gruppe (**Abb. 70A**).

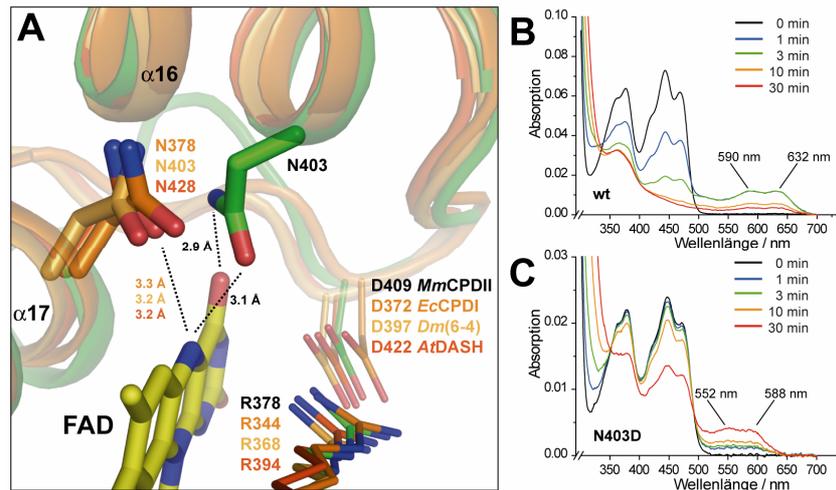


Abb. 70 Stabilisierung des katalytischen Kofaktors FAD in Vertretern der Phr/Cry-Familie mit DNA-Reparaturaktivität. (A) Das Asparagin N403 befindet sich in der *MmCPDII* auf einem anderen Strukturelement. (B, C) Die Mutante *MmCPDII*-N403D akkumuliert im Vergleich zum Wildtyp den neutralen semichinoiden FADH[•]-Zustand mit blauverschobenen Maxima.

Das Klasse II-spezifische Alignment zeigt nicht nur die Konservierung des Asparagins in diesem distinkten Photolyase-Subtyp, sondern auch, dass das Glycin (*MmCPDII*: G415) an der äquivalenten Position auf der Helix $\alpha 17$ in den Klasse II Photolyasen ebenfalls konserviert ist (**Abb. 69**).

Durch den Verlust des katalytischen FAD in den Mutanten *MmCPDII*-N403A und *MmCPDII*-N403L während der Aufreinigung bzw. in der Mutante *MmCPDII*-N403D innerhalb von 24 h wird deutlich, dass das Asparagin N403, welches mit der Amidgruppe eine weitere Wasserstoffbrücke zu dem O4-Sauerstoff des FAD ausbildet, in der *MmCPDII* nicht nur für die Stabilisierung der Redoxzustände, sondern in dieser Orientierung auch für die Bindung des Kofaktors essentiell ist. Der Austausch des neutralen Asparagins in eine saure Asparaginsäure (*MmCPDII*-N403D) bewirkt im Vergleich zum Wildtyp außerdem die Akkumulation des neutralen semichinoiden Zustands FADH[•] und keine weitere Photoreduktion zu FADH⁻ (**Abb. 70B, C**). Der Verbleib in dieser Redoxform im Zusammenhang mit den blauverschobenen Maxima der semichinoiden Form (hypsochromer Effekt) ist charakteristisch für Cryptochrome in Pflanzen und vermutlich deren Signalzustand^{55,57}. Durch den Austausch eines Asparagins in eine Asparaginsäure war es somit möglich, die photochemischen Eigenschaften einer Photolyase in die eines pflanzlichen Cryptochroms zu modulieren. Aktuell konnte in einem inversen experimentellen Ansatz gezeigt werden, dass es ebenso möglich ist, ein pflanzliches Cryptochrom in eine Photolyase umzuwandeln. Die charakterisierte Mutante *AtCry1*-D396N konnte nicht nur in den vollreduzierten Zustand FADH⁻ überführt werden, sondern zeigte auch eine CPD-Reparaturaktivität in einzelsträngiger DNA¹⁷⁵.

Eine Erklärung für den Verbleib der Mutante *MmCPDII-N403D* und der pflanzlichen Cryptochrome im neutralen semichinoiden Zustand FADH^\bullet ist die negative Ladung der Carboxygruppe, die eine Folge der Protonierung des N5-Stickstoffs durch die Seitenkette ist. Die weitere Photoreduktion zu FADH^- ist daher inhibiert, da eine zweite negative Ladung in unmittelbarer Nähe einen elektrostatisch nicht favorisierten Zustand darstellt¹⁷⁵.

5.3.2 Der Elektronenweg des Klasse II Subtyps

Die Photoreduktion des katalytischen Kofaktors FAD findet in der Phr/Cry-Familie entlang einer Elektronenkaskade statt, der auf struktureller Ebene durch konservierte Tryptophane gebildet wird. Die dreidimensionale Struktur der *MmCPDII* ermöglichte die Identifizierung eines neuen, Klasse II-spezifischen Elektronenwegs über ebenfalls konservierte Tryptophane und diente zudem als Grundlage für strukturbasierte Untersuchungen dieser spezifischen Kaskade. Diese strukturellen Informationen bestätigten zudem die aufgrund von Konservierungsargumenten postulierte Elektronenkaskade des Homologiemodells der *Oryza sativa* Photolyase⁸⁰. Während anfänglich im Klasse II Subtyp noch analog zu Klasse I Photolyasen von einer Triade ausgegangen wurde und die Funktionalität dieser konservierten Tryptophane nicht bewiesen war, konnte durch Austausch dieser Reste als auch weiterer oberflächenexponierter Tyrosine in redox-inerte Phenylalanine die funktionelle Relevanz verdeutlicht werden (**Abb. 71**).

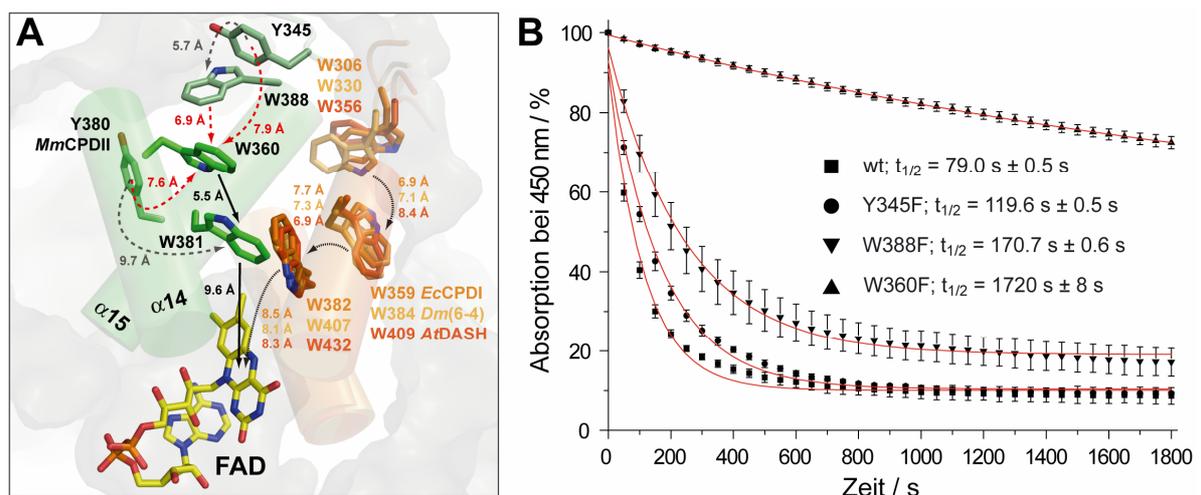


Abb. 71 Elektronenkaskade des Klasse II-Subtyps am Beispiel der *MmCPDII*. (A) Der Elektronenweg ist eine funktionelle Dyade in der das Tryptophan W360 das zentrale Element bildet. (B) Nachweis der funktionellen Relevanz anhand von ermittelten Halbwertszeiten einzelner Reste.

In diesem Zusammenhang wurde das proximale Tryptophan W381 als essentiell für die Bildung des Radikalpaars identifiziert, da die entsprechende *MmCPDII-W381F* Mutante

keinerlei Photoreduktion zeigte (**Abb. 56, Ergebnisse**). Das mediale Tryptophan W360 zeigte im Vergleich zum Wildtyp ebenfalls eine 22-fach verminderte Restaktivität von 4,6% und keine Akkumulation des neutralen semichinoiden Zustands. Im Vergleich dazu hat der Austausch des oberflächenexponierten Tryptophans W388 nur einen geringen Einfluss auf die Photoreduktion des katalytischen Kofaktors (Restaktivität: 46%). Anhand dieser Analyse wird deutlich, dass die Elektronenkaskade im Klasse II Subtyp nicht zwangsläufig eine Tryptophan-Triade ist, sondern vielmehr eine Tryptophan-Dyade. Diese Aussage wird durch die verbleibende Restaktivität von 4,6% der *MmCPDII-W360F* Mutante gestützt, da in diesem Fall das Tyrosin Y380 als *bypass* und somit als potentieller Elektronendonator für das kurzzeitig gebildete Radikalpaar $FADH^{\bullet}/W381^{+\bullet}$ dienen kann (**Abb. 71**). Die mit dem Wildtyp vergleichbare Restaktivität der *MmCPDII-Y380F* Mutante zeigt jedoch, dass diese Aminosäure nicht essentiell für die Photoreduktion ist. Im Klasse II Subtyp stellt somit das „mediale“ Tryptophan (*MmCPDII*: W360) den terminalen Verzweigungspunkt zu den oberflächenexponierten Aminosäuren (*MmCPDII*: W388, Y345, Y380, Y442) dar, die in diesem Subtyp allesamt hoch konserviert sind (**Abb. 69**). Allerdings deutet die Restaktivität von 46% der *MmCPDII-W388F* Mutante im Vergleich zu den beiden untersuchten Tyrosin-Varianten darauf hin, dass das Tryptophan W388 der favorisierte, intrinsische Elektronendonator ist. Dieses Modell einer Tryptophan-Dyade mit Tryptophan W388 als terminalen Elektronendonator wird durch die Ergebnisse der transienten EPR-Spektroskopie und der zeitaufgelösten UV/Vis-Absorptionsspektroskopie gestützt. In den EPR-Experimenten war weder ein Tyrosyl-Radikal nachweisbar, noch ergab die Mutante *MmCPDII-W360F* ein auflösbares EPR-Signal. Vergleichbare EPR-spektroskopische Messungen des CryDASH aus *X. laevis*, in denen allerdings das terminale Tryptophan W324 gegen ein redox-inertes Phenylalanin ausgetauscht wurde, ergaben ebenso kein Signal im tr-EPR-Spektrum und deuten somit auf die Notwendigkeit einer Triade in diesem Subtyp hin¹⁶⁰. Die zeitaufgelöste UV/Vis-Absorptionsspektroskopie der *MmCPDII* lieferte ebenfalls keinen Hinweis auf die Beteiligung eines Tyrosins im Elektronentransferweg, wie dies für *AnCPDI*⁷⁹ und *Xl(6-4)*⁷⁸ gezeigt wurde. Die Tatsache, dass kein $TyrO^{\bullet}$ -Radikal beobachtet wurde, muss allerdings relativiert werden, da die Oxidation des Tyrosins durch Trp^{\bullet} langsamer sein könnte als die Rekombination von $FAD^{\bullet-}$ und Trp^{\bullet} .

5.3.3 Evolution der Photolyasenkatalyse

Bei der evolutionären Betrachtung dieser beiden funktionellen Merkmale stellt sich die Frage, warum im Vergleich zu den anderen Subtypen sich diese in Klasse II Photolyasen auf

unterschiedlichen strukturellen Elementen befinden. Die phylogenetische Analyse liefert einen ungewurzelten Baum, der sich in einem ersten *clustering* in zwei Gruppen einteilen lässt, die den größten Abstand zueinander haben: Klasse II CPD Photolyasen und alle übrigen Subtypen. Dies deutet nicht nur auf eine frühe Abspaltung des Klasse II Subtyps infolge einer Genduplikation hin, sondern auch, dass das ursprüngliche Enzym eine CPD-Photolyase war, da dieser Subtyp in beiden Clustern vorkommt^{29,31}. Dieses *clustering* lässt sich bemerkenswerterweise direkt auf die Verteilung der beiden untersuchten funktionellen Merkmale übertragen. Eine Hypothese zur Klärung dieses Zusammenhangs und damit ein Ansatz zum Verständnis der Evolution der Phr/Cry-Familie ist in **Abb. 72** dargestellt und im Folgenden beschrieben.

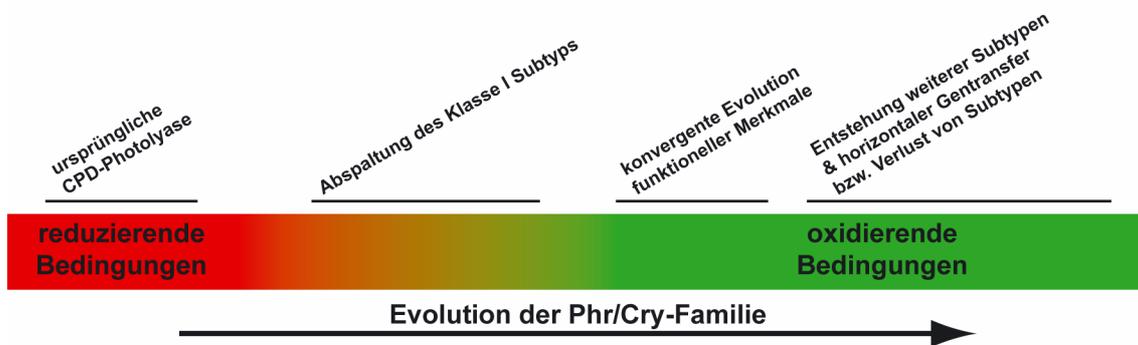


Abb. 72 Hypothetischer Verlauf der Evolution funktioneller Merkmale in der Phr/Cry-Familie.

In einer Frühform der Photolyase war die Elektronenkaskade zur Reduktion des katalytischen Kofaktors FAD noch nicht notwendig, da das Enzym bzw. der Organismus in einer Umgebung mit reduzierenden, strikt anaeroben Bedingungen (z. B. hydrothermale Quellen) existierte. Dieses funktionelle Merkmal wurde erst zu einem späteren Zeitpunkt der Evolution der Phr/Cry-Familie wichtig, an dem sich der Klasse II Subtyp bereits abgespalten hatte, und eine effektive Reduktion über einen exogenen Faktor aufgrund oxidierender Bedingungen essentiell war. In einem solchen Fall würde es sich um eine konvergente Evolution dieses funktionellen Merkmals innerhalb der Phr/Cry-Familie handeln. In diesem Zusammenhang muss allerdings erneut hinterfragt werden, inwiefern diese Elektronenkaskade *in vivo* eine Rolle spielt und nicht nur ein Artefakt der durchgeführten *in vitro* Experimente ist. Für *E. coli* und dessen Klasse I CPD Photolyase wurde gezeigt, dass Stämme mit CPD-Reparaturdefizienz eine mit dem Wildtyp vergleichbare Photoreaktivierung aufweisen, wenn diese durch unter *in vitro* Bedingungen inaktiven Photolyasen komplementiert werden⁸⁵. Diese Art von *in vivo* Experimenten könnte ebenfalls neue Erkenntnisse über die Relevanz dieser Elektronenkaskade im Klasse II-Subtyp bringen. Dieser Ansatz zur Evolution

der funktionellen Merkmale lässt sich allerdings nur bedingt auf das Asparagin übertragen, welches den neutralen semichinoiden Zustand FADH^\bullet des katalytischen Kofaktors während der Photoreduktion und DNA-Reparatur stabilisiert. Anhand der *Ec*CPDI-N378S Mutante konnte gezeigt werden, dass diese Aminosäure essentiell für die Reparatur von CPD-Schäden sowohl unter *in vitro* als auch *in vivo* Bedingungen ist⁵⁴. Unter Berücksichtigung des Reparaturmechanismus muss daher eine stabilisierende Umgebung für diesen Redoxzustand bereits in der Frühform einer Photolyase vorhanden gewesen sein. Es wäre denkbar, dass die Stabilisierung dieses Redoxzustands in einer frühen Photolyase durch einen Carbonylsauerstoff des Peptidrückgrats übernommen wurde und erst zu einem späteren Zeitpunkt ein Asparagin (bzw. eine Asparaginsäure oder ein Cystein) die funktionelle Rolle übernahm. Ein Beispiel hierfür liefert das Flavodoxin aus *Clostridium beijerinckii* in dem z. B. der neutrale semichinoide Zustand FMNH^\bullet über eine H-Brücke zwischen dem Peptidcarbonyl des Glycins G57 und dem N5-Stickstoff des FMN stabilisiert wird^{54,176,177} (Abb. 73A).

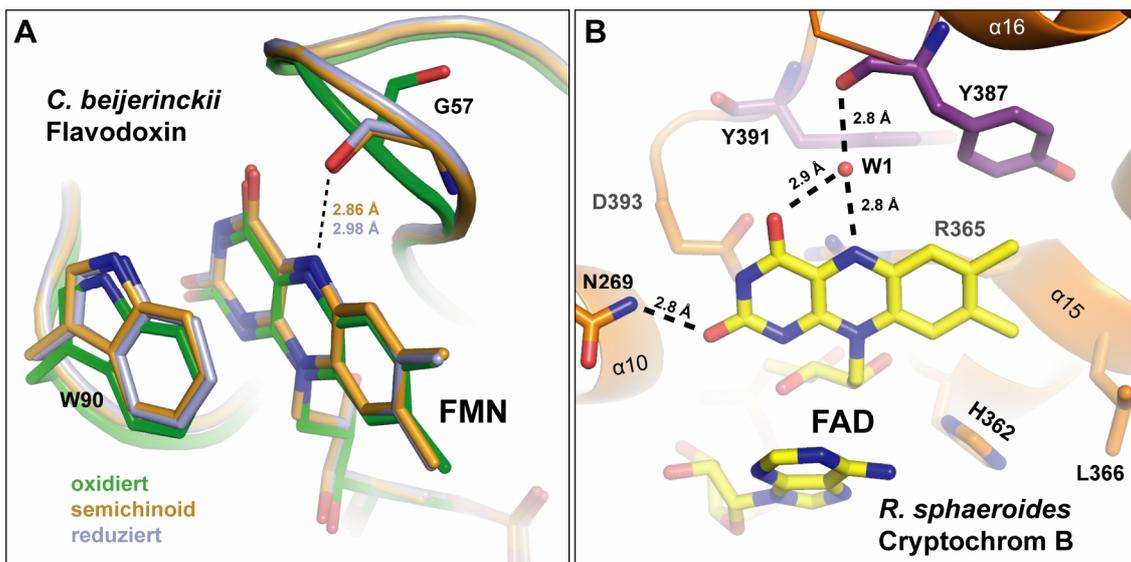


Abb. 73 (A) Im Falle des Flavodoxin aus *C. beijerinckii* findet die Stabilisierung des protonierten N5-Stickstoffs des FMN über einen Carbonylsauerstoff statt. (B) Im Cryptochrom B aus *R. sphaeroides* wird dieser Zustand des N5-Stickstoffs des katalytischen FAD über ein Wassermolekül (W1) stabilisiert.

