

Institut für Organische Chemie und Biochemie der  
Technischen Universität München

# Über den Reaktionsmechanismus der DNA-Photolyase

Erik Schleicher

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der Technischen Universität  
München zu Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzende:	Univ.-Prof. Dr. S. Weinkauff
Prüfer der Dissertation:	1. Univ.-Prof. Dr. Dr. A. Bacher
	2. Univ.-Prof. Dr. P. Schieberle
	3. Univ.-Prof. Dr. A. Gierl

Die Dissertation wurde am 14.12.2001 bei der Technischen Universität München eingereicht  
und durch die Fakultät für Chemie am 26.02.2002 angenommen.



**Meinen Eltern**



Die experimentellen Arbeiten zur vorliegenden Dissertation wurden von Oktober 1998 bis Oktober 2001 am Lehrstuhl für Organische Chemie und Biochemie der Technischen Universität München durchgeführt.

Meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. Dr. A. Bacher danke ich sehr herzlich für die Aufnahme in seinen Arbeitskreis, die immer gewährte Unterstützung und die stete Hilfsbereitschaft bei der Betreuung und Förderung dieser Arbeit.

Meinem Betreuer Herrn Dr. G. Richter möchte ich für die intensive Betreuung der Arbeit, die immerwährende Gesprächs- und Diskussionsbereitschaft und die Freiheit bei der Durchführung der Arbeit danken.

Herrn R. Feicht möchte ich für die geleistete Arbeit bei der Proteinreinigung danken. Ohne ihn wäre diese Arbeit nicht in diesem Umfang zustande gekommen. Frau H. Hofner gebührt ewiger Dank für ihre Einführung ins Labor, ihre Mithilfe bei allen Problemen und ihre stets gute Laune.

Herrn Dr. B. Heßling und Herrn Prof. Dr. K. Gerwert von der Ruhr-Universität Bochum möchte ich für die herzliche Einführung und hilfreiche Betreuung bei der Durchführung der FT-IR Experimente danken.

Herr Dr. C. Kay und besonders Herrn Dr. S. Weber von der Freien Universität Berlin möchte ich ganz herzlich für die hervorragende Zusammenarbeit, die verständliche Einführung in die EPR-Spektroskopie, die zwei lehrreichen Wochen in Berlin und für die Durchführung der EPR/ENDOR Experimente danken.

Herrn Dr. D. Murgida und Prof. Dr. P. Hildebrandt vom Max-Planck-Institut für Strahlenchemie in Mülheim an der Ruhr möchte ich für die Durchführung der Resonanz-RAMAN Experimente danken.

Ganz herzlich möchte ich mich bei meinen Laborkollegen Herrn Dipl. Chem. R. Mühlberger, Herrn cand. Biol. O. Latz, Herrn Dipl. Chem. R. Robelek, Herrn Dipl. Biol. S. Szogalla und Herrn Dipl. Biol. H. Wolff für die gute und entspannte Atmosphäre im Labor danken.

Allen Praktikanten möchte ich für die bei mir geleistete Arbeit und ihren Einsatz danken.

Bei Herrn Dr. K Kis möchte ich mich für das bereitgestellte 5-15N-Riboflavin bedanken, bei Frau Dr. V. Illarionov für die Durchführung der Mutation an DNA Photolyase.

Herrn Dipl. Chem. J. Kaiser, Herrn Dr. N. Schramek, Frau Dipl. Chem. S. Schiffman, Herrn Dipl. Chem. S. Hecht, Frau Dipl. Lebchem. Ann-Kathrin Schott, Herrn Dipl. Chem. W. Römisch, Frau Dr. C. Krieger und Herrn Dr. H. Lüttgen möchte ich für allerlei Hilfe und Diskussion danken.

Allen weiteren, namentlich nicht weiter genannten Personen im Arbeitskreis Bacher möchte ich für die herzliche Aufnahme, das gute Verhältnis und die Diskussionsbereitschaft danken.

Außerdem möchte ich allen Freunden, Bekannten danken, die mich in dieser Zeit noch unterstützt und aufgeheitert haben.

## Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1.	Schädigungen der DNA	1
1.2.	Mutationen	1
1.3.	Schädigung der DNA durch UV-Strahlung	2
1.3.1.	Cyclobutandimere	2
1.3.2.	(6-4) Photoprodukte	4
1.3.3.	Andere Photomutationen	5
1.4.	Die Enzymfamilie der Photolyasen	5
1.4.1.	CPD-Photolyase	7
1.4.2.	(6-4)-Photolyase	10
1.4.3.	Blaulichtrezeptoren (Cryptochrome)	10
1.5.	Aufgabenstellung	11
<b>2.</b>	<b>Materialien und Methoden.....</b>	<b>12</b>
2.1.	Material	12
2.1.1.	Geräte	12
2.1.2.	Chemikalien und Enzyme	13
2.1.3.	Bakterien-Stämme	13
2.1.4.	Verwendete Plasmide	14
2.1.5.	Verwendete Primer	16
2.1.6.	Kulturmedien	17
2.1.7.	Puffer und Stammlösungen	20
2.2.	Proteinchemische Methoden	23
2.2.1.	Stammhaltung und Wachstum	23
2.2.1.1.	Stammhaltung	23
2.2.1.2.	Bakterienwachstum	23
2.2.2.	Expressionstest	23
2.2.2.1.	Anzucht	23
2.2.2.2.	Herstellung von Rohextrakt	24
2.2.2.3.	Analyse von Einschlusskörpern	24
2.2.3.	Großanzucht von <i>E. coli</i> -Stämmen	24
2.2.4.	Großanzucht von <i>B. Subtilis</i> -Stämmen	24
2.2.5.	Anzucht von <i>A. nidulans</i>	25
2.2.6.	Anzucht von <i>T. thermophilus</i>	25
2.2.7.	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	25
2.2.8.	Herstellung von vollmarkiertem Riboflavin	26
2.2.8.1.	Anzuchtbedingungen	26
2.2.8.2.	Reinigung des Riboflavins	27
2.2.9.	Herstellung von stabilisotopenmarkierter Photolyase	27
2.2.9.1.	Herstellung von Photolyase mit stabilisotopen-markiertem Riboflavin	27
2.2.9.2.	Herstellung von stabilisotopenmarkiertem Apoenzym und Cofaktor	28
2.2.10.	Proteinreinigung	28
2.2.10.1.	Reinigung der DNA Photolyase aus <i>E. coli</i>	28
2.2.10.1.1.	Allgemeine Arbeitsbedingungen	28
2.2.10.1.2.	Puffer	28
2.2.10.1.3.	Zellaufschluss	30
2.2.10.1.4.	Farbstoff-Affinitätschromatographie	30
2.2.10.1.5.	Ammoniumsulfat-Fällung	30
2.2.10.1.6.	Entsalzungssäule	31
2.2.10.1.7.	Affinitätschromatographie	31

2.2.10.1.8.	Proteinkonzentrierung durch Ultrafiltration	32
2.2.10.2.	Reinigung der DNA Photolyase aus <i>A. nidulans</i>	32
2.2.10.3.	Reinigung der DNA Photolyase aus <i>T. thermophilus</i>	32
2.2.11.	Protein-Konzentrationsbestimmungen der DNA Photolyasen	33
2.2.12.	Aktivitätsbestimmung von DNA Photolyasen	34
2.2.13.	Herstellung von verschiedenen Oxidationsstufen der DNA Photolyase	34
2.3	Molekularbiologische Arbeitsmethoden	36
2.3.1	Isolierung von DNA	36
2.3.1.1.	Schnellisolierung von Plasmid-DNA mit Hitzeschock (Minipräparation)	36
2.3.1.2	Isolierung von Plasmid-DNA mittels PEQLAB-Plasmid-Isolation-Kit	36
2.3.1.3.	Isolierung bakterieller chromosomaler DNA	37
2.3.2.	Reinigung von DNA	37
2.3.3.	Agarosegelelektrophorese	38
2.3.4.	Herstellung elektrokompenter Zellen	39
2.3.5.	Elektrotransformation von <i>E. coli</i> -Stämmen	39
2.3.6.	Elektrotransformation mit frisch ausplattierten <i>E. coli</i> -Stämmen	40
2.3.7.	Elektrotransformation von <i>B. Subtilis</i> -Stämmen	40
2.3.7.1.	Herstellung von elektrokompenten <i>B. Subtilis</i> -Zellen	40
2.3.7.2.	Elektrotransformation	41
2.3.8.	DNA-Sequenzierung	42
2.3.9.	Restriktionsanalyse	42
2.3.10.	Ligierung von DNA-Fragmenten	42
2.3.11.	Amplifikation von DNA mittels PCR-Reaktion	42
2.4.	Bestrahlung von DNA-Oligonukleotiden	45
2.4.1.	Verwendete DNA-Sequenzen	45
2.4.2.	DNA Konzentrationsbestimmung	45
2.4.3.	Schädigung der DNA	45
2.4.4.	Bestimmung des Schädigungsgrades der DNA	45
2.4.4.1.	Qualitative Bestimmung des Schädigungsgrades	46
2.4.4.2.	Quantitative Bestimmung des Schädigungsgrades	46
2.4.4.3.	Herstellung von doppelsträngiger DNA mit einem Pyrimidin Dimer	47
2.5.	Spektroskopische Methoden	48
2.5.1.	FT-IR-Spektroskopische Messungen	48
2.5.2.	EPR/ENDOR-Spektroskopische Messungen	49
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>51</b>
3.1.	Darstellung von Substrat	51
3.1.1.	Bestimmung des Schädigungsgrades von polyT DNA	51
3.1.2.	Bestimmung des Schädigungsgrades von DNA mit einem CPD	53
3.2.	Biochemische Arbeiten mit rekombinanter DNA Photolyase	56
3.2.1.	Biochemische Arbeiten mit rekombinanter DNA Photolyase aus <i>E. coli</i>	56
3.2.1.1.	Reinigung der rekombinanter DNA Photolyase aus <i>E. coli</i>	56
3.2.1.2.	Mutation der DNA Photolyase aus <i>E. coli</i>	58
3.2.1.3	Herstellung von stabilisotopenmarkierter DNA Photolyase aus <i>E. coli</i>	62
3.2.1.3.1.	Herstellung von stabilisotopenmarkierter DNA-Photolyase aus <i>E. coli</i> (Apoenzym und FAD)	62
3.2.1.3.2.	Herstellung von DNA Photolyase aus <i>E. coli</i> mit stabilisotopenmarkiertem Riboflavin	63
3.2.1.3.3.	Herstellung von DNA Photolyase aus <i>E. coli</i> mit differenziell- stabilisotopenmarkiertem Riboflavin	65
3.2.2.	Biochemische Arbeiten mit DNA Photolyase aus <i>A. nidulans</i>	66
3.2.2.1.	Isolierung chromosomaler DNA aus <i>A. nidulans</i>	66
3.2.2.2.	Klonierung und Expression des Photolyase-Gens aus <i>A. nidulans</i>	66
3.2.2.3.	Reinigung von rekombinanter DNA Photolyase aus <i>A. nidulans</i>	68
3.2.3.	Biochemische Arbeiten mit DNA-Photolyase aus <i>T. thermophilus</i>	70



3.2.3.1.	Isolierung chromosomaler DNA aus <i>T. thermophilus</i>	70
3.2.3.2.	Klonierung und Expression des Photolyase-Gens aus <i>T. thermophilus</i>	70
3.2.3.3.	Reinigung von rekombinanter DNA-Photolyase aus <i>T. thermophilus</i>	72
3.3.	Spektroskopische Arbeiten mit DNA Photolyase aus <i>E. coli</i> .	74
3.3.1.	Fourier-Transform-Infrarot-Spektroskopie mit rekombinanter DNA Photolyase aus <i>E. coli</i> .	74
3.3.1.1.	Theoretische Grundlagen der Fourier-Transform-Infrarot-Spektroskopie	74
3.3.1.2.	Messungen der Photoreduktion der rekombinanter DNA Photolyase aus <i>E. coli</i> .	76
3.3.1.3.	Messungen der Photoreparatur und der Photoschädigung von DNA	79
3.3.1.4.	Messung des gesamten Schädigungs/Reparatur-Zyklus	84
3.3.2.	Elektronenspinresonanz Messungen an rekombinanter DNA Photolyase aus <i>E. coli</i>	86
3.3.2.1.	Theoretische Grundlagen der Elektronenspinresonanz Spektroskopie	86
3.3.2.2.	EPR Messungen an rekombinanter DNA Photolyase in der Radikal-Form	88
3.3.2.2.	ENDOR Messungen an rekombinanter DNA Photolyase in der Radikal-Form	90
<b>4.</b>	<b>Diskussion. ....</b>	<b>96</b>
4.1.	Arbeiten mit Substrat	96
4.2.	Biochemisches Arbeiten mit rekombinanter DNA Photolyase	97
4.3.	FT-IR Spektroskopie	100
4.4.	EPR/ENDOR Spektroskopie	106
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung. ....</b>	<b>109</b>
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis. ....</b>	<b>112</b>

## Abkürzungsverzeichnis

8-HDF	8-Hydroxy-5-Deazaflavin
A	Hyperfeinkopplungskonstante
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumperoxodisulfat
B <sub>0</sub>	Äußeres Magnetfeld
B <sub>p</sub>	Basenpaare
BSA	Rinder Serum Albumin
cw	zeitlich kontinuierliche Einstrahlung
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTE	Dithioerythritol
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiaminetetraacetat
ENDOR	Elektron-Kern-Doppelresonanz
EPR	Paramagnetische Elektron Resonanz
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatographie
FT-IR	Fourier Transform Infrarot Spektroskopie
FU	Fluoruracil
h	Stunde
HEPES	N-[2-Hydroxyethyl]piperazin-N´-[2-Ethansulfonsäure]
HFS	Hyperfeinstruktur
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
Hz	Hertz
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactosid
MCT	Quecksilber-Cadmium-Tellurid
min	Minute
MTHF	Methylen-Tetrahydrofolat
NAD(P)	β-Nicotinamidadenindinucleotid-2´-phosphat
OD	optische Dichte bei bestimmter Wellenlänge
P	Phosphat
PCR	Polymerase-Kettenreaktion

## Abkürzungsverzeichnis

---

PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
RBS	Ribosomale Bindungsstelle
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat Polyacrylamid Gelelektrophorese
RT	Raumtemperatur
T	Tesla
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamin
THF	Tetrahydrofolat
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	ultraviolett





# 1. Einleitung

## 1.1. Schädigungen der DNA

Die Sequenz der vier Nukleotide Adenosin, Cytidin, Guanosin und Thymin repräsentiert in Form doppelhelikaler DNA die genetische Erbinformation in pro- und eukaryotischen Zellen (Crick et al., 1961). Nachdem die Basensequenz den Aufbau der Zellen und alle zellulären Proteine codiert, ist eine korrekte Basensequenz essentiell für das Überleben der Zelle. Mutationen aller Art können zur fehlerhaften Codierung von Proteinen führen (Lewine 1991). Bei der Replikation der DNA kann die Verdoppelung an der Mutationsstelle abgebrochen werden, was normalerweise zum Zelltod führt. Wird die Replikation nicht abgebrochen, kann es zum Einbau fehlerhafter Basen in den neuen DNA-Strang kommen. Dadurch kommt es zu einer veränderten Erbinformation der entstehenden Zellen. Diese Mutationen können für die Zelle weitreichende Konsequenzen haben.

## 1.2. Mutationen

Es können mehrere Arten von Mutationen auftreten (Friedberg et al. 1995). Bei Punktmutationen ist eine Base gegen eine andere ausgetauscht. Konservative Mutationen (der Austausch der Base ändert das codierende Codon nicht) haben keine weiteren Folgen für die Zellen. Auch die Änderung eines Codons hat meistens keinen totalen Funktionsverlust für das codierte Protein zur Folge. Dramatischer sind die Folgen für die Zelle bei nonsense-Mutationen (durch die Mutation wird das Codon zum Stop-Codon) und frameshift-Mutationen (durch Basendeletion verschiebt sich der Leserahmen und damit alle weiteren Codons). Durch den Transkriptionsstopp wird ein oft nicht funktionsfähiges Protein exprimiert. Auch strukturell veränderte Basen und Strangbrüche führen zur Transkription veränderter Proteine. Bei der Zellteilung stoppt die Replikation normalerweise an solchen Mutationen. Nur unter speziellen Stress-Bedingungen (SOS-Replikation) (Casaregola et al. 1982), bei der die Fehlerrate der Replikation deutlich erhöht ist, kann die Zelle solche Fehler mitreplizieren und so Mutationen vererben (Humayun et al. 1981).

Es werden prinzipiell mehrere Arten der Schädigung der DNA unterschieden. Erstens kann es zu spontanen Veränderungen und Schädigungen der DNA kommen. Beispiele hierfür sind der

fehlerhafte Einbau einzelner Basen bei der Replikation (Loeb und Kunkel 1981) und spontane Veränderungen der Basen (Lindahl 1993).