Eine Alternative zu diesem Mechanismus stellt die Stabilisierung über ein einzelnes Wassermolekül in der unmittelbaren Umgebung des N5-Stickstoffs dar. Dies konnte aktuell am Beispiel der funktionellen und strukturellen Daten des Cryptochroms B aus *R. sphaeroides* gezeigt werden²⁷ (Abb. 73B).

5.4 DNA-Bindungsmodus des Klasse II Subtyps

Durch die erfolgreiche Kokristallisation der *Mm*CPDII mit CPD-haltiger, doppelsträngiger DNA konnten Einblicke in den Bindungsmodus des Klasse II Subtyps gewonnen und die Unterschiede zu den Klasse I CPD Photolyasen am Beispiel der *An*CPDI aufgezeigt werden. Bei der Kristallisation des *Mm*CPDII•CPD-DNA Komplexes fiel auf, dass die Proteinkristalle innerhalb weniger Stunden entstanden. Eine Erklärung für diesen schnellen Kristallisationsverlauf kann die quasi-kontinuierliche Anordnung der doppelsträngigen DNA in der Kristallpackung über den 3'-Arm zweier symmetrieäquivalenter Moleküle sein (**Abb. 59B, Ergebnisse**). Durch das π -stacking der beteiligten Basen erfolgt ein geordnetes Zusammenlagern der einzelnen Moleküle, wodurch eine für die Bildung eines kritischen Nucleus und somit für den gesamten Kristallisationsprozess notwendige lokale Konzentrationserhöhung an *Mm*CPDII•CPD-DNA Komplexen entsteht. Diese quasi-kontinuierliche und somit rigide Anordnung ist ebenfalls die Ursache für die eindeutig definierte Elektronendichte in diesem Bereich der doppelsträngigen DNA im Vergleich zum 5'-Arm. Anhand der geringen strukturellen Unterschiede (*rmsd*-Werte ~ 0.4 Å) zwischen der *Mm*CPDII-Struktur und der beiden *Mm*CPDII•CPD-DNA Komplexe wird deutlich, dass durch die Bindung der geschädigten DNA keine großen konformationellen Änderungen oder ein etwaiger *induced fit* ausgelöst wird. Dies steht im Einklang mit den Beobachtungen für den *An*CPDI•CPD-DNA Komplex⁸⁶. Allerdings kann man anhand der abweichenden Orientierung des 3'-Arms um $\sim 11^\circ$ in beiden Komplexen erkennen, dass eine gewisse Plastizität im Bereich der Erkennung der doppelsträngigen DNA auf der Oberfläche vorliegt. Trotz dieses Unterschieds in der Ausrichtung des 3'-Arms sind jedoch die signifikanten Interaktionen zwischen Photolyase und DNA in beiden Komplexen vorhanden. Im direkten Vergleich sämtlicher Interaktionen zwischen den beiden CPD-Subtypen fällt dabei auf, dass diese im Falle der *Mm*CPDII im Gegensatz zur *An*CPDI ausschließlich mit dem CPD-Strang stattfinden (**Abb. 74**).

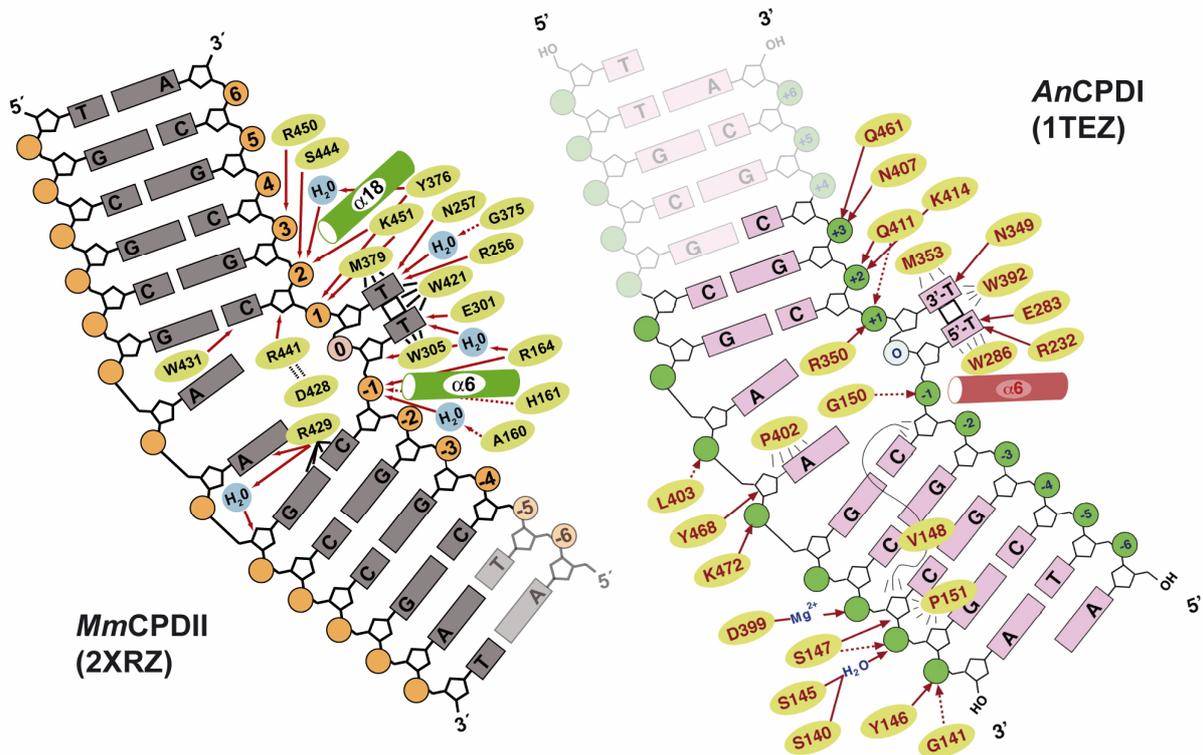


Abb. 74 Der schematische Vergleich der Bindungsmodi zwischen der *MmCPDII* (links) und der *AnCPDI* (rechts) illustriert anschaulich, dass die Klasse II CPD Photolyase ausschließlich mit dem CPD-Strang interagiert.

Der Vergleich der elektrostatischen Oberflächeneigenschaften mit den übrigen Vertretern der Phr/Cry-Familie mit DNA-Reparaturaktivität zeigt, dass das positive Potential der *MmCPDII* eher räumlich begrenzt vorliegt: Elektrostatische Wechselwirkungen werden zu den Phosphaten P^{-1} , P^{+1} , P^{+2} und zu einem geringeren Anteil zu P^{+3} ausgebildet (**Abb. 74**, **Abb. 75A**). Die canyonartige Oberflächenstruktur der *MmCPDII* wird durch eine südlich und eine westlich verlaufende Vertiefung geprägt, deren Begrenzungen durch die basischen Aminosäuren Arginin R429 und R441 bzw. Arginin R450 und Lysin K451 dominiert werden (**Abb. 75B**), welche sich auf der Loopregion zwischen den Helices $\alpha 17$ und $\alpha 18$ bzw. auf der Helix $\alpha 18$ befinden (**Abb. 76**). Besonders im Bereich, der mit einem gelben Kreis in **Abb. 75B** hervorgehoben ist, werden eine Vielzahl von Interaktionen mit dem Ribosephosphatrückgrat entlang der großen Furche ausgebildet.

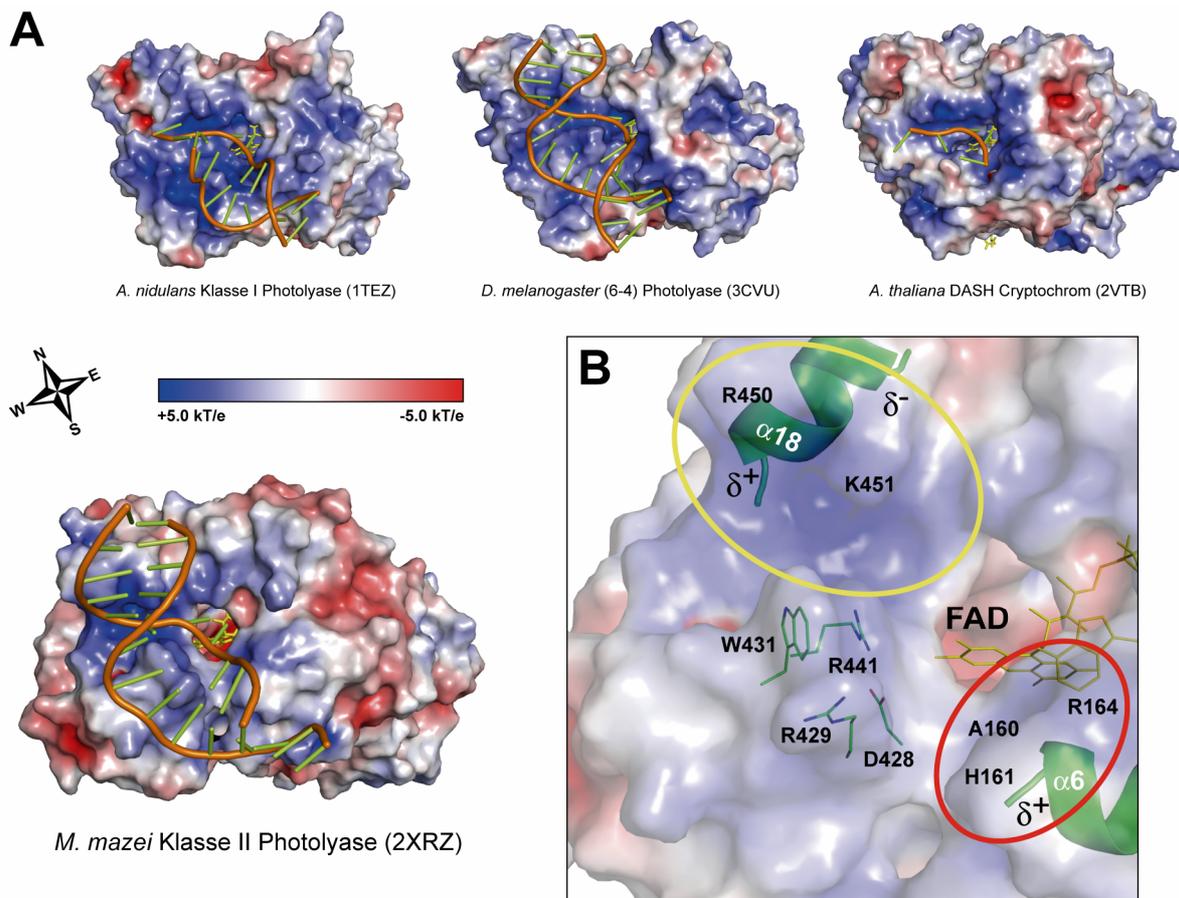


Abb. 75 DNA-Bindungsmodus des Klasse II-Subtyps am Beispiel der *MmCPDII*. **(A)** Vergleich der elektrostatischen Oberflächeneigenschaften der Vertreter der Phr/Cry-Familie mit DNA-Reparaturaktivität. Die Windrose verdeutlicht die canyonartige Struktur der Proteinoberfläche. **(B)** Elektrostatische Detailansicht des Oberflächenbereichs, der für die Bindung des Desoxyribosephosphatrückgrats der geschädigten DNA-Strangs zuständig ist.

Ein interessante Besonderheit des Klasse II Subtyps ist die bereits im strukturellen Alignment angesprochene fehlende C-terminale Erweiterung. In Klasse I CPD Photolyasen, wie z. B. der *AnCPDI*⁸⁶ oder in (6-4)-Photolyasen¹⁷² bildet dieser Sequenzbereich eine Art strukturelle Begrenzung der DNA-Bindungsregion in Form einer Helix, die in der *MmCPDII* aber auch im *AtDASH*²⁵ nicht vorhanden ist. In der *MmCPDII* wird die canyonartige Oberfläche dagegen in diesem Bereich durch die Loopstruktur zwischen den Helices $\alpha 17$ und $\alpha 18$ begrenzt. Das Fehlen einer derart ausgeprägten Begrenzung der Bindungsregion kann möglicherweise den durch die Gelshift-Experimente ermittelten geringeren Diskriminierungsgrad der *MmCPDII* zwischen ungeschädigter und geschädigter DNA im Vergleich z. B. zu der *EcCPDI* erklären.

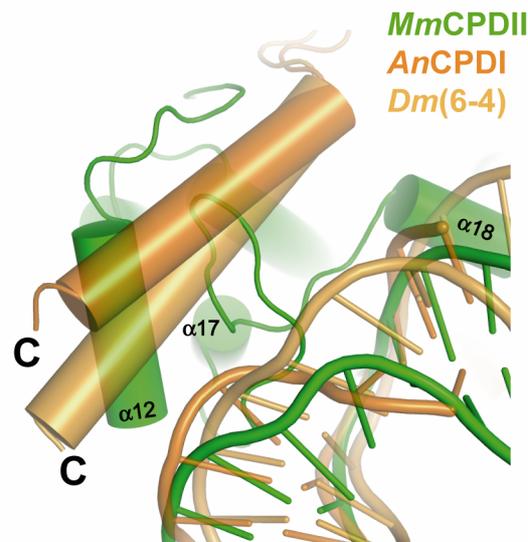


Abb. 76 Im Gegensatz zu den übrigen Photolyase-Subtypen besitzt die *MmCPDII* keine helikale, C-terminale Verlängerung. Die canyonartige Oberfläche wird in diesem Bereich durch die Loopstruktur zwischen den Helices $\alpha 17$ und $\alpha 18$ begrenzt.

Das Fehlen dieser C-terminalen Helix, die in bakteriellen Klasse I CPD Photolyasen ein wesentliches Element der Bindungsregion für die doppelsträngige DNA darstellt, impliziert möglicherweise, dass der Klasse II Subtyp einen verbesserten Zugang zu CPD-Schäden außerhalb des Nukleosoms haben könnte¹⁷⁸ und sich dieser Photolyase-Subtyp daher in eukaryotischen Organismen durchgesetzt hat. Eine weitere Region, in der nennenswerte elektrostatische Interaktionen mit dem Ribosephosphatrückgrat des CPD-geschädigten Strangs stattfinden, ist der in **Abb. 75B** mit einem roten Kreis markierte Bereich. An der Position des Phosphats P^{-1} befinden sich die basische Seitenkette des Arginin R164 und die Amidgruppen des Alanins A160 bzw. des Histidins H161. Vergleichbar mit dem *AnCPDI*•CPD-DNA Komplex⁸⁶ erfolgt die elektrostatische Stabilisierung in der *MmCPDII* zusätzlich durch die Dipolmomente der Helices $\alpha 6$ bzw. $\alpha 18$ (**Abb. 74**, **Abb. 75B**).

Trotz der geringen Unterschiede auf Ebene der Gesamtstruktur, finden dennoch konformationelle Änderungen einzelner Aminosäuren im Substratbindungsbereich statt. Durch das Hineindreuen des Thymindimers in die aktive Tasche und das damit verbundene teilweise Entwinden der doppelsträngigen DNA entsteht im Duplex ein Lücke mit $\sim 120 \text{ \AA}^2$ (**Abb. 77**).

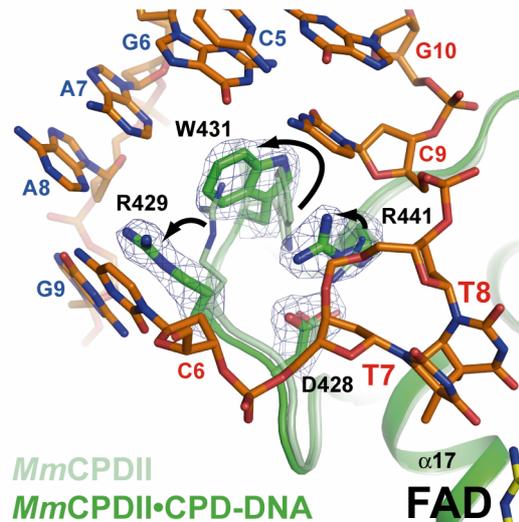


Abb. 77 Signifikante konformationelle Änderungen der Seitenketten durch die Bindung der CPD-DNA finden hauptsächlich in der bolzenartigen Region des Substratbindungsbereichs statt.

Während im *An*CPDI•CPD-DNA Komplex dieser Bereich teilweise von der Loopregion zwischen den Helices $\alpha 17$ und $\alpha 18$ ausgefüllt wird⁸⁶, befinden sich im *Mm*CPDII•CPD-DNA Komplex in diesem Bereich eine Reihe von Aminosäuren, deren Seitenketten sich als Folge der Substratbindung neu orientiert haben. Das Arginin R429 befindet sich in einer Position, die sowohl eine Interaktion mit dem N3-Stickstoff des Purinrings (Adenin A8) als auch ein π -stacking mit den benachbarten Basen ermöglicht und so die Position des in die aktive Tasche gedrehten Thymins T7 einnehmen kann. In Komplex A ist die Indolgruppe des Tryptophans W431 um $\sim 90^\circ$ gedreht, so dass diese eine H-Brücke mit dem C2-Carbonyl des Cytosin C9 ausbildet. Gleichzeitig ändert die Salzbrücke D428/R411 ihre Position in einer Weise, dass ein stabilisierendes π -stacking zwischen dem Arginin R411 und dem Tryptophan W431 möglich ist. Möglicherweise ist diese strukturelle Anordnung, die wie eine Art Bolzen in die entstandene Lücke passt, beim Entwinden der doppelsträngigen DNA und beim Flip-Mechanismus notwendig, um der entstehenden Torsionsspannung entgegen zu wirken bzw. das Hineindreuen in die aktive Tasche zu erleichtern.

5.5 Der intakte CPD-Schaden in der Bindungstasche

Obwohl die Substratbindungstasche der *Mm*CPDII den beiden bisher strukturell charakterisierten *An*CPDI•CPD-DNA bzw. *At*DASH•CPD-DNA Komplexen sehr ähnelt, besitzt nur der *Mm*CPDII•CPD-DNA Komplex einen intakten CPD-Schaden in der aktiven Tasche (**Abb. 78**).

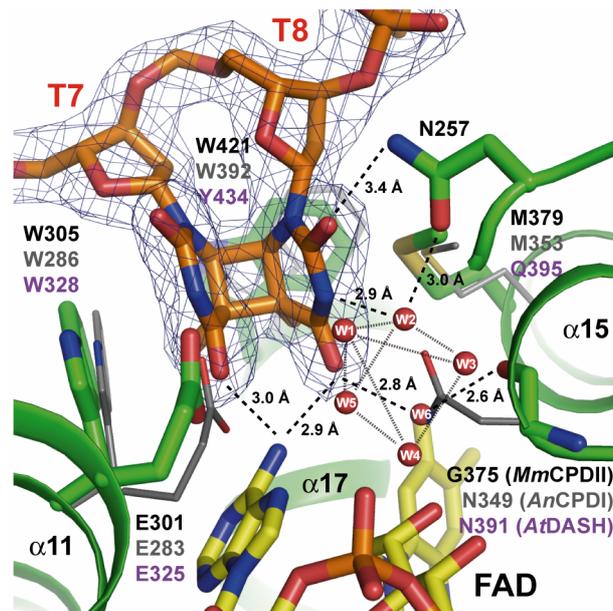


Abb. 78 Vergleich der CPD-Bindungstaschen der *MmCPDII* (schwarz) mit *AnCPDI* (grau) und *AtDASH* (lila). Das fehlende Asparagin am 3'-Thymin sorgt in Verbindung mit dem stattdessen vorhandenen Wassercluster (W1-W6) für eine erhöhte strukturelle Flexibilität in der *MmCPDII*-Bindungstasche und inhibiert dadurch möglicherweise eine strahlungsinduzierte Reparatur.

Diese Tatsache wurde während der Verfeinerung der Kristallstruktur anhand der eindeutig definierten Elektronendichte im Bereich der C5-C5' und C6-C6' Bindungen erkennbar. Einen Hinweis auf die Unversehrtheit des CPD-Schadens liefert außerdem der Neigungswinkel der beiden Cyclobutanringe zueinander (**Abb. 79**).

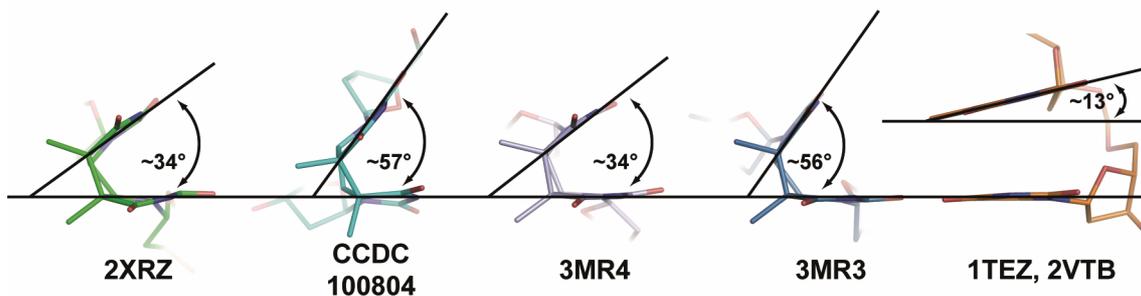


Abb. 79 Übersicht der Neigungswinkel der beiden Cyclobutanringe in strukturell aufgelösten CPD-Schäden (2XRZ: *MmCPDII*•CPD-DNA; CCDC100804: Synthetischer CPD-Schaden; 3MR3, 3MR4: Menschliche DNA Polymerase η •CPD-DNA; 1TEZ: *AnCPDI*•CPD-DNA; 2VTB: *AtDASH*•CPD-DNA).

Während in den beiden zuvor veröffentlichten Komplexstrukturen (1TEZ⁸⁶ bzw. 2VTB²⁵) die Thyminen mit einem Neigungswinkel von $\sim 13^\circ$ quasi planar zueinander stehen, entspricht die Verkippung von $\sim 34^\circ$ im *MmCPDII*•CPD-DNA Komplex (2XRZ⁸¹) eher einem intakten CPD-Schaden. Dies wird bei Betrachtung der Kristallstruktur des synthetischen CPD-Schadens (CCDC100804¹⁷⁹) mit einem Winkel von $\sim 57^\circ$ deutlich und spiegelt sich auch

in einer Reihe von vier Komplexstrukturen der menschlichen DNA-Polymerase η mit CPD-DNA in Winkeln zwischen 34° und 56° wieder¹⁸⁰.

Die Ursache für den intakten CPD-Schaden in der Bindungstasche ist allerdings kein generelles Defizit an photochemischer Aktivität der *Mm*CPDII im kristallinen Zustand. Anhand der *in crystallo* Spektroskopie konnte gezeigt werden, dass in Anwesenheit eines Reduktionsmittels die kristalline Photolyase bei Raumtemperatur photoreduzierbar ist bzw. das katalytische FAD unter kryogenen Bedingungen unabhängig vom Reduktionsmittel durch Synchrotronstrahlung reduziert werden kann. Letzteres wurde bereits zuvor für die *An*CPDI gezeigt⁸². Eine Erklärung für den intakten CPD-Schaden im *Mm*CPDII•CPD-DNA Komplex könnte in der höheren strukturellen Flexibilität der Bindungstasche liegen. Durch das Fehlen des Asparagins am 3'-Thymin in Verbindung mit dem beschriebenen strukturell flexibleren Wassercluster (W1-W6) ist möglicherweise die sterische Spannung innerhalb des gebundenen CPD-Schadens in der *Mm*CPDII-Bindungstasche deutlich geringer (**Abb. 78**). Im Gegensatz dazu bewirkt das Asparagin in *An*CPDI und *At*DASH eventuell eine Bindung des Substrats in einer Art und Weise, die das Aufbrechen des Cyclobutanrings infolge einer strahlungsinduzierten Reparatur begünstigt.

5.6 Strukturelle Unterschiede innerhalb des Klasse II Subtyps

Trotz der hohen paarweisen Sequenzidentitäten zwischen den einzelnen *Methanosarcina* Photolyasen als auch innerhalb des Klasse II Clusters zeigen beide Sequenzalignments dennoch zwei signifikante Unterschiede im Bereich der Substratbindungstasche (**Abb. 67**, **Abb. 69**). Mit Hilfe der verfügbaren *Mb*CPDII-Struktur können diese Variationen genauer betrachtet werden (**Abb. 80**).

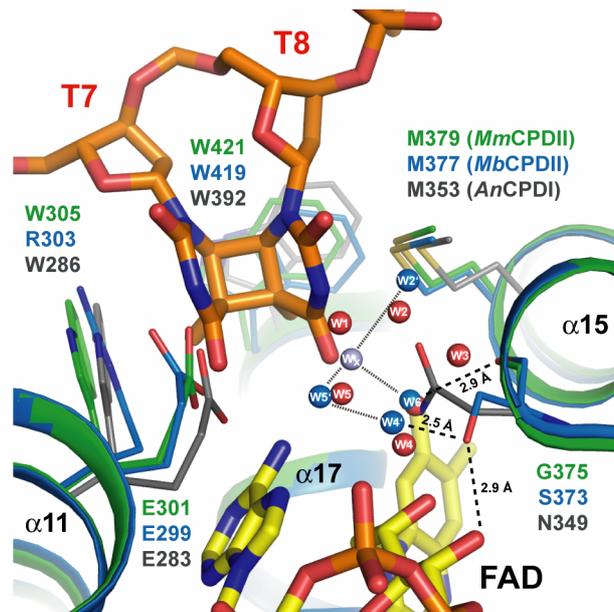


Abb. 80 Vergleich der CPD-Bindungstaschen der *MmCPDII* (grün) mit *MbCPDII* (blau) und *AnCPDI* (grau). Das Wassermolekül W6 nimmt in beiden Photolyasen des Klasse II Subtyps die Position der Asparaginseitenkette der *AnCPDI* ein. Im Gegensatz zur *MmCPDII* besitzt die *MbCPDII* allerdings keine quadratisch-pyrimidale Anordnung weiterer Wassermoleküle (W1-W5, rot).

Das Tryptophan W305 der *MmCPDII*, welches in der Substratbindungstasche mit dem 5'-Thymin des CPD-Schadens über ein π -stacking interagiert, ist sowohl in der *MbCPDII* als auch in den pflanzlichen und tierischen Klasse II CPD Photolyasen (31/31) ein Arginin. Diese Variation zeigt jedoch keine Beeinträchtigung in der Katalyse¹⁸¹ und sollte keinen nennenswerten Einfluss auf den Interaktionsmodus haben. Allerdings könnte diese zusätzliche basische Aminosäure an der Oberfläche der Substratbindungstasche die stärkere Bindung der *MbCPDII* an ungeschädigte DNA erklären^{168,181}. Der zweite Unterschied betrifft den Bereich am 3'-Thymin. In den bisher strukturell charakterisierten Enzymen mit CPD-Reparaturaktivität befindet sich in der Nähe das bereits erwähnte Asparagin (*AnCPDI*: N349⁸⁶, *AtDASH*: N391²⁵), das mit der Seitenkette H-Brücken sowohl zu dem N3-Amid und dem C4-Carbonyl des Thymins ausbilden kann (**Abb. 78**). Innerhalb des Klasse II Subtyps ist an dieser Stelle in den pflanzlichen und tierischen Photolyasen ein konserviertes Glycin (30/30) während in den prokaryotischen Enzymen sowohl ein Glycin (26/59) als auch ein Asparagin (29/59) oder zumindest ein Serin (3/59) vorkommen kann. Sowohl in der *MmCPDII* (Glycin) als auch in der *MbCPDII* (Serin) nimmt ein Wassermolekül (*MmCPDII*: W6) die Position der Seitenkette des Asparagins ein und ist in beiden Photolyasen bereits im Vorfeld einer Substratbindung vorhanden. Der Austausch des Glycins zu einem Serin in der Substratbindungstasche hat keinen direkten Einfluss auf dieses Wassermolekül, da die Seitenkette zu der C4-Hydroxygruppe der Ribityls des katalytischen Kofaktors FAD gerichtet ist. Die quadratisch-pyrimidale Anordnung weiterer

Wassermoleküle (*Mm*CPDII: W1-W5) ist in der *Mb*CPDII nicht vorhanden. Einige Wasser befinden sich jedoch auf äquivalenten Positionen und bilden mit dem Wassermolekül W_x in der *Mb*CPDII ebenfalls ein H-Brückennetzwerk. Ein Blick auf die Struktur der pflanzlichen CPDII-Bindungstasche aus *O. sativa*¹⁸² (Glycin) zeigt außerdem, dass ein äquivalentes Wassermolekül ebenfalls vorhanden ist. Dieses Wasser stellt somit ein konstitutives Element innerhalb eines Teils der Klasse II CPD Photolyasen und sorgt möglicherweise durch die direkte Interaktion mit dem C4-Carbonyl der 3'-Thymins und der übrigen Wassermoleküle der Umgebung für die kurzzeitige Protonierung des 3'-Thyminradikals während der DNA-Reparatur. Transfervorgänge dieser Art kommen z. B. in Bakteriorhodopsinen vor, in denen ein Cluster aus Wassermolekülen die terminale Abgabe eines Protons während des Photozyklus vermittelt^{183,184}.

Anhand dieser verfügbaren strukturellen Informationen kann man sagen, dass es zwar gewisse Variationen innerhalb der aktiven Tasche des Klasse II Subtyps gibt, diese aber keinen nennenswerten Einfluss auf grundlegende Funktionen haben sollten. Somit bleibt der Modellcharakter der archaealen Photolyasen der Gattung *Methanosarcinales* für die pflanzlichen und tierischen Orthologen erhalten.

5.7 Der Antennenchromophor der *Mm*CPDII

Da weder die spektroskopischen noch die röntgenkristallographischen Daten in der heterolog in *E. coli* produzierten *Mm*CPDII auf einen Antennenchromophor hindeuteten, trifft die Bezeichnung "apo*Mm*CPDII" auf diese Form der rekombinanten Photolyase zu. Der lichtsammelnde Kofaktor ist zwar für die Reparaturaktivität unter Laborbedingungen wie für die *Mm*CPDII verdeutlicht nicht zwangsläufig notwendig, am Beispiel der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* konnte allerdings gezeigt werden, dass *in vivo* ein Fehlen der Antenne zum Verlust der Photolyaseaktivität führen kann. Dieser Zusammenhang wurde am Stamm *C. reinhardtii phr1* demonstriert, der keine FO-Synthase (*phr1*) besitzt und eine Defizienz in der Photoreaktivierung aufweist. In einem Komplementationsansatz mit einem *phr1*-Genkonstrukt konnte dieser genetische Defekt jedoch ausgeglichen und die Fähigkeit zur *in vivo* Photoreaktivierung wieder hergestellt werden. Diese direkte Abhängigkeit beweist somit die essentielle Rolle des 8-HDF als Antennenchromophor in der *Cr*CPDII^{185,186}. Für eine vollständige spektroskopische und funktionelle Charakterisierung kann daher die Kenntnis über eine etwaige Antenne von großem Interesse sein.

Die Identifizierung des Antennenchromophors der *Mm*CPDII erfolgte in einem ersten Schritt durch die *in vitro* Rekonstitution mit potentiellen Chromophoren. In der anschließenden

Analyse mittels UV/Vis-Spektroskopie zeigte nur der Ansatz mit chemisch synthetisierten 8-HDF eine Änderung des Absorptionsspektrums der *Mm*CPDII (**Abb. 36, Ergebnisse**). Insbesondere die Rotverschiebung des Absorptionsmaximums im Vergleich zum 8-HDF in Lösung verdeutlicht die Einbindung des Deazaflavins in die Photolyase als Antennenchromophor. Dieser bathochrome Effekt, der bereits von anderen Photolyasen des Deazaflavin-Typs bekannt ist^{66,68,82,159}, könnte durch Ausdehnung des delokalisierten π -Elektronensystems im Deazaflavinanion entstehen. Mit Hilfe der strukturellen Daten lässt sich erklären, dass nur das Deazaflavinanion durch Ausbildung einer Salzbrücke zur Seitenkette des Arginin R411 gebunden werden kann (**Abb. 64B, Ergebnisse**).

Eine Analyse der metabolischen Stoffwechselwege von *E. coli* und der Gattung *Methanosarcinales* unter Verwendung der *KEGG Pathway Database*^{187,188} machte deutlich, dass das bakterielle Expressionssystem im Gegensatz zu dem Ursprungsorganismus zur Produktion von 8-HDF nicht in der Lage ist. Auf diese Weise konnte folglich nur apo*Mm*CPDII erhalten werden. Durch die Etablierung der Synthese von 8-HDF in *E. coli* über den in **Abb. 81** dargestellten artifiziellen enzymatischen Syntheseweg unter Verwendung eines Kofaktorplasmids, welches die bifunktionale FO-Synthase aus *S. coelicolor* (ScFbiC) codiert, konnte die Methode der *in vivo* Rekonstitution sowohl für die *Mm*CPDII als auch für die anderen Photolyasen etabliert werden.

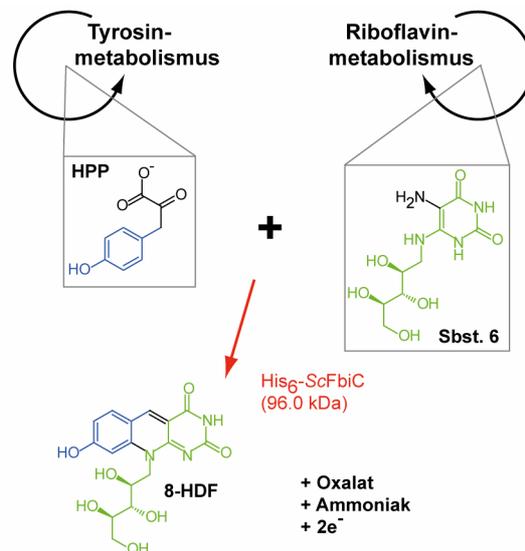


Abb. 81 Artifizielle FO-Synthese im *E. coli* Expressionssystem, welche durch die FO-Synthase aus *Streptomyces coelicolor* (ScFbiC) ermöglicht wird.

Eine erfolgreiche *in vivo* Rekonstitution mittels UV/Vis-Spektroskopie wurde in den folgenden Photolyasen nachgewiesen: *Mm*CPDII, *An*CPDI und *Dm*(6-4). Das Absorptionsspektrum des *Mm*CPDII•8-HDF Komplexes entsprach dabei dem Spektrum der

in vitro rekonstituierten *Mm*CPDII ($\lambda_{\max}=435$ nm) und die spektralen Eigenschaften des *An*CPDI•8-HDF Komplexes ($\lambda_{\max}=438$ nm) glichen der Literatur^{66,82,159}. Interessanterweise zeigte der *Dm*(6-4)•8-HDF Komplex eine leichte Rotverschiebung des Maximums ($\lambda_{\max}=448$ nm) im Vergleich zu der *in vitro* rekonstituierten Photolyase ($\lambda_{\max}=440$ nm)⁶⁸. Dieser Unterschied im Absorptionsmaximum kann generell durch einen Unterschied in der Chromophorumgebung verursacht werden. Die in diesem Zusammenhang durchgeführte strukturelle Analyse des *in vitro* rekonstituierten *Dm*(6-4)•8-HDF Komplexes ergab eine konformationelle Änderung eines Loopbereichs und die Rotation eines Tryptophans infolge der Kofaktorbindung innerhalb der Bindungstasche⁶⁸. Es ist denkbar, dass durch die *in vivo* Rekonstitution eine geringfügig abweichende Konformationsänderung in der Umgebung verursacht wird, die das Absorptionsmaximum minimal variiert. Eine vergleichbare Änderung des Loopbereichs zwischen $\beta 2$ und $\alpha 2$ fand ebenfalls infolge der Kofaktorbindung im *Mm*CPDII•8-HDF Komplex statt und führte zu einem π -stacking zwischen dem Phenylalanin F61 und dem 5-Deazaflavinanteil des 8-HDF. Das Fluoreszenzemissionsspektrum der holo*Mm*CPDII entspricht mit dem Maximum bei 467 nm den Fluoreszenzdaten der bisher charakterisierten holo*An*CPDI^{66,159} bzw. holo*Dm*(6-4)⁶⁸ und weicht nur geringfügig von dem Fluoreszenzmaximum des 8-HDF in Lösung bei 470 nm ab (**Abb. 47, Ergebnisse**). Zusammenfassend kann man sagen, dass die Daten der UV/Vis- und der Fluoreszenzspektroskopie zeigen, dass es sich bei den Ergebnissen der *in vitro* Rekonstitution bzw. des *soakings* von apo*Mm*CPDII-Kristallen nicht um ein experimentelles Artefakt handelt, sondern dass Deazaflavin auch unter kompetitiven Bedingungen als Antenne eingebaut wird. Im Fall der *Tt*CPDI erfolgte dagegen der Einbau des 8-HDF unter diesen Umständen nicht und steht damit in einem gewissen Widerspruch zu den Beobachtungen der *in crystallo* Rekonstitution⁶⁴. Eine mögliche Erklärung für dieses unterschiedliche Bindungsverhalten ist, dass das Deazaflavin zwar unter experimentellen Bedingungen die natürliche Antenne FMN z. B. aufgrund höherer Konzentrationen ersetzen kann, aber im eigentlichen Organismus dieser Kofaktor bevorzugt wird. Dies spricht für eine nicht-promiskuitive Antennenbindungstasche der *Tt*CPDI und steht im Einklang mit der Tatsache, dass *T. thermophilus* keine Enzyme zur Synthese von 8-HDF besitzt. Das Fehlen eines Antennenchromophors in der *Mm*CPDII, die im FO-defizienten *E. coli* Expressionssystem produziert wurde, deutet ebenfalls auf die hohe Spezifität dieser Bindungstasche für das Deazaflavin 8-HDF hin. Mittels *KEGG Pathway Database* konnten die Enzyme CofG und CofH im Methanstoffwechsel (ko00680) der Gattung *Methanosarcina* identifiziert werden, die in den Archaea für die Synthese von 8-HDF zuständig und homolog

zu den N- bzw. C-terminalen Bereichen der FO-Synthase FbiC sind. Auf Grundlage der experimentellen und der metabolischen Daten kann somit davon ausgegangen werden, dass das Deazaflavin 8-HDF der native Antennenchromophor der *Methanosarcina* Photolyasen ist. Die *in vivo* Rekonstitution der *At*CPDII lieferte keinerlei Hinweis auf den Einbau des 8-HDF als Antennenchromophor. Das Absorptionsspektrum entspricht photolyase-gebundenem FAD_{ox} und ist vergleichbar mit den Daten aus der Literatur¹⁶⁷.