Zur Schädigung der DNA können Umweltbedingungen beitragen. Verschiedene chemische Reagentien wie z.B. Benzo-[a]-pyrene (Butlin 1892) oder *cis*-Platin-Verbindungen (Chu 1994) sind in der Lage, die Struktur der DNA zu verändern und damit Schäden auszulösen. Weiterhin kann ionisierende Strahlung ein breites Spektrum an DNA-Schäden verursachen (Frankenberg-Schwager 1990). Sowohl Schäden durch Hydroxylierungen einzelner Basen als auch Schädigung des Zuckerrückgrates und Strangbrüche sind möglich. Drittens kann UV-Strahlung auch zu Schädigungen der DNA führen.

### 1.3. Schädigung der DNA durch UV-Strahlung

Das UV-Spektrum wird in drei Bereiche unterteilt: UV-A (400-320 nm), UV-B (320-290 nm) und UV-C (290-100 nm). Die auf der Erde auftreffende UV-Strahlung besteht hauptsächlich aus UV-A und UV-B Strahlung, da das in der Stratosphäre vorkommende Ozon den größten Teil der Strahlung unter 320 nm absorbiert. Allerdings sinkt diese UV-C Absorption durch anthropogenen Ausstoß von Fluor-Chlor-Kohlenwasserstoffen und anderer Chemikalien, weil dadurch der Ozon-Gehalt in der Stratosphäre verringert wird (Molina und Rowland 1974).

Da das Hauptabsorptionsmaximum der DNA bei 260 nm liegt, ist die DNA der meisten auf der Erde lebenden Organismen in zunehmenden Maße der UV-C Strahlung ausgesetzt, die der DNA Schäden zufügen kann.

Hauptsächlich treten durch UV-induzierte zyklische Elektronenübertragungsprozesse als chemische Reaktionen auf.

#### 1.3.1. Cyclobutandimere

Das häufigste (ca. 90 %) (Kao et al. 1993) vorkommende UV-Photoprodukt der DNA ist das Cyclobutan-Pyrimidin-Dimer (CPD). Es entsteht durch photochemische [2+2]-Cycloaddition zweier benachbarter Pyrimidine (Abb. 1.1.); es gibt die Kombinationen T<>T, T<>C, C<>T und C<>C, wobei T<>T Dimere in der Natur signifikant häufiger sind (Setlow und Carrier 1966).

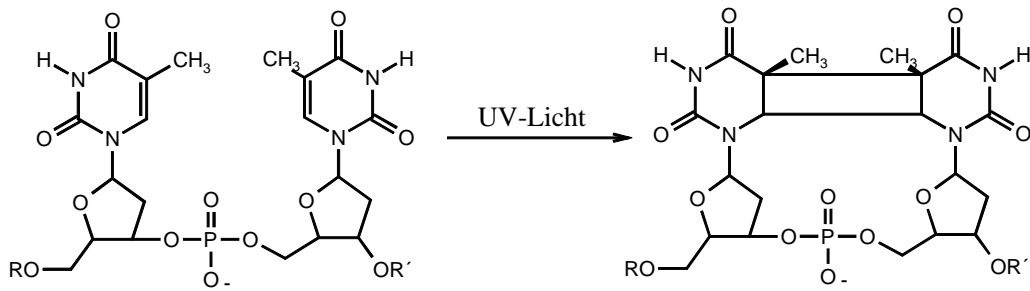


Abb. 1.1.: UV-induzierte Entstehung eines cis-syn CPD-Photoprodukts mit der Basensequenz T-T.

Von T<>T-Dimeren existieren theoretisch vier Isomere (cis-syn, cis,-anti, trans-syn und trans-anti), in doppelsträngiger DNA findet man nur das cis-syn Isomer (Heelis et al. 1993).

1998 konnten McAteer und Mitarbeiter (McAteer et al. 1998) eine DNA-Struktur in Lösung lösen, die ein T-T-CPD enthält (Abb. 1.2.).

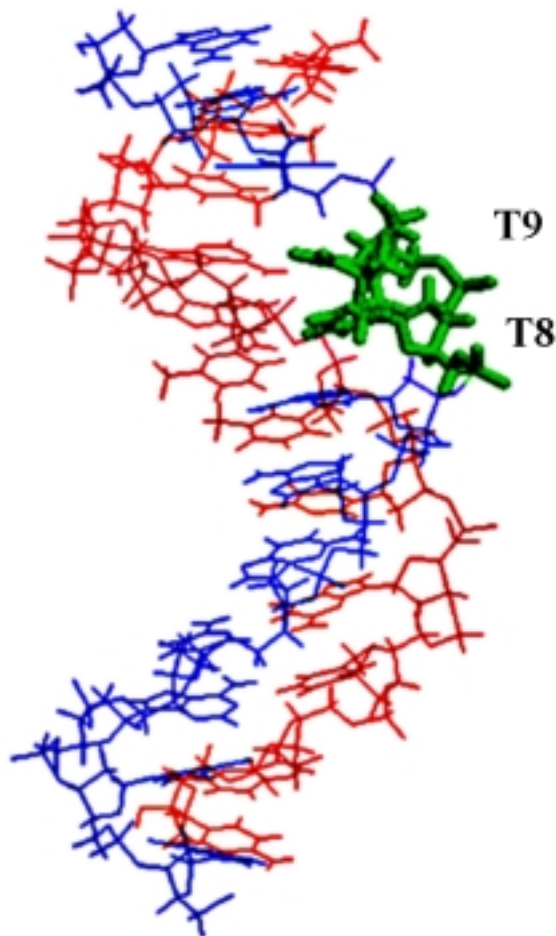


Abb. 1.2.: Struktur eines T<>T-Dimers (Protein-Datenbank-Nummer 1TTD) Basensequenz 5'-GCACGAAT<>TAAG. Der geschädigte Strang ist rot, der Gegenstrang blau und das CPD grün dargestellt.



Deutlich ist das um  $20^\circ$  aus der Ebene gedrehte Thymidin<sup>9</sup> zu erkennen, das auch für die Mutagenität von CPD-Photoprodukten verantwortlich ist (McAteer et al. 1998). Unter SOS-Bedingungen zeigen 6 % des 3'-T's Mutationen, aber nur 1 % des 5'-T's Mutationen (Banerjee et al. 1990), meistens in Form von T→C Punktmutationen. Auch frameshift-Mutationen können durch T<>T-Dimere entstehen: DNA-Polymerasen verweilen während der Replikation lange an einem Dimer, um dann das Dimer komplett zu überspringen (Wang und Taylor 1992); dadurch werden zwei Basen zuwenig repliziert. Auch Desaminierungen von Cytidin zu Uracil sind beobachtet worden (Peng und Shaw 1996).

### 1.3.2. (6-4) Photoprodukte

Ein weiteres, bei UV-Bestrahlung vorkommendes Photoprodukt, ist das Pyrimidin-Pyrimidon (6-4) Photoprodukt. Anders als bei Cyclobutandimeren ist das primäre Photoprodukt eine [2+2] Cycloaddition zwischen der C5-C6 Doppelbindung und der Carbonyl-Gruppe (Amino-Gruppe), was als Primärprodukt ein Oxetan im Fall von zwei Thyminen und ein Azetin im Fall von Thymidin-Cytidin ergibt. Dieses Produkt ist über  $-80^\circ\text{C}$  nicht beobachtbar, da es sich schnell in das stabile (6-4)-Photoprodukt bzw. sein Dewar-Isomer umwandelt (Abb.1.3.).

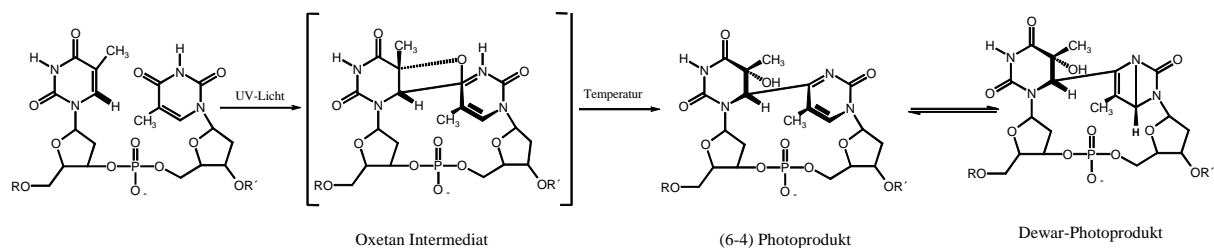


Abb. 1.3.: UV-induzierte Entstehung eines (6-4)Photoprodukts mit der Basensequenz T-T.

Das Bildungs-Verhältnis von CPD und (6-4) Photoprodukten beträgt ungefähr 10/1 (Kao et al. 1993). Im Gegensatz dazu ist die Mutagenitätsrate (91 %) (LeClerc et al. 1991) deutlich höher. In SOS-induzierten *E. coli* Zellen wurde am 5'-Ende des Gegenstrangs eines T-T (6-4)-Photoprodukts zu 95 % Adenin gefunden, am 3'-Ende zu 85 % Guanin (Smith et al. 1996). Durch den „Knick“, der durch das Photoprodukt entsteht und etwa 30 % beträgt, wird das 3'-Thymin räumlich so gedreht, das es mit einem Guanin eine stabile Wasserstoffbrücke zwischen O2 und NH1/NH2 bilden kann (Lee et al. 1999). Daher wird ein Basentausch T→C zu 85 % induziert, was eine schnelle und effektive Reparatur erforderlich macht.