5.8 FO-Bindungsmuster des Klasse II Subtyps

Anhand der strukturellen Daten des *Mm*CPDII•8-HDF Komplexes (Abb. 82A) wird deutlich, dass die Antennenbindungstasche durch mehrere Merkmale definiert wird. Die Deprotonierung der 8-Hydroxygruppe erfolgt über die beiden in der C-terminalen Domäne vorhandenen, basischen Aminosäuren (*Mm*CPDII: H272 bzw. R411), die das Deazaflavin erst in seinem chromogenen Zustand stabilisieren bzw. im Falle des Arginins für den bathochromen Effekt sorgen.

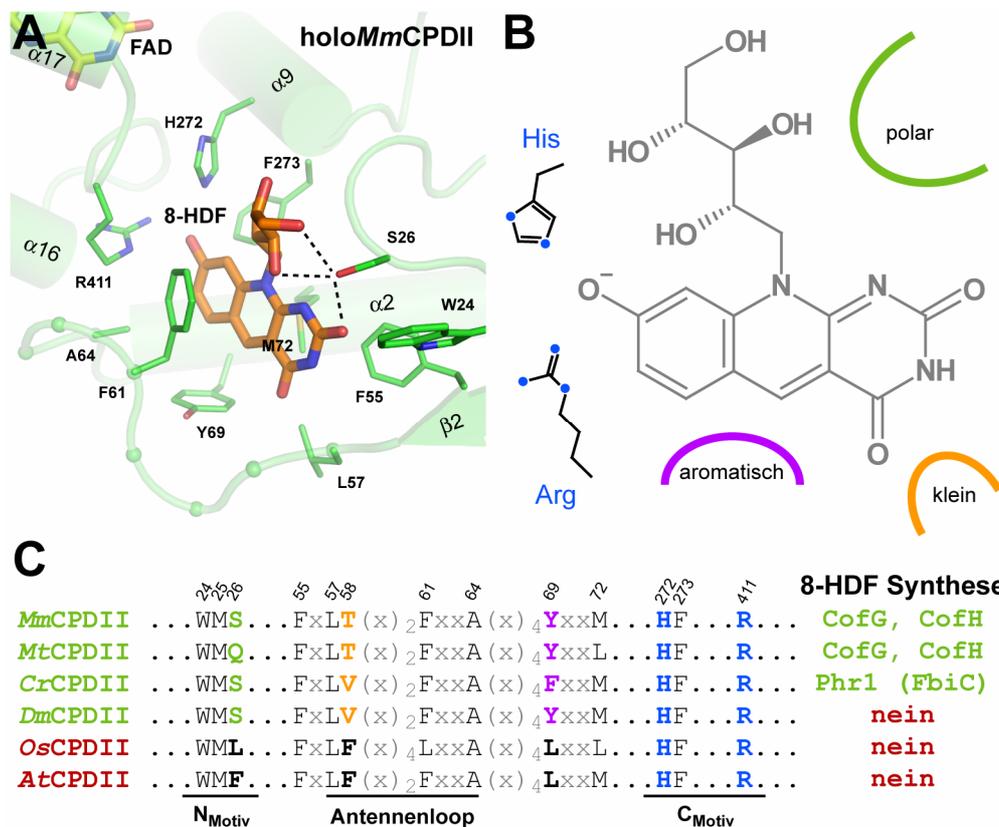


Abb. 82 FO-Bindungsmuster des Klasse II Subtyps. (A) Strukturelle Details der Antennenbindungstasche der *Mm*CPDII. (B) Schematische Darstellung des FO-Bindungsmusters. (C) Sequenzalignment von Photolyasen des Klasse II Subtyps mit dem Fokus auf die Bereiche der Antennenbindungstasche. Photolyasen des Klasse II Subtyps, die 8-HDF als Antenne binden, sind in grün hervorgehoben. Die Nummerierung der Aminosäuren entspricht der *Mm*CPDII.

Die Umgebung des 5-Deazaflavinanteils ist generell von aromatischen bzw. hydrophoben Seitenketten dominiert, die sich zum Teil auf einer konformationell flexiblen Loopregion (*Mm*CPDII: L57-A64) befinden und diesen Teil des Kofaktors in der Bindungstasche positionieren. Die Position des Ribitylrests hingegen ist vor allem durch eine einzelne polare Aminosäure (*Mm*CPDII: S26) über H-Brücken fixiert. Ein Sequenzalignment der *Mm*CPDII-Bindungstasche mit Klasse II CPD Photolyasen, die nachweislich 8-HDF als Antenne binden (*Mt*CPDII⁶⁵, *Cr*CPDII^{185,186} und *Dm*CPDII⁷⁴; grün), zeigt, dass diese Merkmale allesamt vorhanden sind (**Abb. 82C**).

Zur genauen Beschreibung der FO-Bindung des Klasse II Subtyps wurden sowohl die Bindungstaschen der *Mm*CPDII und der *Os*CPDII auf struktureller Ebene verglichen (**Abb. 83**) als auch ein Sequenzabgleich der *Os*CPDII mit der *At*CPDII durchgeführt (**Abb. 82C**, rot). Die Unterschiede der beiden pflanzlichen Photolyasen sind in den betrachteten Bereichen nicht relevant, unterscheiden sich aber deutlich von den FO-bindenden Photolyasen (**Abb. 82C**, rot). Ein geringer struktureller Unterschied betrifft den Antennenloop, der in der *Os*CPDII im Vergleich zu den übrigen Enzymen um zwei Aminosäuren verlängert ist. Dies sollte aber keinen nennenswerten Einfluss haben, da dieser Proteinbereich generell flexibel scheint. Mit diesen Informationen und dem Ergebnis, dass die *At*CPDII in der *in vivo* Rekonstitution kein 8-HDF als Antennenchromophor bindet, ist es möglich ein FO-Bindungsmuster für den Klasse II Subtyp abzuleiten (**Abb. 82B, C**). Im sogenannten N_{Motiv} folgt auf die hoch konservierten Aminosäuren „WM“ ein polarer Rest, der für die Interaktionen über H-Brücken mit dem Ribitylrest essentiell ist. Durch die großen hydrophoben Seitenketten (L bzw. F) in den pflanzlichen Photolyasen entsteht ein hydrophober *patch* in der Chromophortasche, der vermutlich eine Bindung verhindert. Das C_{Motiv} umfasst die für die Deprotonierung zuständigen basischen Aminosäuren, die unabhängig vom N_{Motiv} hoch konserviert sind. Diese funktionellen Reste des C_{Motivs} sind aber nicht für die FO-Bindung spezifisch. Im Bereich der beiden Carbonylsauerstoffe des 8-HDF ist womöglich eine kleine Seitenkette (*Mm*CPDII: T58) von Bedeutung, die allerdings auch einen hydrophoben Charakter haben kann. Zumindest unterscheiden sich Photolyasen des Klasse II Subtyps der höheren Pflanzen an dieser Stelle in Form einer großen hydrophoben Aminosäure. Ein weiterer auffälliger Unterschied ist der Bereich unterhalb des 5-Deazaflavins (*Mm*CPDII: Y69). An dieser Stelle ist für die Bindung des Chromophors eine aromatische Seitenkette von Bedeutung (**Abb. 82C** bzw. **Abb. 84**).

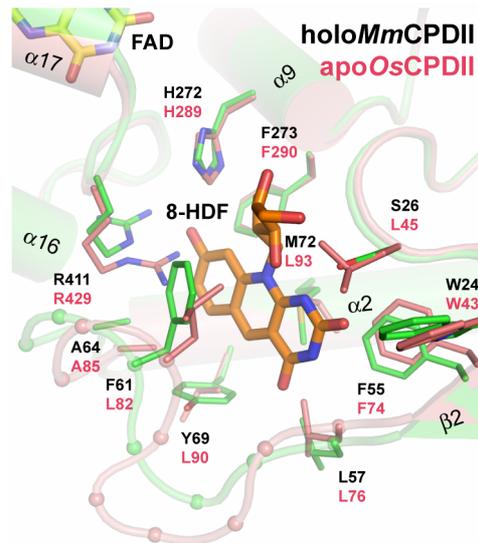


Abb. 83 Struktureller Vergleich der Antennenbindungstasche der *Mm*CPDII (grün) und *Os*CPDII (rosé). Das dargestellte 8-HDF ist Bestandteil der *holoMm*CPDII Struktur.

Die essentielle Bedeutung des N_{Motiv} mit dem polaren Rest wird indirekt auch dadurch deutlich, dass bisher in keinen heterolog in *E. coli* produzierten, pflanzlichen Photolyasen des Klasse II Subtyps ein Hinweis auf FMN oder DLZ als Antennenchromophor gefunden wurde^{80,167,182,189}. Diese Kofaktoren besitzen ebenfalls einen Ribitylrest und sind im *E. coli* Expressionssystem verfügbar. Der Austausch der polaren Komponente in eine zu den pflanzlichen Photolyasen äquivalente hydrophobe Aminosäure (z. B. Phenylalanin oder Leucin) könnte das N_{Motiv} zusätzlich als determinierenden Bereich der Bindungstasche verifizieren. Die Aufklärung des Antennenchromophors pflanzlicher Klasse II CPD Photolyasen bleibt somit weiter offen, da mit diesen Ergebnissen und dem ebenfalls bereits im Vorfeld ausgeschlossenen MTHF^{167,190} alle bisher bekannten potentiellen Kofaktoren untersucht wurden. Die Identifizierung eines neuen Chromophors kann nicht ausgeschlossen werden, was am Beispiel des *RsCryB* durch die Identifizierung des DLZ als Antenne gezeigt werden konnte²⁷.

5.9 Schlussfolgerungen für den Klasse II Subtyp

Neben der Tatsache, ob ein Kofaktor überhaupt als Antennenchromophor gebunden werden kann, stellt sich teilweise die interessante Frage nach dessen Herkunft. In den für das FO-Bindungsmuster analysierten Photolyasen stammt z. B. die *Drosophila* Photolyase aus einem Organismus, der nicht in der Lage ist, 8-HDF zu synthetisieren, da die notwendige FO-Synthase bzw. die homologen Enzyme CofG/CofH fehlen (**Abb. 82C** bzw. **Abb. 84**). Sowohl anhand der eigenen *in vivo* Rekonstitution der (6-4)-Photolyase als auch in weiteren Untersuchungen^{68,74} konnte jedoch demonstriert werden, dass das Deazaflavin als

Antennenchromophor generell in *Drosophila* Photolyasen gebunden wird. Eine Analyse der Photolyasen des gesamten Klasse II Subtyps ergab weiter, dass das FO-Bindungsmuster in einer Vielzahl von Photolyasen gefunden werden kann, obwohl die entsprechenden Organismen ebenfalls kein 8-HDF produzieren können (**Abb. 84**). Eine plausible Möglichkeit für den Ursprung des Deazaflavins wäre entweder die Aufnahme aus der Umgebung z. B. über die Nahrung oder durch einen intrinsischen Faktor, der ein prokaryotischer Organismus sein könnte und in der Lage ist, 8-HDF zu produzieren^{68,75}. An dieser Stelle muss die generelle Bedeutung eines Antennenchromophors in Photolyasen der höheren Organismen hinterfragt werden. Die Reparatur von CPD-Schäden durch Photolyasen kann prinzipiell auch ohne zusätzlichen Chromophor stattfinden. Die einzigen bekannten Daten bezüglich der Rolle einer funktionalen Antenne für die UV-Resistenz des entsprechenden Organismus sind bisher nur für die Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* berichtet worden^{185,186}. Hier kommt ein Verlust der Synthese für 8-HDF einem Verlust der Photolyase gleich. Im Laufe der Evolution haben sich außerdem redundante DNA-Reparatursysteme entwickelt¹⁹¹ bzw. es existieren Polymerasetypen, die über diese Art von UV-induzierten Schäden des Erbguts hinweg replizieren können¹⁹². Unter diesen Umständen ist eventuell die Notwendigkeit einer lichtsammelnden Antenne verloren gegangen und die weiterhin vorhandenen Photolyasen stellen eine Art *backup- oder feedback-Enzym* in Fällen starker UV-Exposition dar. Das FO-Bindungsmuster wäre somit in einem Teil der Organismen nur ein rudimentäres Merkmal. Die hoch konservierte Änderung dieses Musters in den pflanzlichen Photolyasen des Klasse II Subtyps (**Abb. 82C** bzw. **Abb. 84**) spricht dagegen eher für eine Anpassung an einen andersartigen Antennenchromophor in Kombination mit der sessilen, phototropen Lebensweise und eine nicht vorhandene Möglichkeit zur externen Akquirierung des ursprünglichen Kofaktors. Diese Hypothese steht im Einklang mit den Beobachtungen an der *A. thaliana* Mutante *uvr2-1*, deren Überlebensrate unter UV-Strahlung direkt mit der Photolyaseaktivität korreliert und somit die Notwendigkeit einer funktionellen Photolyase in Pflanzen verdeutlicht⁴². Gleichzeitig zeigen transgene Pflanzen, die die arteigene CPD-Photolyase überexprimieren, eine erhöhte Toleranz gegenüber UV-Strahlung^{43,44}.

	8-HDF	N _{Motiv}	Antennenloop	C _{Motiv}			
Euryarchaeota	Q8PYK9	+	WMS	FCLTDEFLEAGIROYEFM	HF	R	Methanosarcina mazel
	Q46F34	+	WMS	FCLVDFKFLGAIIRROYEFM	HF	R	Methanosarcina barkeri
	Q8TIS6	+	WMS	FCLLEGFLGARRRHYEFM	HF	R	Methanosarcina acetivorans
Actinobacteria	P12769	+	WMQ	FGLTDDFNPANRRHYRFL	HF	R	Methanothermobacter thermotrophicus
	Q1AY95	+	WMQ	FGLTDDGYPEANLRHYAFM	HF	R	Rubrobacter xylanophilus
	Q9XHE2	+	WMS	FNLVPAFLGAGARQYGFDM	HF	R	Chlamydomonas reinhardtii
Chlorophyta	A0T3C8	+	WMS	FNLVPPQFLGAGARSFCFM	HF	R	Dunaliella salina
	A4RV87	+	WLS	FNLTKFLGAGARQYGFDM	HF	R	Ostreococcus lucimarinus
	C1E8K0	+	WMS	FALVPEFANAGARQYCFM	HF	R	Micromonas sp.
Embryophyta (Moss)	Q33BU1	+	WMS	FSLVTEFLGAGARQYGFDM	HF	R	Chlorella pyrenoidosa
	A9SFA1	+	WMS	FNLVESFLGARHRYGFDM	HY	R	Physcomitrella patens
	Q6WS77	?	WMS	FNLVDSFLHAEARHRYGFDM	HY	R	Ptyrogramma austroamericana
Embryophyta (Fern)	B0CEA9	(+)	WMQ	FGLMADYPGSNLRHYTFM	HF	R	Acaryochloris marina
	B1LK32	(+)	LLO	FGLLDGFPEANARHYAFM	HF	R	Methylobacterium autotolerans
	B7KFK7	(+)	LMQ	FGLLDGFPEANARHYAFM	HF	R	Methylobacterium chloromethanicum
α-Proteobacteria	Q08QW0	-	WMQ	YGLMDGYPEANVRHYRFL	HF	R	Stigmatella aurantiaca
	CSXZG2	-	WMS	FCLVPSYSGGARRHYDFM	HF	R	Desulfatobium retbaense
	B3EB97	-	WMS	FILADGFLGATLROYGFDM	HF	R	Geobacter lovleyi
δ-Proteobacteria	Q6AK21	-	WVS	FCLVPPDYLGAKSSOYLEFM	HF	R	Desulfotalea psychrophila
	A1AQK0	-	WMS	FTLAPSFGLGATLROYGFDM	HF	R	Pelobacter propionicus
	B8DQ15	-	WMH	WCLANSFLGATIROYGFDM	HF	R	Desulfovibrio vulgaris
Bacteria	C71VR2	-	WMH	FCLAPDFAEATVHFNFEL	HF	R	Desulfomicrobium baculatum
	A0LN00	-	WMQ	FGLTDDGYPEANLRHYTFM	HF	R	Syntrophobacter fumaroxidans
	C4XI87	-	WMS	FALADGYPGASLRHYDFM	HF	R	Desulfovibrio magneticus
Chlorobiaceae	C6BZW8	-	WMS	FCLVPSFLGATLRHYDFM	HF	R	Desulfovibrio salexigens
	Q317B6	-	WMH	FCLVPPQFLDAGLRHYDFM	HF	R	Desulfovibrio desulfuricans
	D7AMR1	-	WMS	FCLAPRFLGATARQYDFM	HF	R	Geobacter sulfurreducens
Acidobacteria	Q2LS17	-	WMQ	FGIVDFPEANERHYEFM	HF	R	Syntrophus aciditrophicus
	B8FAV4	-	WMQ	FGLTVNYPEANRHYLFEM	HF	R	Desulfatibaculum alkenivorans
	Q0YV00	-	WMS	FTLAPSNFLNAPLRHYDFM	HF	R	Chlorobium ferrooxidans
Bacteria	A4SDN8	-	WMS	FTLASSFLGATYRQYDFM	HF	R	Prosthecochloris vibriiformis
	B3ENU2	-	WMS	FNLVPSYPEATLRHYDFM	HF	R	Chlorobium phaeobacteroides
	Q3B5H5	-	WMS	FTLSPSFLGATFRQYDFM	HF	R	Pelodictyon luteolum
Acidobacteria	Q8KF21	-	WMS	FTLSPSFLGAPMRHYDFM	HF	R	Chlorobium tepidum
	Q3AS84	-	WMS	FTLAPSFGLGAPLRHYDFM	HF	R	Chlorobium chlorochromatii
	A1BHU7	-	WMS	FALAPSFGLDAPFRHYDFM	HF	R	Chlorobium phaeobacteroides
Bacteria	C1F868	-	WMQ	FSAISNFPANLRHYVFL	HF	R	Acidobacterium capsulatum
	Q1II03	-	WMQ	FAPVPFYPHANLRHYAFM	HF	R	Koribacter versatilis
	D5EHC7	-	WMN	FCLTPHFLSASRYHYEFM	HF	R	Aminobacterium colombiense
Bacteria	D4H6T7	-	WMN	FCLIPDYPSARNQHYDFM	HF	R	Denitrovibrio acetiphilus
	D7CWM4	-	WMQ	FGLMDDYPEANARHYAFM	HF	R	Truepera radiovictrix
	Q7ULU5	-	WMH	HGLSEKYPYASDRHYAFI	HY	R	Rhodopirellula baltica
Embryophyta	B2A7J6	-	WMQ	FGLYEQFPYASSRHYQFM	HF	R	Natranaerobium thermophilus
	Q6FGA2	-	WML	FALFPRLLSARRRQLGFL	HF	R	Oryza sativa
	Q9SB00	-	WMP	FNLFDQFLGAKARQLGFM	HF	R	Arabidopsis thaliana
Embryophyta	A5BUB1	-	WMP	FNLFDQFLGAKARQLGFM	HF	R	Vitis vinifera
	B1B538	-	WMP	FNLPHFLGAKSRHLGFM	HF	R	Glycine max
	B4F9R2	-	WML	FTLFPRLLGAHLRQLGFL	HF	R	Zea mays
Embryophyta	B9N3L7	-	WMP	FNLFDQFLGAKARQLGFM	HF	R	Populus trichocarpa
	B9RBT7	-	WMP	FNLFDQFLGAKARQLGFM	HF	R	Ricinus communis
	Q71BI8	-	WML	FNLFDAPFKGAKARHLGFM	HF	R	Stellaria longipes
Embryophyta	Q84JX2	-	WMP	FNLFDGFKGANARQLGFM	HF	R	Spinacia oleracea
	Q9AVI6	-	WMP	FNLFDRLGAKSRQLGFM	HF	R	Cucumis sativus
	Q28811	-	WMS	FCLAPCFLGATIRHYDFM	HF	R	Potorous tridactylus
Cephalochordata	Q28464	-	WMS	FCLAPCFLGATIRHYDFM	HF	R	Monodelphis domestica
	C3WY3	-	WMS	FCLVPKFLDANIRHYGFDM	HF	R	Branchiostoma floridae
	Q7SYI9	-	WMS	FCLVPKFLDATTYRQYAFM	HA	C	Danio rerio
Osteichthyes	P34205	-	WMS	FCLVPRYLDATTYRQYAFM	HT	C	Carassius auratus
	Q3CZL7	-	WMS	FCLVPKFLDATTIRHYGFDM	HF	R	Xenopus laevis
	Reptilia xp_003227011.1	-	WMS	FCLVPKFLDATTIRHYGFDM	HF	R	Anolis carolinensis
Aves	xp_422729.1	-	WMC	FCLVPAFLDATTIRHYGFDM	HF	M	Gallus gallus
	GLN787	-	WMC	FCLVPTFLDATTIRHYGFDM	HF	M	Meleagris gallopavo
	E9HAM9	-	WMS	FCLVPTFLGATIRQYGFDM	HF	R	Daphnia pulex
Crustacea	Q7JY97	-	WMS	FCLVPKFLNATTIRHYKFM	HF	R	Drosophila melanogaster
	Q17KA3	-	WMS	FSLVPKFLDATTIRHYKFM	HF	R	Aedes aegypti
	Q7Q9T5	-	WMS	FNLVPKFLDATTIRHYKFM	HF	R	Anopheles gambiae
Lepidoptera	G6DD06	-	WMS	FCLIAKYLDSAVRQYHFL	HF	R	Danaus plexippus
	H9K9F9	-	WMP	FCLISBFLNASIRYKFL	HF	C	Apis mellifera
	Hymenoptera xp_003398095.1	-	WMP	FCIMPSEFLNASIRYKFL	HF	C	Bombus terrestris
Hymenoptera	xp_001603285.2	-	WMP	FCILPKFLDATTIRHYKFL	HF	R	Nasonia vitripennis
	xp_001949151.1	-	WTF	FCRLKQFLDCLSRHYKHI	HF	R	Acyrtosiphon pisum
	A5IZQ2	-	WMS	FCLVTFWCNAGMRQYHFL	HF	R	Spodoptera litura granulovirus
dsDNA viruses	B3TZ20	-	WMS	FCLTSSFLNASLRQYDFL	HF	R	Ampelophaga rubiginosa nucleopolyhedrovirus
	Q4KT08	-	WMS	FCMTKSFNNASMRQYHFL	HF	R	Chrysodeixis chalcites nucleopolyhedrovirus
	Q9YVK7	-	WCV	ICLVPEFLNATTIRQYDFM	HF	R	Melanoplus sanguinipes entomopoxvirus

Abb. 84 Ergebnis der Suche nach potentiellen FO-bindenden Photolyasen des Klasse II Subtyps. Zur besseren Abgrenzung sind ebenfalls Photolyasen gezeigt, die nach dem FO-Bindungsmuster das Deazaflavin nicht als Antenne binden können (rot). Die Spalte „8-HDF“ beschreibt das Vorkommen im entsprechenden Organismus: +=ja, ?=unbekannt, (?)=ja (im Phylum), -=nein.

Unter der Annahme, dass in Photolyasen höherer Pflanzen kein 8-HDF als Antennenchromophor vorkommt, stellt sich die Frage, zu welchem Zeitpunkt der stammesgeschichtlichen Entwicklung¹⁹³ der Verlust dieses Kofaktors und die Evolution einer differenzierten Antennenbindungstasche stattgefunden hat. Interessanterweise zeigt die in **Abb. 84** dargestellte Analyse des Klasse II Subtyps, dass die Chlorophyta (Grünalgen), sowohl das FO-Bindungsmotiv als auch entsprechende Enzyme zur Synthese des Deazaflavins besitzen. Die generell zu den Chlorobionta gehörenden Chlorophyta bilden zusammen mit den Glaucobionta und Rhodobionta (Rotalgen) die drei Linien, die auf die Entstehung der

ersten pflanzlichen Zelle vor mehr als zwei Milliarden Jahren durch eine primäre Endocytobiose mit einem photoautotrophen Bakterium (Cyanobacteriota) zurückgehen. Die Chlorophyta, zu denen auch *C. reinhardtii* mit der FO-bindenden Klasse II CPD Photolyase gehört, bilden wiederum eine Schwestergruppe zu den Streptophyta, die unter anderem die Landpflanzen (Embryophyta) enthalten. Unter Berücksichtigung der Verbreitung des Deazaflavins innerhalb der Chlorophyta kann somit vermutet werden, dass zu diesem frühen stammesgeschichtlichen Zeitpunkt das 8-HDF der mögliche Antennenchromophor des pflanzlichen Klasse II Subtyps war. In den vor ca. 450 Millionen Jahren auftretenden Landpflanzen (Embryophyta), zu denen Moose, Farne und Samenpflanzen (Spermatophytina) gehören, findet sich das FO-Bindungsmotiv in den Photolyasen und die Synthese von 8-HDF noch in der ursprünglichsten Entwicklungslinie, den Moosen, am Beispiel von *Physcomitrella patens* wieder. In den Photolyasen des Farns *Pityrogramma austroamericana* kann hingegen nur noch der Hinweis auf das FO-Bindungsmotiv nachgewiesen werden. Zu den vor ca. 370 Millionen Jahren entstandenen Samenpflanzen (Spermatophytina) gehören die Bedecktsamer (Angiospermen), die mit mindestens 250000 Arten die bei weitem artenreichste Pflanzengruppe darstellt und deren erstmaliges Auftreten durch fossile Funde auf vor ca. 140 Millionen Jahren datiert wird. Sämtliche in **Abb. 84** analysierten Photolyasen des Klasse II Subtyps gehören zu den Angiospermen und besitzen weder Enzyme zur Synthese des Deazaflavins noch das FO-Bindungsmotiv. Anhand dieser Daten kann man die Hypothese aufstellen, dass die Synthese und somit auch die Funktion des Deazaflavins 8-HDF als Antennenchromophor in pflanzlichen Photolyasen im Laufe der stammesgeschichtlichen Entwicklung zwischen den Chlorophyta und den Spermatophytina verloren gegangen ist.

Die Existenz eines andersartigen Antennenchromophor belegen allerdings die Aktionspektren der nativ aufgereinigten Photolyasen aus der Mohrenhirse bzw. der Gurke. Diese beiden Enzyme zeigen die höchste CPD-Reparaturaktivität bei 400 nm¹⁹⁰ und unterscheiden sich somit von der heterolog in *E. coli* produzierten apoAtCPDII, die die höchste Aktivität bei 366 nm aufweist, was wiederum dem Absorptionsmaximum des katalytischen Kofaktors im aktiven, vollreduzierten Zustand FADH⁻ entspricht¹⁶⁷. Dieser Unterschied spricht eindeutig für einen vorhandenen Antennenchromophor. Dass dieser weder MTHF noch 8-HDF ist, wird ebenfalls durch den Vergleich mit den Aktionsspektren der MTHF- (*E. coli*, $\lambda_{\max} \sim 380$ nm) bzw. FO-bindenden (*A. nidulans*, $\lambda_{\max} \sim 440$ nm) Klasse I CPD Photolyasen, deren Maxima in etwa dem jeweiligen Absorptionsmaxima entsprechen, deutlich⁵. Die Relevanz eines Antennenchromophor zur Erweiterung des Aktionsspektrums der Photolyase wird für die

sessile, phototrophe Lebensweise der Pflanzen auch dadurch ersichtlich, dass das Sonnenlicht zwischen 430-450 nm einen zwei- bis dreifach höheren Flux an Photonen im Vergleich zu dem Bereich zwischen 370-390 nm besitzt¹⁹⁴. Dies würde für eine Photolyase, die nur über den katalytischen Kofaktor im aktiven, vollreduzierten Zustand FADH⁻ verfügt, eine deutlich schlechtere Photoreaktivierung unter physiologischen Bedingungen bedeuten. Einen konkreten Hinweis auf den molekularen Charakter der Antenne in pflanzlichen Photolyasen gibt es noch nicht. Bisher konnten nur die bereits in anderen Photolyasen identifizierten Kofaktoren ausgeschlossen werden. Wie bereits erwähnt stellen die Angiospermen nicht nur die artenreichste, sondern auch die vielfältigste Pflanzengruppe dar. Dies spiegelt sich auch in ihrer Vielfalt an sekundären Pflanzenstoffen wieder, unter denen besonders die Flavonoide zahlreich vertreten sind¹⁹³. Diese Moleküle sind in *E. coli* nicht vorhanden und könnten somit – vergleichbar mit dem 8-HDF – nicht als Antennenchromophor in einer heterolog produzierten pflanzlichen Photolyase eingebaut werden. Die Etablierung eines artifiziellen Synthesewegs gestaltet sich allerdings hier weitaus komplexer. Die Identifizierung der lichtsammelnden Antenne könnte daher auf biochemischer Ebene durch die Aufreinigung nativer Photolyasen und einer anschließenden spektroskopischen bzw. massenspektrometrischen Charakterisierung erfolgen. In diesem Zusammenhang ist allerdings verwunderlich, dass bisher mit dieser Methodik noch keine aufschlussreichen Hinweise auf potentielle Kofaktoren gesammelt werden konnten. Eine Ursache dafür könnte in der Instabilität des Moleküls liegen, so dass es für diese Art der Analyse nicht zugänglich ist. Durch die strukturellen Informationen der Antennenbindungstasche der archaealen *MmCPDII* und der bekannten Unterschiede zu den pflanzlichen Photolyasen könnte ein *in silico* Ansatz in Form des sog. *molecular docking* erfolgsversprechend sein. Zu diesem Zweck würde man die archaeale Bindungstasche in eine pflanzliche modifizieren und mit dieser ein *in silico screening* gegen relevante Biomoleküle (z. B. Flavonoide) durchführen. Potentielle Kandidaten könnten – bei Verfügbarkeit – im Anschluss durch die Methode der *in vitro* Rekonstitution oder auf proteinkristallographischer Ebene z. B. durch ein *soaking* von apoKristallen weiter analysiert werden. Die Entdeckung eines Antennenchromophors pflanzlicher Photolyasen des Klasse II Subtyps wäre ein weiterer Meilenstein in der Erforschung der Phr/Cry-Familie.

6 Fazit & Ausblick

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit liefern einen wesentlichen Beitrag zur funktionellen und strukturellen Charakterisierung des Klasse II Subtyps der Phr/Cry-Familie. Durch die ersten Kristallstrukturen einer Klasse II CPD Photolyase allein und im Komplex mit doppelsträngiger, CPD-geschädigter DNA wurden die Struktur-Funktion Beziehungen dieser phylogenetisch distinkten Gruppe aufgeklärt und eröffnen somit neue Forschungsschwerpunkte. Durch Experimente mit *E. coli*-Stämmen, die eine CPD-Reparaturdefizienz besitzen, könnte die Relevanz des Elektronentransferwegs *in vivo* untersucht werden, und die Ergebnisse würden eventuell zur Klärung der Frage nach dem intrinsischen Elektronendonator beisteuern. Vergleichbare Komplementierungsansätze mit der *EcCPDI* deuteten nämlich bereits auf überraschende Ergebnisse hin⁸⁵. Ein spannender Schwerpunkt ist die Untersuchung der Reparatur durch Photolyasen in eukaryotischen Organismen. Die Hypothese, dass der Klasse II Subtyp aufgrund des fehlenden, voluminösen C-Terminus einen verbesserten Zugang zu CPD-Schäden außerhalb des Nukleosoms haben könnte und sich deshalb in den Eukarya durchgesetzt hat, muss in Experimenten bewiesen werden^{81,178}. Ein erster Schritt in diesem Zusammenhang wäre die Etablierung einer Methode zum Nachweis der Reparatur von CPD-Schäden in Nukleosomen durch Photolyasen. Generell wäre die Aufklärung des gesamten Reparaturmechanismus, wie er für den Klasse I Subtyp bereits gezeigt worden ist^{76,93,94}, ein wichtiger Baustein für das Verständnis der Funktion der Klasse II CPD Photolyasen, die sich in der Struktur ihrer funktionellen Merkmale hervorheben. Aus biotechnologischer Sicht kann durch die Kenntnis der strukturellen Besonderheiten des Klasse II Subtyps und der vermittelten, erniedrigten⁴² bzw. erhöhten^{43,44,45,195} Widerstandsfähigkeit gegenüber UV-Strahlung die Forschung in zweierlei Richtung gehen. Sowohl das Design von Klasse II-spezifischen Inhibitoren als auch die Entwicklung von UV-resistenteren Agrarpflanzen, wie es die Natur am Beispiel unterschiedlicher Reissorten vorgemacht hat^{40,41}, wäre von (agrar-)wirtschaftlichen Interesse. Das Wissen über die strukturellen Details der Antennenbindungstasche des Klasse II Subtyps ermöglicht außerdem neue Ansätze zur Identifizierung des pflanzlichen, lichtsammelnden Kofaktors. Mit Hilfe strukturbasierter *in silico* Methoden wie z. B. dem *molecular docking* kann es gelingen, den bislang kryptischen Antennenchromophor zu entschlüsseln. Die in dieser Arbeit etablierte Methode zur *in vivo* Rekonstitution von Photolyasen mit 8-HDF im Expressionssystem *E. coli* kann nicht nur für die Untersuchung anderer Mitglieder der diversen Phr/Cry-Familie verwendet werden, sondern bietet auch die Möglichkeit, Flavin-bindende Photorezeptoren mit Deazaflavinen zu modifizieren. Hierzu könnte diese artifizielle Biosynthese um weitere Schritte erweitert werden, um vollkommen neuartige chromogene Kofaktoren zu erhalten und die spektralen Eigenschaften der Flavoproteine nach Belieben modulieren zu können. Eine geeignete Plattform für diese Ansätze ist bereits am Beispiel der *in vivo* Rekonstitution des Flavin-bindenden Dodecins bzw. an Photorezeptoren der BLUF- und LOV-Familie vorgestellt worden¹⁹⁶.