### 1.3.3. Andere Photomutationen

Werden *Bacillus Subtilis*-Sporen mit UV-Licht bestrahlt, entstehen bei 30 % der benachbarten Thyminen Strukturen der Form 5'-Thymidyl-5,6-dihydrothymine (Abb.1.4.) (Varghese et al. 1970).

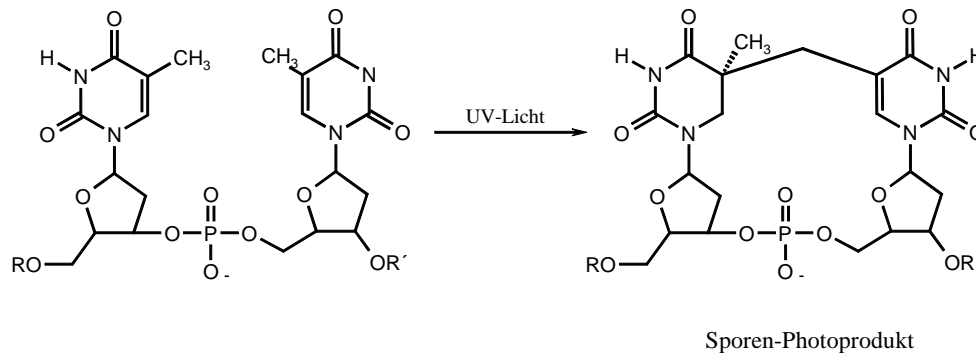


Abb. 1.4.: UV-induzierte Entstehung des Sporen-Photoprodukts mit der Basensequenz T-T.

Dieses Photoprodukt ist charakteristisch für wenig hydratisierte DNA-Formen. Die Reparatur erfolgt in *B. subtilis* über das wenig charakterisierte Enzym SP Lyase (Fajardo-Cavazos et al. 1993) und über die Excisionsreparatur.

Weitere UV-induzierte Photoschäden sind Pyrimidinhydrate (5,6-Dihydro-6-Hydroxy-Cytosin) (Fisher und Johns 1976), die über Desaminierung/Dehydratisierung in Thymin/Uracil weiterreagieren können und Thymin-Glycole (5,6-Ddihydroxydihydro-Thymine) (Demple und Linn 1982).

## 1.4. Die Enzymfamilie der Photolyasen

Photolyasen stellen eine Enzym-Klasse dar, die neben der Excisionsreparatur (Grossman und Thiagalingam 1993) verantwortlich für die Reparatur von CPD und (6-4)-Photoprodukten sind. Dementsprechend werden sie je nach Substrat in CPD-Photolyasen und (6-4)-Photolyasen unterteilt (Sancar 1994). Cryptochrome (CRY) sind eine neue Klasse von Photorezeptoren, die den Photolyasen sequenzhomolog sind, aber keine Reparatureigenschaften besitzen.

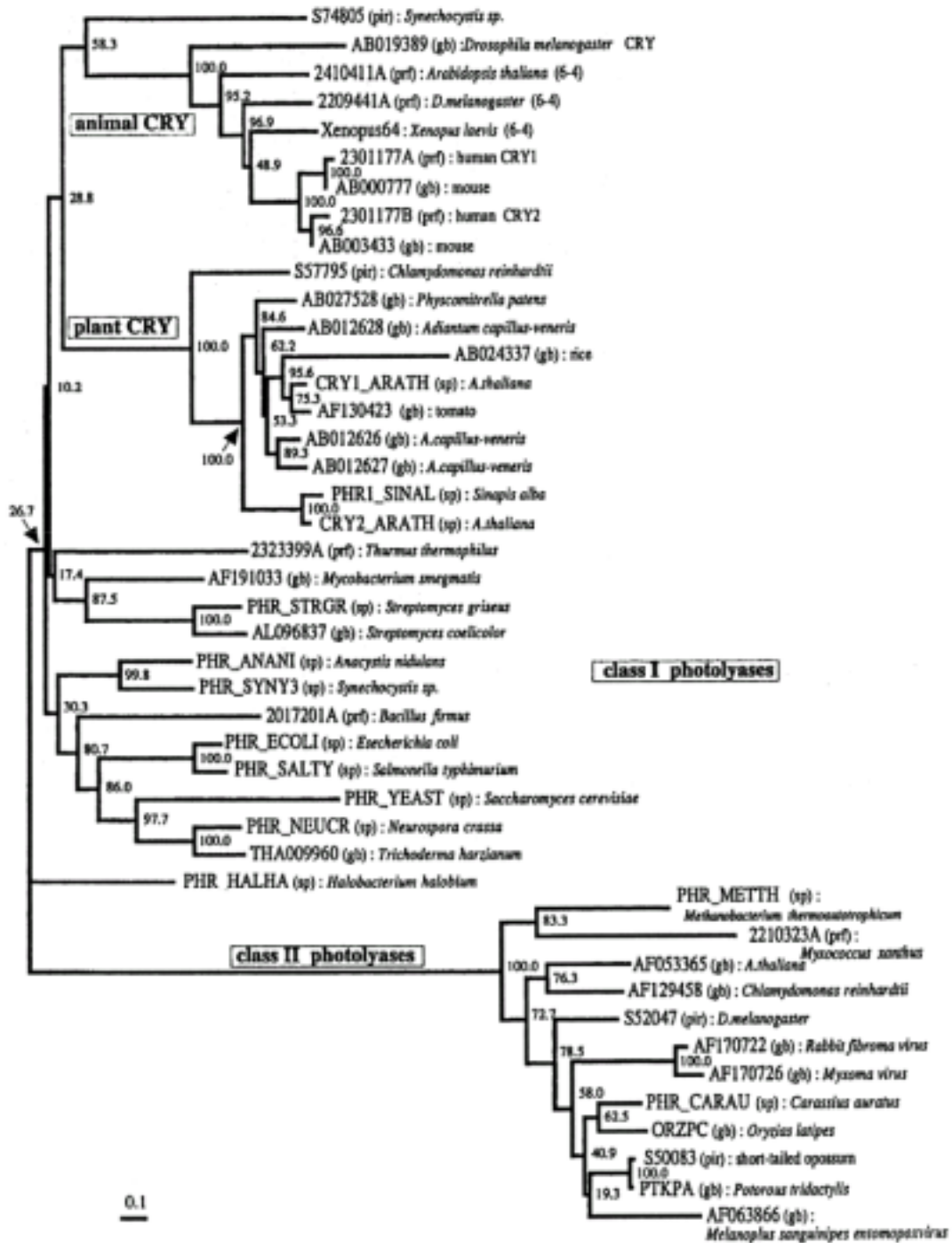


Abb. 1.5.: Phylogenetischer Baum aller bis jetzt identifizierter Photolyasen. Statt des Namens der Photolyase/des Photorezeptors wurde der ID Code und die entsprechende Datenbank (pir, prf, sp und gb entsprechen PIR, PRF, Swissprot und GenBank) angegeben. Die Zahlen im Baum geben die Sequenzähnlichkeiten an (Hitomi et al. 2000).

In Abb. 1.5. ist ein phylogenetischer Baum aller bis jetzt beschriebenen Enzyme der Photolyase-Klasse dargestellt (Hitomi et al. 2000). Es werden vier Klassen unterschieden:

tierische Cryptochrome, pflanzliche Cryptochrome, Klasse I Photolyasen und Klasse II Photolyasen. In den tierischen Cryptochromen finden sich auch alle bis jetzt identifizierten (6-4)-Photolyasen. Klasse I Photolyasen beinhalten alle prokaryotischen CPD-Photolyasen, Klasse II Photolyasen die eukaryotischen CPD-Photolyasen (Kanai et al. 1997).