7 Literatur

1. Matsumura, Y. & Ananthaswamy, H. N. (2004). Toxic effects of ultraviolet radiation on the skin. *Toxicol Appl Pharmacol* **195**, 298-308.
2. Tornaletti, S. & Pfeifer, G. P. (1996). UV damage and repair mechanisms in mammalian cells. *BioEssays* **18**, 221-8.
3. Ravanat, J. L., Douki, T. & Cadet, J. (2001). Direct and indirect effects of UV radiation on DNA and its components. *J Photochem Photobiol B* **63**, 88-102.
4. Setlow, R. B. & Carrier, W. L. (1966). Pyrimidine dimers in ultraviolet-irradiated DNA's. *J Mol Biol* **17**, 237-54.
5. Sancar, A. (2003). Structure and function of DNA photolyase and cryptochrome blue-light photoreceptors. *Chem Rev (Washington, DC, U S)* **103**, 2203-37.
6. Kelner, A. (1949). Effect of Visible Light on the Recovery of *Streptomyces griseus* Conidia from Ultra-violet Irradiation Injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* **35**, 73-9.
7. Kelner, A. (1949). Photoreactivation of Ultraviolet-Irradiated *Escherichia coli*, with Special Reference to the Dose-Reduction Principle and to Ultraviolet-Induced Mutation. *J Bacteriol* **58**, 511-22.
8. Rupert, C. S. (1960). Photoreactivation of transforming DNA by an enzyme from bakers' yeast. *J Gen Physiol* **43**, 573-95.
9. Sancar, G. B. (2000). Enzymatic photoreactivation: 50 years and counting. *Mutat Res* **451**, 25-37.
10. Setlow, J. K. (1964). Effects of UV on DNA: correlations among biological changes, physical changes and repair mechanisms. *Photochem Photobiol* **3**, 405-413.
11. Cook, J. S. (1967). Direct demonstration of the monomerization of thymine-containing dimers in U.V.-irradiated DNA by yeast photoreactivating enzyme and light. *Photochem Photobiol* **6**, 97-101.
12. Minato, S. & Werbin, H. (1972). Excitation and fluorescence spectra of the chromophore associated with the DNA-photoreactivating enzyme from the blue-green alga *Anacystis nidulans*. *Photochem Photobiol* **15**, 97-100.
13. Pearlman, D. A., Holbrook, S. R., Pirkle, D. H. & Kim, S. H. (1985). Molecular models for DNA damaged by photoreaction. *Science* **227**, 1304-8.
14. Husain, I., Griffith, J. & Sancar, A. (1988). Thymine dimers bend DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 2558-62.
15. Park, H., Zhang, K., Ren, Y., Nadji, S., Sinha, N., Taylor, J. S. & Kang, C. (2002). Crystal structure of a DNA decamer containing a cis-syn thymine dimer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 15965-70.
16. Ozturk, N., Kao, Y. T., Selby, C. P., Kavakli, I. H., Partch, C. L., Zhong, D. & Sancar, A. (2008). Purification and characterization of a type III photolyase from *Caulobacter crescentus*. *Biochemistry* **47**, 10255-61.
17. Chaves, I., Pokorny, R., Byrdin, M., Hoang, N., Ritz, T., Brettel, K., Essen, L. O., van der Horst, G. T., Batschauer, A. & Ahmad, M. (2011). The cryptochromes: blue light photoreceptors in plants and animals. *Annu Rev Plant Biol* **62**, 335-64.
18. Lin, C. & Todo, T. (2005). The cryptochromes. *Genome Biology* **6**, Article 220.
19. Lin, C. & Shalitin, D. (2003). Cryptochrome structure and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol* **54**, 469-96.
20. Partch, C. L. & Sancar, A. (2005). Photochemistry and photobiology of cryptochrome blue-light photopigments: the search for a photocycle. *Photochem Photobiol* **81**, 1291-304.
21. Brudler, R., Hitomi, K., Daiyasu, H., Toh, H., Kucho, K., Ishiura, M., Kanehisa, M., Roberts, V. A., Todo, T., Tainer, J. A. & Getzoff, E. D. (2003). Identification of a new cryptochrome class. Structure, function, and evolution. *Mol Cell* **11**, 59-67.

22. Hitomi, K., Okamoto, K., Daiyasu, H., Miyashita, H., Iwai, S., Toh, H., Ishiura, M. & Todo, T. (2000). Bacterial cryptochrome and photolyase: characterization of two photolyase-like genes of *Synechocystis* sp. PCC6803. *Nucleic Acids Res* **28**, 2353-62.
23. Worthington, E. N., Kavakli, I. H., Berrocal-Tito, G., Bondo, B. E. & Sancar, A. (2003). Purification and characterization of three members of the photolyase/cryptochrome family blue-light photoreceptors from *Vibrio cholerae*. *J Biol Chem* **278**, 39143-54.
24. Selby, C. P. & Sancar, A. (2006). A cryptochrome/photolyase class of enzymes with single-stranded DNA-specific photolyase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 17696-700.
25. Pokorny, R., Klar, T., Hennecke, U., Carell, T., Batschauer, A. & Essen, L. O. (2008). Recognition and repair of UV lesions in loop structures of duplex DNA by DASH-type cryptochrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 21023-7.
26. Hendrischk, A. K., Fruhwirth, S. W., Moldt, J., Pokorny, R., Metz, S., Kaiser, G., Jager, A., Batschauer, A. & Klug, G. (2009). A cryptochrome-like protein is involved in the regulation of photosynthesis genes in *Rhodobacter sphaeroides*. *Mol Microbiol* **74**, 990-1003.
27. Geisselbrecht, Y., Fruhwirth, S., Schroeder, C., Pierik, A. J., Klug, G. & Essen, L. O. (2012). CryB from *Rhodobacter sphaeroides*: a unique class of cryptochromes with new cofactors. *EMBO Rep* **13**, 223-9.
28. Sauguet, L., Klinge, S., Perera, R. L., Maman, J. D. & Pellegrini, L. (2010). Shared active site architecture between the large subunit of eukaryotic primase and DNA photolyase. *PLoS One* **5**, e10083.
29. Kanai, S., Kikuno, R., Toh, H., Ryo, H. & Todo, T. (1997). Molecular evolution of the photolyase-blue-light photoreceptor family. *J Mol Evol* **45**, 535-48.
30. Falciatore, A. & Bowler, C. (2005). The evolution and function of blue and red light photoreceptors. *Current Topics in Developmental Biology* **68**, 317-50.
31. Lucas-Lledo, J. I. & Lynch, M. (2009). Evolution of mutation rates: phylogenomic analysis of the photolyase/cryptochrome family. *Mol Biol Evol* **26**, 1143-53.
32. Yasui, A., Eker, A. P., Yasuhira, S., Yajima, H., Kobayashi, T., Takao, M. & Oikawa, A. (1994). A new class of DNA photolyases present in various organisms including aplacental mammals. *EMBO J* **13**, 6143-51.
33. Todo, T. (1999). Functional diversity of the DNA photolyase/blue light receptor family. *Mutat Res* **434**, 89-97.
34. O'Connor, K. A., McBride, M. J., West, M., Yu, H., Trinh, L., Yuan, K., Lee, T. & Zusman, D. R. (1996). Photolyase of *Myxococcus xanthus*, a Gram-negative eubacterium, is more similar to photolyases found in Archaea and "higher" eukaryotes than to photolyases of other eubacteria. *J Biol Chem* **271**, 6252-9.
35. Bennett, C. J., Webb, M., Willer, D. O. & Evans, D. H. (2003). Genetic and phylogenetic characterization of the type II cyclobutane pyrimidine dimer photolyases encoded by Leporipoxviruses. *Virology* **315**, 10-9.
36. Biernat, M. A., Ros, V. I., Vlak, J. M. & van Oers, M. M. (2011). Baculovirus cyclobutane pyrimidine dimer photolyases show a close relationship with lepidopteran host homologues. *Insect Mol Biol* **20**, 457-64.
37. Petersen, J. L., Lang, D. W. & Small, G. D. (1999). Cloning and characterization of a class II DNA photolyase from *Chlamydomonas*. *Plant Mol Biol* **40**, 1063-71.
38. Ahmad, M., Jarillo, J. A., Klimczak, L. J., Landry, L. G., Peng, T., Last, R. L. & Cashmore, A. R. (1997). An enzyme similar to animal type II photolyases mediates photoreactivation in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **9**, 199-207.
39. Slamovits, C. H. & Keeling, P. J. (2004). Class II photolyase in a microsporidian intracellular parasite. *J Mol Biol* **341**, 713-721.

40. Hidema, J. & Kumagai, T. (2006). Sensitivity of rice to ultraviolet-B radiation. *Ann Bot* **97**, 933-42.
41. Iwamatsu, Y., Aoki, C., Takahashi, M., Teranishi, M., Ding, Y., Sun, C., Kumagai, T. & Hidema, J. (2008). UVB sensitivity and cyclobutane pyrimidine dimer (CPD) photolyase genotypes in cultivated and wild rice species. *Photochem Photobiol Sci* **7**, 311-20.
42. Landry, L. G., Stapleton, A. E., Lim, J., Hoffman, P., Hays, J. B., Walbot, V. & Last, R. L. (1997). An *Arabidopsis* photolyase mutant is hypersensitive to ultraviolet-B radiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 328-32.
43. Hidema, J., Taguchi, T., Ono, T., Teranishi, M., Yamamoto, K. & Kumagai, T. (2007). Increase in CPD photolyase activity functions effectively to prevent growth inhibition caused by UVB radiation. *Plant J* **50**, 70-79.
44. Kaiser, G., Kleiner, O., Beisswenger, C. & Batschauer, A. (2009). Increased DNA repair in *Arabidopsis* plants overexpressing CPD photolyase. *Planta* **230**, 505-515.
45. Schul, W., Jans, J., Rijksen, Y. M. A., Klemann, K. H. M., Eker, A. P. M., de Wit, J. N., O., Nakajima, S., Yasui, A., Hoeijmakers, J. H. J. & van der Horst, G. T. J. (2002). Enhanced repair of cyclobutane pyrimidine dimers and improved UV resistance in photolyase transgenic mice. *EMBO J* **21**, 4719-4729.
46. Rao, S. T. & Rossmann, M. G. (1973). Comparison of super-secondary structures in proteins. *J Mol Biol* **76**, 241-56.
47. Kleine, T., Lockhart, P. & Batschauer, A. (2003). An *Arabidopsis* protein closely related to *Synechocystis* cryptochrome is targeted to organelles. *Plant J* **35**, 93-103.
48. Klar, T., Pokorny, R., Moldt, J., Batschauer, A. & Essen, L. O. (2007). Cryptochrome 3 from *Arabidopsis thaliana*: structural and functional analysis of its complex with a folate light antenna. *J Mol Biol* **366**, 954-64.
49. Partch, C. L., Clarkson, M. W., Ozgur, S., Lee, A. L. & Sancar, A. (2005). Role of structural plasticity in signal transduction by the cryptochrome blue-light photoreceptor. *Biochemistry* **44**, 3795-805.
50. Zoltowski, B. D., Vaidya, A. T., Top, D., Widom, J., Young, M. W. & Crane, B. R. (2011). Structure of full-length *Drosophila* cryptochrome. *Nature* **480**, 396-9.
51. Schroeder, C. (2009). Studien zur Konversion photochemischer und funktioneller Eigenschaften verschiedener Blaulichtrezeptoren. *Dissertation, Philipps-Universität Marburg*.
52. Hitomi, K., DiTacchio, L., Arvai, A. S., Yamamoto, J., Kim, S. T., Todo, T., Tainer, J. A., Iwai, S., Panda, S. & Getzoff, E. D. (2009). Functional motifs in the (6-4) photolyase crystal structure make a comparative framework for DNA repair photolyases and clock cryptochromes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 6962-7.
53. Payne, G., Wills, M., Walsh, C. & Sancar, A. (1990). Reconstitution of *Escherichia coli* photolyase with flavins and flavin analogues. *Biochemistry* **29**, 5706-11.
54. Xu, L., Mu, W., Ding, Y., Luo, Z., Han, Q., Bi, F., Wang, Y. & Song, Q. (2008). Active site of *Escherichia coli* DNA photolyase: Asn378 is crucial both for stabilizing the neutral flavin radical cofactor and for DNA repair. *Biochemistry* **47**, 8736-43.
55. Lin, C., Robertson, D. E., Ahmad, M., Raibekas, A. A., Jorns, M. S., Dutton, P. L. & Cashmore, A. R. (1995). Association of flavin adenine dinucleotide with the *Arabidopsis* blue light receptor CRY1. *Science* **269**, 968-70.
56. Brautigam, C. A., Smith, B. S., Ma, Z., Palnitkar, M., Tomchick, D. R., Machius, M. & Deisenhofer, J. (2004). Structure of the photolyase-like domain of cryptochrome 1 from *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 12142-7.
57. Kottke, T., Batschauer, A., Ahmad, M. & Heberle, J. (2006). Blue-light-induced changes in *Arabidopsis* cryptochrome 1 probed by FTIR difference spectroscopy. *Biochemistry* **45**, 2472-9.

58. Berndt, A., Kottke, T., Breitkreuz, H., Dvorsky, R., Hennig, S., Alexander, M. & Wolf, E. (2007). A novel photoreaction mechanism for the circadian blue light photoreceptor *Drosophila* cryptochrome. *J Biol Chem* **282**, 13011-21.
59. Hunter, S., Jones, P., Mitchell, A., Apweiler, R., Attwood, T. K., Bateman, A., Bernard, T., Binns, D., Bork, P., Burge, S., de Castro, E., Coggill, P., Corbett, M., Das, U., Daugherty, L., Duquenne, L., Finn, R. D., Fraser, M., Gough, J., Haft, D., Hulo, N., Kahn, D., Kelly, E., Letunic, I., Lonsdale, D., Lopez, R., Madera, M., Maslen, J., McAnulla, C., McDowall, J., McMenamin, C., Mi, H., Mutowo-Muellenet, P., Mulder, N., Natale, D., Orengo, C., Pesseat, S., Punta, M., Quinn, A. F., Rivoire, C., Sangrador-Vegas, A., Selengut, J. D., Sigrist, C. J., Scheremetjew, M., Tate, J., Thimmajananathan, M., Thomas, P. D., Wu, C. H., Yeats, C. & Yong, S. Y. (2011). InterPro in 2011: new developments in the family and domain prediction database. *Nucleic Acids Res* **40**, D306-12.
60. Johnson, J. L., Hamm-Alvarez, S., Payne, G., Sancar, G. B., Rajagopalan, K. V. & Sancar, A. (1988). Identification of the second chromophore of *Escherichia coli* and yeast DNA photolyases as 5,10-methenyltetrahydrofolate. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 2046-50.
61. Park, H. W., Kim, S. T., Sancar, A. & Deisenhofer, J. (1995). Crystal structure of DNA photolyase from *Escherichia coli*. *Science* **268**, 1866-72.
62. Fujihashi, M., Numoto, N., Kobayashi, Y., Mizushima, A., Tsujimura, M., Nakamura, A., Kawarabayasi, Y. & Miki, K. (2007). Crystal structure of archaeal photolyase from *Sulfolobus tokodaii* with two FAD molecules: implication of a novel light-harvesting cofactor. *J Mol Biol* **365**, 903-10.
63. Ueda, T., Kato, A., Kuramitsu, S., Terasawa, H. & Shimada, I. (2005). Identification and characterization of a second chromophore of DNA photolyase from *Thermus thermophilus* HB27. *J Biol Chem* **280**, 36237-43.
64. Klar, T., Kaiser, G., Hennecke, U., Carell, T., Batschauer, A. & Essen, L. O. (2006). Natural and non-natural antenna chromophores in the DNA photolyase from *Thermus thermophilus*. *ChemBiochem* **7**, 1798-806.
65. Kiener, A., Husain, I., Sancar, A. & Walsh, C. (1989). Purification and properties of *Methanobacterium thermoautotrophicum* DNA photolyase. *J Biol Chem* **264**, 13880-7.
66. Eker, A. P., Kooiman, P., Hessels, J. K. & Yasui, A. (1990). DNA photoreactivating enzyme from the cyanobacterium *Anacystis nidulans*. *J Biol Chem* **265**, 8009-15.
67. Tamada, T., Kitadokoro, K., Higuchi, Y., Inaka, K., Yasui, A., de Ruiter, P. E., Eker, A. P. & Miki, K. (1997). Crystal structure of DNA photolyase from *Anacystis nidulans*. *Nature Structural Biology* **4**, 887-91.
68. Glas, A. F., Maul, M. J., Cryle, M., Barends, T. R., Schneider, S., Kaya, E., Schlichting, I. & Carell, T. (2009). The archaeal cofactor F0 is a light-harvesting antenna chromophore in eukaryotes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 11540-5.
69. Kim, S. T., Heelis, P. F., Okamura, T., Hirata, Y., Mataga, N. & Sancar, A. (1991). Determination of rates and yields of interchromophore (folate---flavin) energy transfer and intermolecular (flavin---DNA) electron transfer in *Escherichia coli* photolyase by time-resolved fluorescence and absorption spectroscopy. *Biochemistry* **30**, 11262-70.
70. Kim, S. T., Heelis, P. F. & Sancar, A. (1992). Energy transfer (deazaflavin-->FADH2) and electron transfer (FADH2-->T <> T) kinetics in *Anacystis nidulans* photolyase. *Biochemistry* **31**, 11244-8.
71. Walsh, C. (1986). Naturally occurring 5-deazaflavin coenzymes: biological redox roles. *Acc Chem Res* **19**, 216-221.

72. Isabelle, D., Simpson, D. R. & Daniels, L. (2002). Large-scale production of coenzyme F420-5,6 by using *Mycobacterium smegmatis*. *Appl Environ Microbiol* **68**, 5750-5.
73. Graham, D. E., Xu, H. & White, R. H. (2003). Identification of the 7,8-didemethyl-8-hydroxy-5-deazariboflavin synthase required for coenzyme F(420) biosynthesis. *Arch Microbiol* **180**, 455-64.
74. Selby, C. P. & Sancar, A. (2011). The second chromophore in *Drosophila* photolyase/cryptochrome family photoreceptors. *Biochemistry* **51**, 167-71.
75. van Oers, M. M., Lampen, M. H., Bajek, M. I., Vlak, J. M. & Eker, A. P. M. (2008). Active DNA photolyase encoded by a baculovirus from the insect *Chrysodeixis chalcites*. *DNA Repair* **7**, 1309-1318.
76. Brettel, K. & Byrdin, M. (2010). Reaction mechanisms of DNA photolyase. *Curr Opin Struct Biol* **20**, 693-701.
77. Byrdin, M., Lukacs, A., Thiagarajan, V., Eker, A. P., Brettel, K. & Vos, M. H. (2009). Quantum yield measurements of short-lived photoactivation intermediates in DNA photolyase: toward a detailed understanding of the triple tryptophan electron transfer chain. *J Phys Chem A* **114**, 3207-14.
78. Weber, S., Kay, C. W., Mogling, H., Mobius, K., Hitomi, K. & Todo, T. (2002). Photoactivation of the flavin cofactor in *Xenopus laevis* (6-4) photolyase: observation of a transient tyrosyl radical by time-resolved electron paramagnetic resonance. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 1319-22.
79. Aubert, C., Mathis, P., Eker, A. P. & Brettel, K. (1999). Intraprotein electron transfer between tyrosine and tryptophan in DNA photolyase from *Anacystis nidulans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 5423-7.
80. Okafuji, A., Biskup, T., Hitomi, K., Getzoff, E. D., Kaiser, G., Batschauer, A., Bacher, A., Hidema, J., Teranishi, M., Yamamoto, K., Schleicher, E. & Weber, S. (2010). Light-induced activation of class II cyclobutane pyrimidine dimer photolyases. *DNA Repair* **9**, 495-505.
81. Kiontke, S., Geisselbrecht, Y., Pokorny, R., Carell, T., Batschauer, A. & Essen, L. O. (2011). Crystal structures of an archaeal class II DNA photolyase and its complex with UV-damaged duplex DNA. *EMBO J* **30**, 4437-49.
82. Kort, R., Komori, H., Adachi, S., Miki, K. & Eker, A. (2004). DNA apophotolyase from *Anacystis nidulans*: 1.8 Å structure, 8-HDF reconstitution and X-ray-induced FAD reduction. *Acta Crystallogr, Sect D: Biol Crystallogr* **60**, 1205-13.
83. Li, Y. F., Heelis, P. F. & Sancar, A. (1991). Active site of DNA photolyase: tryptophan-306 is the intrinsic hydrogen atom donor essential for flavin radical photoreduction and DNA repair in vitro. *Biochemistry* **30**, 6322-9.
84. Kim, S. T., Sancar, A., Essenmacher, C. & Babcock, G. T. (1993). Time-resolved EPR studies with DNA photolyase: excited-state FADH⁰ abstracts an electron from Trp306 to generate FADH⁻, the catalytically active form of the cofactor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 8023-7.
85. Kavakli, I. H. & Sancar, A. (2004). Analysis of the role of intraprotein electron transfer in photoreactivation by DNA photolyase in vivo. *Biochemistry* **43**, 15103-10.
86. Mees, A., Klar, T., Gnau, P., Hennecke, U., Eker, A. P., Carell, T. & Essen, L. O. (2004). Crystal structure of a photolyase bound to a CPD-like DNA lesion after in situ repair. *Science* **306**, 1789-93.
87. Husain, I., Sancar, G. B., Holbrook, S. R. & Sancar, A. (1987). Mechanism of damage recognition by *Escherichia coli* DNA photolyase. *J Biol Chem* **262**, 13188-97.
88. Vande Berg, B. J. & Sancar, G. B. (1998). Evidence for dinucleotide flipping by DNA photolyase. *J Biol Chem* **273**, 20276-84.