### 1.4.1. CPD-Photolyase

Die Reparatur von lichtinduzierten CPD's, die auch als Photoreaktivierung bezeichnet wird, wurde erstmals im Jahre 1949 beschrieben (Kelner 1949). *Streptomyces griseus* Zellen zeigten eine dramatisch erhöhte Regenerationsrate nach UV-Bestrahlung, wenn sie sichtbarem Licht ausgesetzt wurden. Als in vitro (und später auch in vivo) Substrate dieser Reaktion wurden Thymidin-Dimere 1962 identifiziert (Wulff und Rupert 1960). 1987 wurde von Sancar und Mitarbeitern das erste "photoreaktivierende Enzym" aus Hefe kloniert, gereinigt und charakterisiert (Sancar et al. 1987). Seitdem konnten aus einer großen Anzahl von Organismen CPD-Photolyasen identifiziert werden (Sancar 1994; Todo et al. 1993; Kato, et al. 1994). Photolyasen besitzen zwei stöchiometrische, nicht kovalent gebundene Cofaktoren: Flavinadenindinukleotid (FAD) und einen zweiten „Antennen“-Cofaktor, der entweder Methenyltetrahydrofolat (MTHF) oder 8-Hydroxy-5-deazaflavin (8-HDF) ist. FAD ist der katalytisch aktive Cofaktor. Der zweite Cofaktor ist für die Erhöhung der Quantenausbeute verantwortlich; er ist für die Reaktion nicht essentiell (Payne und Sancar 1990) und weist eine relativ geringe Affinität zum Enzym auf. Alle bis jetzt identifizierten Photolyasen sind monomere Enzyme von etwa 55 kDa Molekulargewicht. 1995 konnten Park und Mitarbeiter (Park et al. 1995) die Kristallstruktur der CPD-Photolyase aus *Escherichia coli* aufklären (Abb. 1.6.).

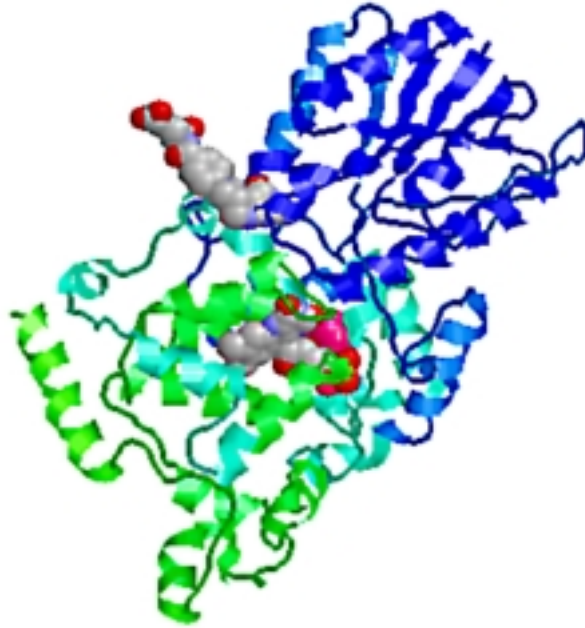


Abb. 1.6.: Raumstruktur der DNA-Photolyase aus *E. coli* (Park et al. 1995) (Protein-Datenbank-Nummer 1DNP). Die beiden Cofaktoren FAD und MTHF sind in Kalotten-Modellen dargestellt.

Der Cofaktor MTHF ist seitlich nur mit dem Pterin-Rest im Enzym verankert und ragt mit dem poly-Glutamat-Rest aus dem Enzym heraus, was die geringe Affinität erklärt. FAD andererseits ist tief im inneren des Enzyms gebunden, was wiederum die große Affinität erklärt. Die Kristallstruktur wurde ohne gebundenes Substrat gelöst, so dass über die Substratbindungsregion wenig Aussagen gemacht werden können, obwohl es einige Simulationsmodelle zur Substratbindung gibt (Vande Berg und Sancar 1998, Sanders und Wiest 1999, Hahn et al. 1999, Antony et al. 2000). 1997 konnte die Kristallstruktur der CPD-Photolyase des Cyanobakteriums *Anacystis nidulans* gelöst werden (Tamada et al. 1997). Diese Typ I Photolyase besitzt 8-HDF als 2. Cofaktor und hat ca. 30 % Sequenzhomologie zur *E. coli* Photolyase. Auffällig ist die räumlich fast identische Struktur der beiden Photolyasen, obwohl unterschiedliche zweite Cofaktoren gebunden sind.

CPD-Photolyasen können zwei verschiedene Reaktionen katalysieren: Erstens die Reparatur von Cyclobutan-Dimeren. Der vermutete Reaktionsmechanismus geht von folgendem Schema aus (siehe auch Abb. 1.7.): DNA-Photolyase bindet in einem lichtunabhängigen Schritt an die DNA und erkennt das Substrat (Sancar et al. 1985). Der zweite Chromophor absorbiert ein Lichtquant und transferiert die Energie mittels Förster-Mechanismus auf das vollreduzierte, anionische  $FADH^-$ . Das angeregte  $FADH^-$  gibt ein Elektron auf das Substrat

ab. Das Dimer wird gespalten und das Elektron auf das  $\text{FADH}^0$  rücktransferiert, um katalytisch aktives  $\text{FADH}^-$  wiederherzustellen.

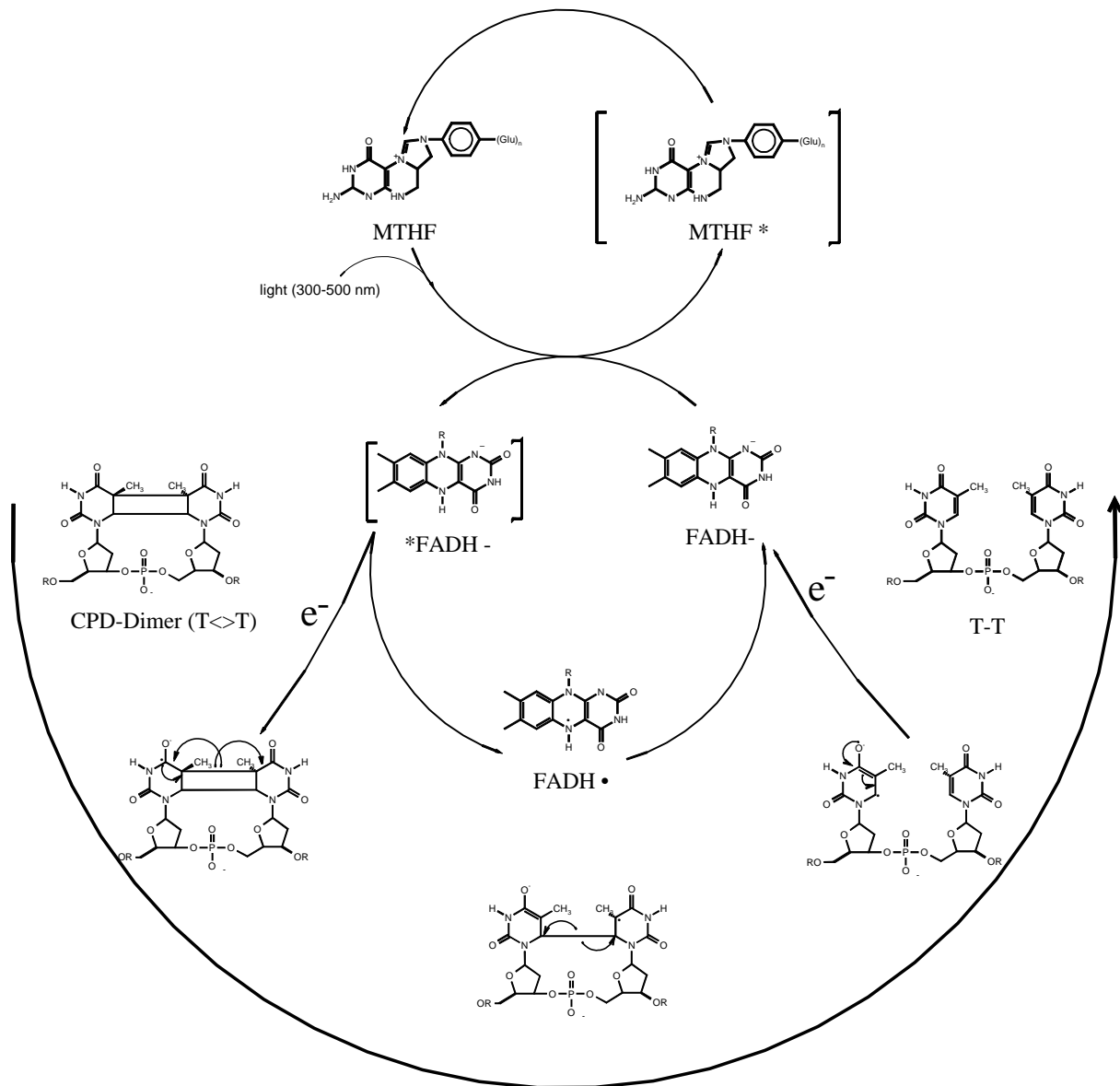


Abb. 1.7.: Vermuteter Reaktionsmechanismus einer CPD-Photolyase.