89. Espagne, A., Byrdin, M., Eker, A. P. & Brettel, K. (2009). Very fast product release and catalytic turnover of DNA photolyase. *Chembiochem* **10**, 1777-80.
90. Thiagarajan, V., Villette, S., Espagne, A., Eker, A. P., Brettel, K. & Byrdin, M. (2010). DNA repair by photolyase: a novel substrate with low background absorption around 265 nm for transient absorption studies in the UV. *Biochemistry* **49**, 297-303.
91. Kao, Y. T., Saxena, C., Wang, L., Sancar, A. & Zhong, D. (2005). Direct observation of thymine dimer repair in DNA by photolyase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 16128-32.
92. Kao, Y. T., Saxena, C., Wang, L., Sancar, A. & Zhong, D. (2007). Femtochemistry in enzyme catalysis: DNA photolyase. *Cell Biochem Biophys* **48**, 32-44.
93. Liu, Z., Tan, C., Guo, X., Kao, Y. T., Li, J., Wang, L., Sancar, A. & Zhong, D. (2011). Dynamics and mechanism of cyclobutane pyrimidine dimer repair by DNA photolyase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 14831-6.
94. Liu, Z., Guo, X., Tan, C., Li, J., Kao, Y. T., Wang, L., Sancar, A. & Zhong, D. (2012). Electron tunneling pathways and role of adenine in repair of cyclobutane pyrimidine dimer by DNA photolyase. *J Am Chem Soc* **134**, 8104-14.
95. Medvedev, D. & Stuchebrukhov, A. A. (2001). DNA repair mechanism by photolyase: electron transfer path from the photolyase catalytic cofactor FADH(-) to DNA thymine dimer. *J Theor Biol* **210**, 237-48.
96. Bertani, G. (1951). Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **62**, 293-300.
97. Bertani, G. (2004). Lysogeny at mid-twentieth century: P1, P2, and other experimental systems. *J Bacteriol* **186**, 595-600.
98. Tartof, K. D. & Hobbs, C. A. (1987). Improved media for growing plasmid and cosmid clones. *Bethesda Research Labs Focus* **9**.
99. Sambrook, J., Maniatis, T. & Fritsch, E. F. (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd Edition). *Cold Spring Harbor Laboratory Press*.
100. Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 5463-7.
101. Mullis, K. B. & Faloona, F. A. (1987). Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* **155**, 335-50.
102. Vogelstein, B. & Gillespie, D. (1979). Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 615-9.
103. Feliciello, I. & Chinali, G. (1993). A modified alkaline lysis method for the preparation of highly purified plasmid DNA from *Escherichia coli*. *Anal Biochem* **212**, 394-401.
104. Mülhardt, C. (2006). Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics 5. Edition. *Elsevier GmbH, München*.
105. Dower, W. J., Miller, J. F. & Ragsdale, C. W. (1988). High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res* **16**, 6127-45.
106. Kushner, S. (1978). An improved method for transformation of *Escherichia coli* with ColE1 derived plasmids. *Genetic Engineering*, 17-23.
107. Morrison, D. A. (1977). Transformation in *Escherichia coli*: cryogenic preservation of competent cells. *J Bacteriol* **132**, 349-51.
108. Studier, F. W. (2005). Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. *Protein Expr Purif* **41**, 207-34.
109. Porath, J., Carlsson, J., Olsson, I. & Belfrage, G. (1975). Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature* **258**, 598-9.
110. Porath, J. & Flodin, P. (1959). Gel filtration: a method for desalting and group separation. *Nature* **183**, 1657-9.

111. Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-5.
112. Bennett, J. & Scott, K. J. (1971). Quantitative staining of fraction I protein in polyacrylamide gels using Coomassie brilliant blue. *Anal Biochem* **43**, 173-82.
113. Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-54.
114. Carrington, A. & McLachlan, A. D. (1969). Introduction to Magnetic Resonance. *Harper International Edition, New York*.
115. Holtzhauer, M. (1996). Methoden der Proteinanalytik. *Springer-Verlag, Berlin*.
116. Atherton, N. M. (1993). Principles of Electron Spin Resonance. *Ellis Horwood LTD., Chichester*.
117. Schöppach, A. (2011). Synthese und Reparatur von lichtinduzierten DNA-Schäden. *Diplomarbeit, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg*.
118. Byrdin, M., Thiagarajan, V., Vilette, S., Espagne, A. & Brettel, K. (2009). Use of ruthenium dyes for subnanosecond detector fidelity testing in real time transient absorption. *Rev Sci Instrum* **80**.
119. Jorns, M. S., Sancar, G. B. & Sancar, A. (1985). Identification of oligothymidylates as new simple substrates for *Escherichia coli* DNA photolyase and their use in a rapid spectrophotometric enzyme assay. *Biochemistry* **24**, 1856-61.
120. Hill, A. V. (1910). The possible effects of the aggregation of the molecules of hæmoglobin on its dissociation curves. *Journal of Physiology* **40**, i-vii.
121. Ehrenberg, W. & Franks, A. (1952). Small-angle x-ray scattering. *Nature* **170**, 1076-7.
122. Henderson, R. (2004). Realizing the potential of electron cryo-microscopy. *Q Rev Biophys* **37**, 3-13.
123. Wuthrich, K. (1990). Protein structure determination in solution by NMR spectroscopy. *J Biol Chem* **265**, 22059-62.
124. Jancarik, J. & Kim, S. H. (1991). Sparse matrix sampling: a screening method for crystallization of proteins. *J. Appl. Cryst.* **24**, 409-411.
125. McPherson, A. (2004). Introduction to protein crystallization. *Methods* **34**, 254-65.
126. Rhodes, G. (2006). Crystallography Made Crystal Clear: A Guide For Users Of Macromolecular Models (3rd Edition). *Academic Press*.
127. Cowtan, K. (1994). Book of Fourier. www.ysbl.york.ac.uk/~cowtan/.
128. Rossmann, M. G. (1990). The molecular replacement method. *Acta Crystallogr A* **46 (Pt 2)**, 73-82.
129. DiMaio, F., Terwilliger, T. C., Read, R. J., Wlodawer, A., Oberdorfer, G., Wagner, U., Valkov, E., Alon, A., Fass, D., Axelrod, H. L., Das, D., Vorobiev, S. M., Iwai, H., Pokkuluri, P. R. & Baker, D. Improved molecular replacement by density- and energy-guided protein structure optimization. *Nature* **473**, 540-3.
130. McCoy, A. J., Grosse-Kunstleve, R. W., Adams, P. D., Winn, M. D., Storoni, L. C. & Read, R. J. (2007). Phaser crystallographic software. *J Appl Crystallogr* **40**, 658-674.
131. CCP4. (1994). The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr, Sect D: Biol Crystallogr* **50**, 760-3.
132. Matthews, B. W. (1968). Solvent content of protein crystals. *J Mol Biol* **33**, 491-7.
133. Mailliet, J., Psakis, G., Schroeder, C., Kaltofen, S., Durrwang, U., Hughes, J. & Essen, L. O. (2009). Dwelling in the dark: procedures for the crystallography of phytochromes and other photochromic proteins. *Acta Crystallogr, Sect D: Biol Crystallogr* **65**, 1232-1235.
134. Hassell, A. M., An, G., Bledsoe, R. K., Bynum, J. M., Carter, H. L., 3rd, Deng, S. J., Gampe, R. T., Grisard, T. E., Madauss, K. P., Nolte, R. T., Rocque, W. J., Wang, L., Weaver, K. L., Williams, S. P., Wisely, G. B., Xu, R. & Shewchuk, L. M. (2007).

- Crystallization of protein-ligand complexes. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **63**, 72-9.
135. Battye, T. G., Kontogiannis, L., Johnson, O., Powell, H. R. & Leslie, A. G. (2011). iMOSFLM: a new graphical interface for diffraction-image processing with MOSFLM. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **67**, 271-81.
 136. Leslie, A. G. W. & Powell, H. R. (2007). Processing Diffraction Data with Mosflm *Evolving Methods for Macromolecular Crystallography* **245**, 41-51.
 137. Incardona, M. F., Bourenkov, G. P., Levik, K., Pieritz, R. A., Popov, A. N. & Svensson, O. (2009). EDNA: a framework for plugin-based applications applied to X-ray experiment online data analysis. *J Synchrotron Radiat* **16**, 872-9.
 138. Kabsch, W. (2010). XDS. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **66**, 125-32.
 139. Evans, P. (2006). Scaling and assessment of data quality. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **62**, 72-82.
 140. Padilla, J. E. & Yeates, T. O. (2003). A statistic for local intensity differences: robustness to anisotropy and pseudo-centering and utility for detecting twinning. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **59**, 1124-30.
 141. Kantardjieff, K. A. & Rupp, B. (2003). Matthews coefficient probabilities: Improved estimates for unit cell contents of proteins, DNA, and protein-nucleic acid complex crystals. *Protein Sci* **12**, 1865-71.
 142. Read, R. J. (2012). PhaserWiki. www.phaser.cimr.cam.ac.uk/.
 143. Langer, G., Cohen, S. X., Lamzin, V. S. & Perrakis, A. (2008). Automated macromolecular model building for X-ray crystallography using ARP/wARP version 7. *Nat Protoc* **3**, 1171-9.
 144. Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W. G. & Cowtan, K. (2010). Features and development of Coot. *Acta Crystallogr, Sect D: Biol Crystallogr* **66**, 486-501.
 145. Murshudov, G. N., Vagin, A. A. & Dodson, E. J. (1997). Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallogr, Sect D: Biol Crystallogr* **53**, 240-55.
 146. Brunger, A. T. (1992). Free R value: a novel statistical quantity for assessing the accuracy of crystal structures. *Nature* **355**, 472-5.
 147. Brunger, A. T. (1997). Free R value: cross-validation in crystallography. *Methods Enzymol* **277**, 366-96.
 148. Kleywegt, G. J. & Jones, T. A. (1996). xdlMAPMAN and xdlDATAMAN - programs for reformatting, analysis and manipulation of biomacromolecular electron-density maps and reflection data sets. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **52**, 826-8.
 149. Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H., Shindyalov, I. N. & Bourne, P. E. (2000). The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res* **28**, 235-42.
 150. DeLano, W. L. (2002). The PyMOL Molecular Graphics System. *DeLano Scientific, San Carlos, CA, USA*. <http://www.pymol.org>.
 151. Heinig, M. & Frishman, D. (2004). STRIDE: a web server for secondary structure assignment from known atomic coordinates of proteins. *Nucleic Acids Res* **32**, W500-2.
 152. Baker, N. A., Sept, D., Joseph, S., Holst, M. J. & McCammon, J. A. (2001). Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 10037-41.
 153. Krissinel, E. & Henrick, K. (2007). Inference of macromolecular assemblies from crystalline state. *J Mol Biol* **372**, 774-97.
 154. Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J. D.,

- Gibson, T. J. & Higgins, D. G. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* **23**, 2947-8.
155. UniProtConsortium. (2009). The Universal Protein Resource (UniProt) in 2010. *Nucleic Acids Res* **38**, D142-8.
156. Saitou, N. & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* **4**, 406-25.
157. Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. & Kumar, S. (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* **24**, 1596-9.
158. Lassmann, T. & Sonnhammer, E. L. L. (2005). Kalign - an accurate and fast multiple sequence alignment algorithm. *BMC Bioinformatics* **6**.
159. Malhotra, K., Kim, S. T., Walsh, C. & Sancar, A. (1992). Roles of FAD and 8-hydroxy-5-deazaflavin chromophores in photoreactivation by *Anacystis nidulans* DNA photolyase. *J Biol Chem* **267**, 15406-11.
160. Biskup, T., Schleicher, E., Okafuji, A., Link, G., Hitomi, K., Getzoff, E. D. & Weber, S. (2009). Direct observation of a photoinduced radical pair in a cryptochrome blue-light photoreceptor. *Angew Chem Int Ed Engl* **48**, 404-7.
161. Weber, S., Biskup, T., Okafuji, A., Marino, A. R., Berthold, T., Link, G., Hitomi, K., Getzoff, E. D., Schleicher, E. & Norris, J. R., Jr. (2010). Origin of light-induced spin-correlated radical pairs in cryptochrome. *J Phys Chem B* **114**, 14745-54.
162. Lukacs, A., Eker, A. P., Byrdin, M., Brettel, K. & Vos, M. H. (2008). Electron hopping through the 15 Å triple tryptophan molecular wire in DNA photolyase occurs within 30 ps. *J Am Chem Soc* **130**, 14394-5.
163. Ghisla, S., Massey, V., Lhoste, J. M. & Mayhew, S. G. (1974). Fluorescence and optical characteristics of reduced flavines and flavoproteins. *Biochemistry* **13**, 589-97.
164. Bensasson, R. V., Land, E. J. & Truscott, T. G. (1983). *Flash photolysis and pulse radiolysis: Contributions to the chemistry of biology and medicine*. 1st edit, Pergamon, Oxford.
165. Solar, S., Getoff, N., Surdhar, P. S., Armstrong, D. A. & Singh, A. (1991). Oxidation of tryptophan and N-methylindole by N₃·, Br₂·-, and (SCN)₂·- radicals in light- and heavy-water solutions: a pulse radiolysis study. *The Journal of Physical Chemistry* **95**, 3639-3643.
166. Shuman, S. (1994). Novel approach to molecular cloning and polynucleotide synthesis using vaccinia DNA topoisomerase. *J Biol Chem* **269**, 32678-84.
167. Kleiner, O., Butenandt, J., Carell, T. & Batschauer, A. (1999). Class II DNA photolyase from *Arabidopsis thaliana* contains FAD as a cofactor. *Eur J Biochem* **264**, 161-167.
168. Kiontke, S. (2007). Charakterisierung und Kristallisation der Klasse 2 CPD-DNA Photolyase aus *Methanosarcina barkeri*. Diplomarbeit, Philipps-Universität Marburg.
169. Keegan, R. M. & Winn, M. D. (2007). Automated search-model discovery and preparation for structure solution by molecular replacement. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **63**, 447-57.
170. Stein, N. (2008). CHAINSAW: a program for mutating pdb files used as templates in molecular replacement. *J Appl Crystallogr* **41**, 641-643.
171. Komori, H., Masui, R., Kuramitsu, S., Yokoyama, S., Shibata, T., Inoue, Y. & Miki, K. (2001). Crystal structure of thermostable DNA photolyase: pyrimidine-dimer recognition mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 13560-5.
172. Maul, M. J., Barends, T. R., Glas, A. F., Cryle, M. J., Domratcheva, T., Schneider, S., Schlichting, I. & Carell, T. (2008). Crystal structure and mechanism of a DNA (6-4) photolyase. *Angew Chem, Int Ed Engl* **47**, 10076-80.

173. Huang, Y. H., Baxter, R., Smith, B. S., Partch, C. L., Colbert, C. L. & Deisenhofer, J. (2006). Crystal structure of cryptochrome 3 from *Arabidopsis thaliana* and its implications for photolyase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 17701-17706.
174. Song, S. H., Dick, B., Penzkofer, A., Pokorny, R., Batschauer, A. & Essen, L. O. (2006). Absorption and fluorescence spectroscopic characterization of cryptochrome 3 from *Arabidopsis thaliana*. *J Photochem Photobiol, B* **85**, 1-16.
175. Burney, S., Wenzel, R., Kottke, T., Roussel, T., Hoang, N., Bouly, J. P., Bittl, R., Heberle, J. & Ahmad, M. (2012). Single Amino Acid Substitution Reveals Latent Photolyase Activity in *Arabidopsis cry1*. *Angew Chem Int Ed Engl* **51**, 9356-60.
176. Smith, W. W., Burnett, R. M., Darling, G. D. & Ludwig, M. L. (1977). Structure of the semiquinone form of flavodoxin from *Clostridium* MP. Extension of 1.8 Å resolution and some comparisons with the oxidized state. *J Mol Biol* **117**, 195-225.
177. Ludwig, M. L., Patridge, K. A., Metzger, A. L., Dixon, M. M., Eren, M., Feng, Y. & Swenson, R. P. (1997). Control of oxidation-reduction potentials in flavodoxin from *Clostridium beijerinckii*: the role of conformation changes. *Biochemistry* **36**, 1259-80.
178. Thoma, F. (2005). Repair of UV lesions in nucleosomes - intrinsic properties and remodeling. *DNA Repair* **4**, 855-869.
179. Butenandt, J., Eker, A. P. M. & Carell, T. (1998). Synthesis, Crystal Structure, and Enzymatic Evaluation of a DNA-Photolesion Isostere. *Chemistry – A European Journal* **4**, 642-654.
180. Biertümpfel, C., Zhao, Y., Kondo, Y., Ramón-Maiques, S., Gregory, M., Lee, J. Y., Masutani, C., Lehmann, A. R., Hanaoka, F. & Yang, W. (2010). Structure and mechanism of human DNA polymerase η . *Nature* **465**, 1044-1048.
181. Zhang, Y. (2006). Charakterisierung archaealer Klasse II CPD-DNA-Photolyasen aus Methanosarcinales. Diplomarbeit, Philipps-Universität Marburg.
182. Hitomi, K., Arvai, A. S., Yamamoto, J., Hitomi, C., Teranishi, M., Hirouchi, T., Yamamoto, K., Iwai, S., Tainer, J. A., Hidema, J. & Getzoff, E. D. (2012). Eukaryotic class II cyclobutane pyrimidine dimer photolyase structure reveals basis for improved ultraviolet tolerance in plants. *J Biol Chem* **287**, 12060-9.
183. Essen, L. O., Siegert, R., Lehmann, W. D. & Oesterhelt, D. (1998). Lipid patches in membrane protein oligomers: Crystal structure of the bacteriorhodopsin-lipid complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 11673-11678.
184. Garczarek, F., Brown, L. S., Lanyi, J. K. & Gerwert, K. (2005). Proton binding within a membrane protein by a protonated water cluster. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 3633-3638.
185. Petersen, J. L. & Small, G. D. (2001). A gene required for the novel activation of a class II DNA photolyase in *Chlamydomonas*. *Nucleic Acids Res* **29**, 4472-81.
186. Petersen, J. L. & Ronan, P. J. (2010). Critical role of 7,8-didemethyl-8-hydroxy-5-deazariboflavin for photoreactivation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Biol Chem* **285**, 32467-75.
187. Kanehisa, M. & Goto, S. (2000). KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res* **28**, 27-30.
188. Kanehisa, M., Goto, S., Sato, Y., Furumichi, M. & Tanabe, M. (2012). KEGG for integration and interpretation of large-scale molecular data sets. *Nucleic Acids Res* **40**, D109-D114.
189. Waterworth, W. M., Jiang, Q., West, C. E., Nikaido, M. & Bray, C. M. (2002). Characterization of *Arabidopsis* photolyase enzymes and analysis of their role in protection from ultraviolet-B radiation. *J Exp Bot* **53**, 1005-1015.
190. Hada, M., Iida, Y. & Takeuchi, Y. (2000). Action spectra of DNA photolyases for photorepair of cyclobutane pyrimidine dimers in sorghum and cucumber. *Plant Cell Physiol* **41**, 644-8.