Zweitens kann in vitro die Photolyase „photoaktiviert“ werden, wenn die Oxidationsstufe des  $\text{FADH}^-$  nicht der voll reduzierten Form entspricht. FAD ist ein zwei-Elektronen-System und kann entsprechend drei Oxidationszustände haben: oxidiert, radikalisch und reduziert. Durch Bestrahlung mit Licht können Elektronen vom Enzym auf FAD übertragen werden. Durch Mutationsanalyse (Li et al. 1991) und EPR-Spektroskopie (Kim et al. 1993) konnte Trp306 als Elektronen-Donor identifiziert werden. Das Elektron wird über die beiden hochkonservierten Tryptophane 359 und 382 zum FAD hin übertragen (Cheung et al. 1999, Aubert et al. 2000).

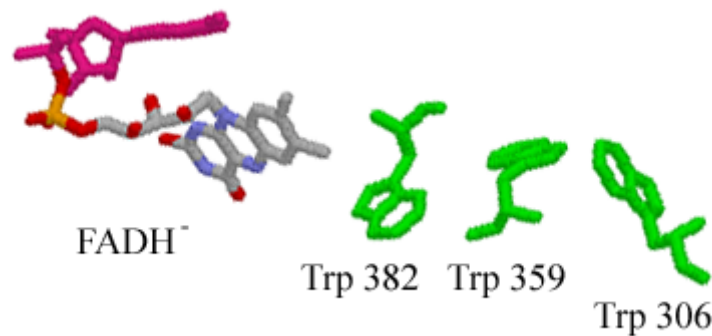


Abb. 1.8.: Elektronenübertragungsweg vom Trp306 auf FAD. Zur Vereinfachung wurde restliche Proteinumgebung ausgespart.

### 1.4.2. (6-4)-Photolyase

Enzyme mit (6-4)-Reparatureigenschaften wurden bis jetzt nur in höheren Organismen entdeckt (Todo et al. 1996; Todo et al. 1997; Kobayashi et al. 2000; Nakajima et al. 1998) und sind evolutionär eher mit Typ I Photolyasen verwandt. Alle (6-4) Photolyasen sind monomere Enzyme von etwa 60 kDa Molekulargewicht, die als Cofaktoren nicht kovalent gebundenes FAD und MTHF besitzen. Im Gegensatz zu den CPD-Photolyasen sind bislang keine Kristallstrukturen veröffentlicht worden.

Der Reparaturmechanismus beinhaltet zwei essentielle Reaktionsschritte. Ein erster Protonierungs/Deprotonierungsschritt führt zur Bildung der Oxetan/Azetin-Zwischenstufe (Hitomi et al. 2001), in dem die beiden in (6-4) Photolyasen hochkonservierten Aminosäuren His354 und His358 eine entscheidende Rolle spielen. In einem zweiten Schritt wird entsprechend dem postulierten Mechanismus der CPD Spaltung ein Elektron vom FADH<sup>-</sup> auf das Oxetan/Azetin übertragen und so das Dimer gespalten (Hitomi et al. 1997).

### 1.4.3. Blaulichtrezeptoren (Cryptochrome)

1993 wurden von Ahmad und Mitarbeitern ein der Photolyase weitgehend homologes Gen in *Arabidopsis thaliana* identifiziert, das nach Mutation einen Defekt in der Antwort auf Blaulicht verursachte (Ahmad und Cashmore 1993), aber keine DNA Reparaturaktivität aufwies (Malhotra et al. 1995). Die Analyse des Gens ergab N-terminal eine große Ähnlichkeit mit DNA-Photolyasen, C-terminal eine Kinase-ähnliche Domäne. Als Cofaktoren

konnten MTHF und FAD identifiziert werden (Lin et al. 1995). Die Enzym-Klasse wurde nach den lang gesuchten pflanzlichen Blaulichtrezeptoren Cryptochrome (CRY) benannt. 1996 wurden im Menschen zwei Gene hCRY1 und hCRY2 identifiziert (Hsu et al. 1996). Während die pflanzlichen Cryptochrome auch an der Blütezeit und am Hypokotylwachstum beteiligt sind (Lin 2000), sind alle Cryptochrome an der Steuerung der circadianen Uhr beteiligt (Sancar 2000).

## 1.5. Aufgabenstellung

Diese Arbeit hatte folgende Ziele: Um spektroskopische Untersuchungen mit DNA-Photolyase und Substrat durchführen zu können, musste ein stabiles Expressionssystem für das Protein gewährleistet sein, das eine gleichbleibende Chargenqualität sichert. Darüber hinaus sollte das Protein nach Reinigung in einer einheitlichen Oxidationsstufe vorliegen, um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten. Um die für spektroskopische Untersuchungen notwendigen Stabilisotopenmarkierungen von Enzym, Cofaktor und Substrat durchführen zu können, muss ein passendes Expressionssystem gefunden werden, welches gute Einbauraten sowohl beim Enzym als auch bei den Cofaktoren liefert. Das Substrat muss in definierten Mengen und in definierter Form vorliegen.

Um Vergleichsmessungen durchführen zu können, sollten weitere Expressionssysteme mit DNA-Photolyasen aus anderen Organismen hergestellt und die exprimierten Proteine gereinigt werden.

Mit den gereinigten Proteinen sollten spektroskopische Daten mit Fourier-Transform-Infrarot-Spektroskopie und paramagnetischer Elektronenspin-Resonanz-Spektroskopie durchgeführt und ausgewertet werden, um den Reaktionsmechanismus der DNA-Photolyase näher zu charakterisieren.



## 2. Materialien und Methoden

### 2.1. Material

#### 2.1.1. Geräte

Autoclav	Sanoclav (Wolf, Geislingen) Certoklav (Kelomat, Traun/Österreich)
Brutschrank	Inkubator Psychrotherm (New Brunswick Scientific Co., New Brunswick, N. J./USA)
DNA-Sequenzierung	ABI-Prism 377 DNA Sequencer (Perkin Elmer, Norwalk, USA)
Elektroporator	Gene Pulse mit Pulse Controller (Biorad, München)
Fluorometer	TKO 100 (Hoefer Scientific Instruments, San Francisco/USA)
Gelelektrophorese	Elektrophoresekammern und Gelträger für DNA–Elektrophorese (Appligene, Heidelberg) Elektrophoresekammern und Gelträger für PAGE Mighty Small II (Hoefer Scientific, San Francisco, USA) Spannungsversorgung ( Pharmacia, Freiburg)
HPLC-Anlage	Integrator SP 4270 (Spectra-Physics), Pumpe SP 8810 4270 (Spectra-Physics) und Knauer 64 (Knauer, Berlin), Fluorescence-Spektrophotometer RF-530 (Shimadzu), HP 1504A Diodenarraydetektor (Hewlett Packard, Boise, Idaho, USA), $\beta$ -RAM (Biostep, Jahnsdorf),Automatischer Probengeber ASI 45 (Kontron) und AS-100 HRLC (Bio-Rad), Reversed Phase Säulen (Schambeck, Bad Honnef)
Kühlzentrifugen	Sorvall-Zentrifugen RC-2B und RC-5B (DuPont, Bad Homburg) mit den Rotoren GS-3, GSA und SS-34 (Sorvall Inc., Newton, Connecticut/USA) GS-15R mit Rotor S4180 (Beckmann, Fullerton, USA)
Leuchttisch	UV-Leuchttisch (312 nm) (Bachofer, Reutlingen)
PCR-Gerät	Gene Amp PCR-System 2400 und 9600 (Perkin Elmer Norwalk, USA)
pH-Meter	E 603 mit Standard Glaselektrode (Deutsche Metrohm, Filderstadt)

Proteinreinigung	Komplettsysteme vom Typ HiLoad, Piccolo und FPLC (Pharmacia Biotech, Freiburg)
Schüttelinkubator	Innova 4230 (New Brunswick Scientific Co., New Brunswick, N. J./USA)
Spektralphotometer	UV-VIS-Spektralphotometer Ultraspec Plus (Pharmacia, Freiburg) mit Quarzküvetten(Helma/Mühlheim, Baden) für die RNA-KonzentrationsbestimmungSpektralphotometer Novaspec II (Pharmacia, Freiburg) für die OD600-Messungen und die Proteingehaltsbestimmungen.
Tischzentrifuge	A14 (Jouan, Unterhaching)
Thermoblock	Teche DRI-Block DB-2A (Gesellschaft für Laborgeräte mbH, Wertheim)
Trocknung	Rotovac (Biotec-Fischer, Reiskirchen).
Ultraschallgerät	Sonifier B-12A (Branson SONIC Power Company, Danburg, USA)
Videodokumentation	(Fröbel Labortechnik, Wasserburg)

### 2.1.2. Chemikalien und Enzyme

Chemikalien wurden von den Firmen Sigma (Deisenhofen), Serva (Heidelberg), Biomol (Hamburg) und Merck (Darmstadt) bezogen.