191. O'Brien, P. J. (2006). Catalytic promiscuity and the divergent evolution of DNA repair enzymes. *Chem Rev* **106**, 720-52.
192. Lin, L. J., Yoshinaga, A., Lin, Y., Guzman, C., Chen, Y. H., Mei, S., Lagunas, A. M., Koike, S., Iwai, S., Spies, M. A., Nair, S. K., Mackie, R. I., Ishino, Y. & Cann, I. K. (2010). Molecular analyses of an unusual translesion DNA polymerase from *Methanosarcina acetivorans* C2A. *J Mol Biol* **397**, 13-30.
193. Bresinsky, A., Körner, C., Kadereit, J. W., Neuhaus, G. & Sonnewald, U. (2008). *Strasburger Lehrbuch der Botanik*. 36 edit, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg.
194. Wurtman, R. J. (1975). The effects of light on the human body. *Sci Am* **233**, 69-77.
195. Jans, J., Schul, W., Sert, Y. G., Rijksen, Y., Rebel, H., Eker, A. P., Nakajima, S., van Steeg, H., de Gruijl, F. R., Yasui, A., Hoeijmakers, J. H. & van der Horst, G. T. (2005). Powerful skin cancer protection by a CPD-photolyase transgene. *Curr Biol* **15**, 105-15.
196. Mathes, T., Vogl, C., Stolz, J. & Hegemann, P. (2009). *In vivo* generation of flavoproteins with modified cofactors. *J Mol Biol* **385**, 1511-8.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Lars-Oliver Essen danke ich für das interessante und anspruchsvolle Forschungsthema, für die kompetente wissenschaftliche Betreuung und für das fortwährende Vertrauen, um mir eine gewisse Freiheit in der Forschung zu ermöglichen. Vielen Dank für die an mich vermittelte Faszination für die Strukturbiologie und die Phr/Cry-Familie.

Herrn Prof. Dr. Alfred Batschauer danke ich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens und vor allem für die sehr gute Kooperation, die bereits in der Diplomarbeit ihren Anfang nahm. Viele Grüße an die gesamte Arbeitsgruppe und ein besonderes Dankeschön an Dr. Richard Pokorny.

Vielen Dank an die Kooperationspartner Prof. Dr. Thomas Carell in München, Dr. Klaus Brettel und Dr. Pavel Müller in Frankreich bzw. Prof. Dr. Stefan Weber, Dr. Erik Schleicher und Andreas Schöppach in Freiburg.

Ein riesiger Dank geht an dieser Stelle an alle aktuellen und ehemaligen Arbeitsgruppenmitglieder für die interessanten, hilfreichen, wunderbaren, spannenden, abwechslungsreichen, unterhaltsamen, fröhlichen und unvergesslichen Stunden sowohl im Labor als auch außerhalb der Arbeitszeit.

Ein spezieller Dank richtet sich an Yann. Vielen Dank nicht nur für das Korrekturlesen, sondern vor allem auch für all die Diskussionen und deinen Einsatz.

Meinen ehemaligen Diplomanden, Bachelor-Studenten und Vertiefern/Praktikanten danke ich sowohl für ihre geleistete Arbeit als auch für das mir entgegengebrachte Vertrauen.

Für die wissenschaftlichen Grundlagen, die im Vorfeld dieser Arbeit geschaffen wurden, danke ich Petra Gnau, Jo Mailliet und Ying Zhang.

An der Stelle sei auch allen gedankt, die in Form von „Sachmitteln“ zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben: Prof. Dr. Annegret Wilde, Prof. Dr. Thomas Carell, Prof. Dr. Volker Müller, Dr. Verena Helmetag, Dr. Emine Kaya, Dr. Andreas Glas, Dr. Seigo Shima und Elvira Happel.

Ein großer Dank geht an alle administrativen und technischen Einrichtungen des Fachbereichs.

Ein besonderer Dank geht an meine Mutter, die mich in all den Jahren immer unterstützt hat.

... und DIR, liebste Katharina, danke ich für dein Verständnis, deine Geduld und deine Unterstützung während der gesamten Zeit. Du bist der Chromophor in meinem Leben.

Anhang

Aminosäuren

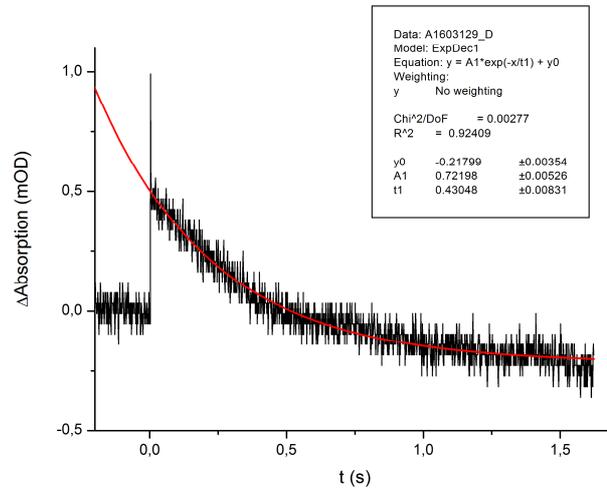
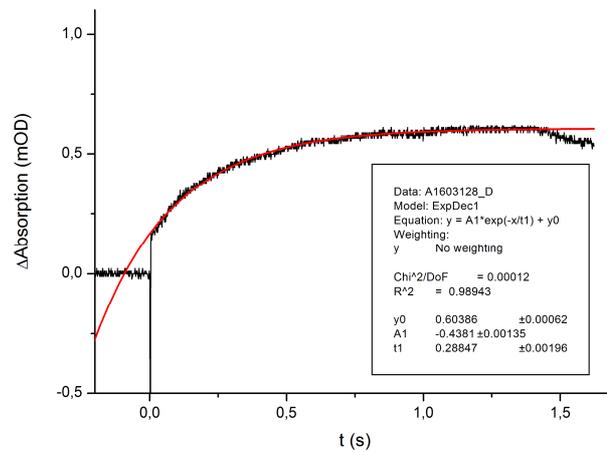
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Aspartat	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamat	Glu	E
Glutamin	Gln	Q
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

Verwendete SI-Präfixe

Mega	M	10^6
Kilo	k	10^3
		10^0
Centi	c	10^{-2}
Milli	m	10^{-3}
Mikro	μ	10^{-6}
Nano	n	10^{-9}
Piko	p	10^{-12}
Femto	f	10^{-15}

Abkürzungen und Fachbegriffe

8-HDF	8-Hydroxy-5-deazaflavin
A	Ampere
Å	Ångstrom (1 Å = 100 pm = 10 ⁻¹⁰ m)
aa	Aminosäure (<i>amino acid</i>)
Abb.	Abbildung
Ac	Acetat
APS	Ammoniumperoxodisulfat
bp	Basenpaar (<i>base pair</i>)
C	Cytosin
CPD	Cyclobutanpyrimidindimer
Da	Dalton (entspricht einer atomaren Masseneinheit. 1 Da = 1.660538921·10 ⁻²⁷ kg)
dd	doppelt destilliert
dest	destilliert
DLZ	6,7-Dimethyl-8-ribityl-lumazin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsDNA	doppelsträngige DNA (<i>double-stranded DNA</i>)
DTT	DL-Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FAD	Flavinadenindinukleotid
FMN	Flavinmononukleotid
g	Gramm
G	Guanin
h	Stunde
K	Kelvin
Kan	Kanamycin
L	Liter
M	Molar
m	Meter
min	Minuten
MTHF	Methenyltetrahydrofolat
NTA	Nitrilotriessigsäure (<i>nitrilotriacetic acid</i>)
OD _x	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von x nm
PEG	Polyethylenglycol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>revolutions per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
ssDNA	einzelsträngige DNA (<i>single-stranded DNA</i>)
Strep	Streptomycin
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TEMED	Tetramethylethylendiamin
U	<i>units</i>
ÜNK	Übernachtkultur
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen (<i>volume per volume</i>)
W	Watt
w/v	Gewicht pro Volumen (<i>weight per volume</i>)
λ	Wellenlänge

Exponentieller Fit der Daten der UV/Vis-Absorptionsspektroskopie bei 380 nm.**Exponentieller Fit der Daten der UV/Vis-Absorptionsspektroskopie bei 520 nm.**

Proteinsequenzen (eigene Expressionsplasmide)**His₆-MbCPDII**

MGSSHHHHHH SSGLVPRGSH MASNPKRIRT ILSGKPGKGP VAYWMSRDQR VEDNWALLFA
 70 80 90 100 110 120
 RKIALEADV P VFVVFCLVDK FLGAI RRQYE FMLKGLQEVE ATLARKKIPF FFLQGDPEEK
 130 140 150 160 170 180
 IPDFIEKYGI GTLITDFSPL RIKRTWTEKV ASSIKVPFFE VDAHNVVPCW EASKKQYAA
 190 200 210 220 230 240
 HTFRPKLLRL LPEFLTEYPE LETNLEFPEI AVRSGKAERF SEVQKSGIGT RLPGEFLEKK
 250 260 270 280 290 300
 AGFLPDLALF EAGETAARKV MDEFLT NKLD SYSSLRNDPT KDALS NLSPY LHFQGISAQ R
 310 320 330 340 350 360
 VALKVEKAKA DLESKR VFLD ELLVRKELAD NFCYYNPFYD SFDGFPDWAK KTLNTHRRDQ
 370 380 390 400 410 420
 RSHIFTLEEL ETGR TYDPLW NASQIELIRK GKMHSYMRMY WAKKILEWSE SPEKALETAI
 430 440 450 460 470 480
 YLNDKYELDG RDPNGYAGIA WSIGGVHDRA WQEREIFGKI RYMSYEGSKR KFDVKS YIDK

YSAL

His₆-MmCPDII

 10 20 30 40 50 60
 MGSSHHHHHH SSGLVPRGSH MNPKRIRALK SGKQGDGPVV YWMSRDQRAE DNWALLFSRA
 70 80 90 100 110 120
 IAKEANVPVV VVFCLTDEFL EAGIRQYEFM LKGLQELEVS LSRKKIPSFF LRGDPGEKIS
 130 140 150 160 170 180
 RFVKDYNAGT LVTDFSPLRI KNQWIEKVIS GISIPFFEVD AHNVVPCWEA SQKHEYAAHT
 190 200 210 220 230 240
 FRPKLYALLP EFLEEFPELE PNSVTPELSA GAGMVETLSD VLETGVKALL PERALLKNKD
 250 260 270 280 290 300
 PLFEPWHFEP GEKAAKVM E SFIADRLDSY GALRNDPTKN MLSNLSPYLH FGQISSQRVV
 310 320 330 340 350 360
 LEVEKAESNP GSKKAFLDEI LIWKEISDNF CYYNPGYDGF ESFPSWAKES LNAHRNDVRS
 370 380 390 400 410 420
 HIYTL EEFEA GKTHDPLWNA SQMELLSTGK MHGYTRMYWA KKILEWSESP EKALEIAICL
 430 440 450 460 470 480
 NDRYELDGRD PNGYAGIAWS IGGVHDRAWG EREVTGKIRY MSYEGCKRKF DVKLYIEKYS

AL

His₆-AnCPDI

10 20 30 40 50 60
 MGSSHHHHHH SSGLVPRGSH MAAPILFWHR RDLRLSDNIG LAAARAQSAQ LIGLFCLDPQ

70 80 90 100 110 120
 ILQSADMAPA RVAYLQGCLO ELQORYQQAG SRLLLQGDQ QHLIPQLAQQ LQAEAVYWNQ

130 140 150 160 170 180
 DIEPYGRDRD GQVAAALKTA GIRAVQLWDQ LLHSPDQILS GSGNPYSVYG PFWKNWQAQP

190 200 210 220 230 240
 KPTPVATPTE LVDSLPEQLT AIAPLLLSEL PTLKQLGFDW DGGFPVEPGE TAAIARLQEF

250 260 270 280 290 300
 CDRAIADYDP QRNFPAEAGT SGLSPALKFG AIGIRQAWQA ASAAHALSRS DEARNSIRVW

310 320 330 340 350 360
 QQELAWREFY QHALYHFPSL ADGPYRSLWQ QFPWENREAL FTAWTQAQTG YPIVDAAMRQ

370 380 390 400 410 420
 LTETGWMHNR CRMIVASFLT KDLIIDWRRG EQFFMQHLVD GDLAANNGGW QWSASSGMDP

430 440 450 460 470 480
 KPLRIFNPAS QAKKFDATAT YIKRWLPELR HVHPKDLISG EITPIERRGY PAPIVNHNLR

490 500
 QKQFKALYNQ LKAAIAEPEA EPDS

His₆-Dm(6-4)

10 20 30 40 50 60
 MGSSHHHHHH SSGLVPRGSH MDSQRSTLVH WFRKGLRLHD NPALSHIFTA ANAAPGKYFV

70 80 90 100 110 120
 RPIFILDPGI LDWMQVGANR WRFLQQTLED LDNQLRKLNS RLFVVRGKPA EVFPRIFKSW

130 140 150 160 170 180
 RVEMLTFETD IEPYSVTRDA AVQKLAKAEG VRVETHCSHT IYNPELVIK NLGKAPITYQ

190 200 210 220 230 240
 KFLGIVEQLK VPKVLGVPEK LKNMPTPPKD EVEQKDSAA YDCPTMKQLVK RPEELGPNKF

250 260 270 280 290 300
 PGGETEALRR MEESLKDEIW VARFEKPNTA PNSLEPSTTV LSPYLKFGCL SARLFNQKLNK

310 320 330 340 350 360
 EIIKRQPKHS QPPVSLIGQL MWREFYYTVA AAEPNFDRML GNVYCMQIPW QEHPDHLEAW

370 380 390 400 410 420
 THGRTGYPI DAIMRQLRQE GWIHHLARHA VACFLTRGDL WISWEEGQRV FEQLLLDQDW

430 440 450 460 470 480
 ALNAGNMMWL SASAFFHQYF RVYSPVAFGK KTDPOGHYIR KYVPELSKYP AGCIYEPWKA

490 500 510 520 530 540
 SLVDQRAYGC VLGTDYPHRI VKHEVVHKEN IKRMGAAYKV NREVRTGKEE ESSFEEKSET

His₆-ScFbiC

10 20 30 40 50 60
 MGSSHHHHHH SQDPNSMTTS ATSGTGPADP AGPTENSMRR ALKRARDGVA LDASEAAVLL

70 80 90 100 110 120
 QARGAHLDAL TASAARVRDA GLEAAGRPGV ITYSKSVFVP LTRLCRDKCH YCTFVTVPGK

130 140 150 160 170 180
 LRRAGHGMFM SPDEVLDIAR KGAALGCKEA LITLGDKPED RWPEAREWLD AHGYDDTIAY

190 200 210 220 230 240
 VRAVSIRILE ETGLLPHLNP GVMTWTFQR LKPVAPSMGM MLETTATRLW SEPGGPHHS

250 260 270 280 290 300
 PDKEPAVRLR VLEDAGRSSV PFTSGILIGI GETYEERAES LFALRRVRSR YHGIQELIQ

310 320 330 340 350 360
 NFRAKPDTAM RGMPDAELDE LVAAVAVARH IMGPSACLQA PPNLVDAEYE RLIGAGIDDW

370 380 390 400 410 420
 GGVSPLTIDH VNPERPWPQI DELAATSRAA GFELRERLCV YPEFVRRGEP WLDPRLRPHV

430 440 450 460 470 480
 AALADPETGL AREDAVVEGH AWQEPDEAFT ATGRTDLHAT IDTEGRTSDR RDDFDEVYGD

490 500 510 520 530 540
 WGALREAAAP GMAPERIDTD VRAALATAAD DPTKLTDEEA LALLHAEGPA LDALCGIADD

550 560 570 580 590 600
 VRRSVVGDDV TYIVTRNINF TNVCYTGRF CAFAQRRDA DAYTSLDQV ADRAQQAWEV

610 620 630 640 650 660
 GAVEVCMQGG IHPDLPGTAY FDIARAVKER VPGMHVHAFS PMEVVNGATR TGLSIREWLT

670 680 690 700 710 720
 AAKEAGLDSV PGTAAEILDD EVRWILTKGK LPAATWIEVI ETAHELGIRS SSTMMYGHVD

730 740 750 760 770 780
 QPRHWLGHRL TLAGIQRRTG GFTEFVTLPF IHTNAPVYLA GIARPGPTLR DNRAVTAMAR

790 800 810 820 830 840
 LLLHPHIPNI QTSWVKLGTE GAAEMLRSGA NDLGGTLMEE TISRMAGSSY GSYKSVKDLI

850 860 870 880
 AVADAAGRPA KPRTTLYGPV PEERQRAARD SDGHLPELLP VLD