Restriktionsendonukleasen, DNA-modifizierende und andere Enzyme stammten von Boehringer (Mannheim), Gibco-BRL (Eggenstein) und New England Biolabs (Schwalbach/Taunus). Stabilisotopenmarkierte Verbindungen wurden von Cambridge Isotope Laboratories (Andover, MA, USA) bezogen. Der DNA-Molekulargewichtsmarker stammte von PEQlab (Erlangen), der Molekulargewichtsmarker für SDS-PAGE stammte von Sigma (Deisenhofen).

### 2.1.3. Bakterien-Stämme

Die verwendeten Bakterien-Stämme sind in Tab.2.1. aufgeführt.

Stamm	Genotyp	Quelle und Referenz
<i>E. coli</i>		
XL1-blue	recA1,endA1,gyrA96,thi-1,hsdR17,supE44,relA1,lac [F'proAB lac <sup>q</sup> ZΔM15 Tn10(tet <sup>r</sup> )	(Bullock et al. 1987)
M15 [pGB3]	lac,ara,gal,mtl,recIA <sup>+</sup> ,uvr <sup>+</sup> [pGB3,lacI,bla <sup>r</sup> ]	(Zamenhof et al. 1972)
M 15 [pREP4]	lac,ara,gal,mtl,recIA <sup>+</sup> ,uvr <sup>+</sup> , [pREP4, lacI, kan <sup>R</sup> ]	(Zamendorf et al. 1972)
BI21 [pREP4]	[pREP4, lacI, kan <sup>R</sup> ]	(Ostanin et al. 1992)
<i>B. subtilis</i>		
BR151 [pBL1]	trpC2, lys-3, metB10 [pBL1,lacI,ery <sup>r</sup> ]	(Williams et al. 1981)
RB 50	Pur-60, Ag <sup>r</sup> -11, Dc <sup>r</sup> -15, MS <sup>r</sup> -46, RoF <sup>r</sup> -50	(Perkins et al. 1998)
<i>A. nidulans</i>		
ATCC Nr. 27144	--	(Rippka, R. 1988)
<i>Thermus thermophilus</i>		
HB27	--	(Williams et al. 1995)

Tab.2.1.: Verwendete Bakterien-Stämme

#### 2.1.4. Verwendete Plasmide

Folgende Plasmide wurden verwendet:

Plasmid	Größe [kbp]	Resistenz	Bezugsquelle
pNCO 113 (pDS56/RBSII)	3,42	Ampicillin	(Stüber et al. 1990)
pREP4	3,74	Kanamycin	(Zamenhof et al. 1972)
pZERO2	3,3	Kanamycin	Invitrogene (Bernard et al. 1993)
pGEX-4T-1	4,95	Ampicillin	Pharmacia (Freiburg)
p602/22-CAT	5,8	Kanamycin	(Henner 1990)
pB11	5,27	Erythromycin	(Henner 1990)

Tab.2.2.: Verwendete Plasmide

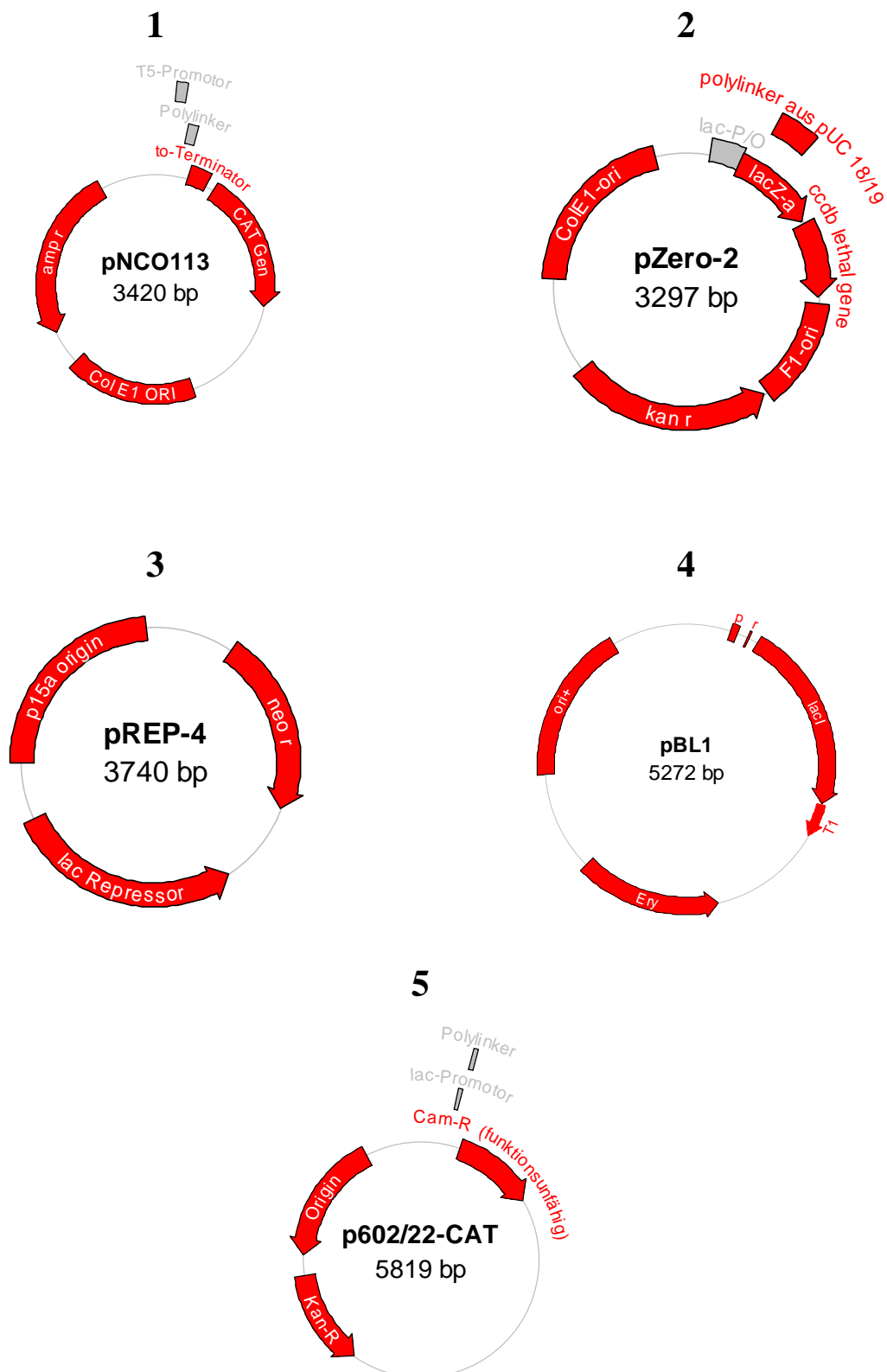


Abb.2.1.: Schematische Darstellung der verwendeten Plasmide: 1: pNCO113, 2: pZERO2, 3: pREP4, 4: pBL1, 5: p602/22-CAT.

## 2.1.5. Verwendete Primer

Primer	Sequenz (5'-3')	Restriktionsschnittstelle
PLY1	GAGCGGATAACAATTCACACAG	-
PLY5	ACAGGAGTCCAAGCTCAGCTAATT	-
PLY-mis	CCC <b>GGG</b> CCCGCGC <u>AT</u> TCAC <u>TT</u> CATACTG	AvaI

Tab. 2.3.: DNA-Primer für die E109A-Mutation der DNA-Photolyase: Nicht passende Basen sind unterstrichen, Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme sind fett dargestellt

Primer	Sequenz (5'->3')	Orientierung	Verwendung
ANA-1A	CGGCTCCAGTAAATCAGCCTTC	vorwärts	Klonierung
ANA-1B	CAGTTCTGAACTTGCACGCTCTTTATTG	rückwärts	Klonierung
ANA-2A	<u>GAGGAGAAATTAACCGTGGCGGCTCCGA</u> TTCTG	vorwärts	Klonierung
ANA-2B- Hind	CATAATTCAGTTAAGCTTTTGCACGCT CTTTATTGAAGC	rückwärts	Klonierung
KEco RI	<u>ACACAGAATTCATTA</u> AAAGAGGAGAAATT AACCATG	vorwärts	Klonierung
ANA-3A-500	ACCCTACGGCCGCGATCGCGATG	vorwärts	Sequenz
ANA-3A-901	GAAGCAGGAACCTCGGGCTTGAG	vorwärts	Sequenz
pNCO(-180)	GTGAGCGGATAACAATTCACAC	vorwärts	Sequenz
pNCOterm	CTCCATTTTAGCTTCCTTAGCTCCTG	rückwärts	Sequenz

Tab. 2.4.: DNA-Primer für die Klonierung der DNA-Photolyase aus *A. nidulans*: Nicht passende Basen sind unterstrichen, RBS ist kursiv dargestellt, Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme sind fett dargestellt

Primer	Sequenz (5'→3')	Orientierung	Verwendung
TH-1A	CCCCAAGGCCGGAGGGAAG	vorwärts	Klonierung
TH-1B	GCACTCTACCGGGGAAGCCC	rückwärts	Klonierung
TH-4A-Nco	<u>GAGAAATTAACCATGGGCCCCACTTCTC</u>	vorwärts	Klonierung
TH-4B-Bam	<u>GGTCTAGAGGATCCCTACCCTCGGGCG</u> AG	vorwärts	Klonierung
TH-220	CTCCCTTGGGAGAAGGTGC	vorwärts	Sequenz
TH-660	TCGAGGCTCTCCCCCTACTTCG	vorwärts	Sequenz

Tab. 2.5.: DNA-Primer für die Klonierung der DNA-Photolyase aus *T thermophilus*: Nicht passende Basen sind unterstrichen, Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme sind fett dargestellt

### 2.1.6. Kulturmedien

Die angegebenen Mengen wurden in jeweils 1 L entionisiertem Wasser gelöst und, wenn nicht anders angegeben, bei 121 °C und 1,2-1,5 bar 20 min. sterilisiert. Für Platten wurden 20 g/L Agar zugesetzt. Mit einem Stern (\*) bezeichnete Lösungen wurden sterilfiltriert. Alle Antibiotika wurden als sterile Stocklösung dem abgekühlten Medium zugegeben.

#### LB-Medium:

10 g Caseinhydrolysat (Pepton)  
5 g Hefeextrakt  
5 g NaCl

#### LB-Medium/Glycerin:

10 g Caseinhydrolysat (Pepton)  
5 g Hefeextrakt  
5 g NaCl  
400 mL Glycerin

**B. Subtilis Mineral-Medium**

**Mineral Medium:** 10 % (v/v) TSS  
0,4 % (v/v) Vitamin-Mix  
0,1 % (v/v) Spurenelement-Mix  
5 g/L Glucose (Stocklösung 500 g/L)  
1 g/L NH<sub>4</sub>Cl (Stocklösung 200 g/L)  
0.138 g/L MgSO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O (Stocklösung 138 g/L)  
5,5 mg/L CaCl<sub>2</sub> (Stocklösung 5,5 g/L)  
auf 1l Wasser auffüllen

**TSS:**

3,5 g/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
60 g/L Tris-Base  
pH 7,4

**Vitamin-Mix\*:**

20 mg/L Pyridoxamin-Hydrochlorid  
10 mg/L Thiamin-Hydrochlorid  
20 mg/L para-Aminobenzoesäure  
20 mg/L Calcium-Pantothenat  
5 mg/L Biotin  
10 mg/L Folsäure  
100 mg/L Cyanocobalamin (1/1000 Mannit-Verreibung)  
(20 mg/L Riboflavin bei nicht stabilisotopen markierten Anzuchten)

**Spurenelemente-Mix\*:**

16 g/L MnCl<sub>2</sub> · 4H<sub>2</sub>O  
15 g/L CuCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O  
27 g/L CoCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O  
37,5 g/L FeCl<sub>3</sub>  
40,8 g/L Na-citrat  
84 mg/L Zn-acetat · 2H<sub>2</sub>O  
50 mg/L Na<sub>2</sub>-EDTA

**Aminosäure-Mix (100x): (Stamm RB50)**

Je 1,5 g/L Alanin, Leucin, Valin, Arginin, Lysin, Prolin,  
Isoleucin, Methionin und Tyrosin (Histidin bei <sup>14</sup>N-Anzuchten)  
Tryptothan wird einzeln sterilfiltriert und getrennt gelagert

**Aminosäure-Mix\*: (Stamm BR151 [pB11] [p602E109A])**

Je 20 mg/L Methionin, Threonin, Lysin und Tryptophan

**SOC-Medium:**

20 g Caseinhydrolysat  
5 g Hefeextrakt  
10 mM NaCl  
2,5 mM KCl  
10 mM MgCl<sub>2</sub>  
10 mM MgSO<sub>4</sub>  
20 mM Glucose

**Mineral-Medium für *A. nidulans*:**

1,5 g NaNO<sub>3</sub>  
0,04 g K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
0,075 g MgSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O  
0,036 g CaCl<sub>2</sub> · 2 H<sub>2</sub>O  
6 mg Zitronensäure  
6 mg Ammonium-Eisencitrat  
1 mg EDTA  
0,02 g NaCO<sub>3</sub>  
1 mL Spurenelement-Mix  
12 g Agar (für Platten)  
pH auf 7,1 einstellen

**Voll-Medium für *T. thermophilus*:**

4 g/L Hefeextrakt  
8 g/L Trypton  
2 g/L NaCl



pH 7,4

### 2.1.7. Puffer und Stammlösungen

#### Acrylamidlösung für SDS-Gele:

38,8 % (w/v) Acrylamid

1,2 % (w/v) N,N'-Methylenbisacrylamid

#### Antibiotika-Stammlösungen\*:

Ampicillin: 180 mg/mL in Wasser

Kanamycin: 15 mg/mL in Wasser

Erythromycin 10 mg/mL in Ethanol

Chloramphenicol 34 mg/mL in Ethanol

#### APS:

10 % (w/v) Ammoniumperoxodisulfat-Lösung

#### Aufbewahrungslösung für SDS-Elektrophorese:

50 mL Methanol

75 mL Eisessig

875 mL H<sub>2</sub>O

#### Elektrophoresepuffer für SDS-Elektrophorese:

25 mM Tris

192 mM Glycin

0,1 % (w/v) SDS

pH 8,3

#### Entfärbelösung I für SDS-Gelelektrophorese:

500 mL Methanol

100 mL Eisessig

400 mL H<sub>2</sub>O

**Entfärbelösung II für SDS-Gelelektrophorese:**

300 mL Methanol  
100 mL Eisessig  
600 mL H<sub>2</sub>O

**Extraktionspuffer:**

0.25 % Tween-20  
37,2 mg/L EDTA

**Färbelösung für SDS-Gelelektrophorese:**

2,5 g Coomassie Blue R 250  
454 mL Methanol  
454 mL H<sub>2</sub>O  
92 mL Eisessig

**Probenpuffer (Agarosegelelektrophorese):**

50 % (v/v) Glycerin  
0,25 % (w/v) Bromphenolblau  
0,25 % (w/v) Xylencyanol  
gelöst in TE-Puffer

**Saline:**

0,9 % (w/v) NaCl in entionisiertem Wasser

**Sammelgelpuffer (SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese):**

30,25 g/L Tris-HCl  
0,2 % (w/v) SDS  
pH 6,3 mit HCl eingestellt

**SAMPLE-Puffer:**

7,5 g/L Tris-HCl  
3 %  $\beta$ -Mercaptoethanol  
3 % SDS  
pH 6.8 mit HCl eingestellt

**STET-Puffer:**

8 % (w/v) Saccharose  
5 % (v/v) Triton X-100  
6,05 g/L Tris-HCl  
18,61 g/L EDTA  
pH 8,0 mit HCl eingestellt

**TAE-Puffer 50x:**

242 g/L Tris-Acetat  
37,2 mg/L EDTA  
pH 8,2 mit Acetat eingestellt

**TE-Puffer:**

12,1 g/L g/L Tris-HCl  
372,24 mg/L EDTA  
pH 8,0 mit HCl eingestellt

**TNE-Puffer 10x:**

12,1 g/L Tris-HCl  
3,72 g/L EDTA  
58,5 g/L NaCl  
pH 7,4

**Trenngelpuffer (SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese):**

181,5 g/L Tris  
0,4 % (w/v) SDS  
pH 8,8 mit HCl eingestellt

## 2.2. Proteinchemische Methoden

### 2.2.1. Stammhaltung und Wachstum

#### 2.2.1.1. Stammhaltung

Bakterienkulturen wurden auf Agarplatten bzw. in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Von den Platten wurde alle vier Wochen überimpft; Stickstoffkulturen wurden nach jeder Entnahme neu angelegt. Dazu wurden 4 mL einer Übernacht-Kultur abzentrifugiert, das Pellet in 1 mL LB-Glycerin Medium resuspendiert und eingefroren.

Flüssigkulturen wurden in Erlenmeyerkolben im Schüttelinkubator zwischen 25 und 37 °C angezogen. Volumina bis 10 ml wurden mit Einzelkolonien angeimpft (1 Kolonie pro 10 ml Medium), größere Volumina mit Übernacht-Kultur im Verhältnis 1:100.

#### 2.2.1.2 Bakterienwachstum

Das Wachstum von Flüssigkulturen wurde durch Messung der optischen Dichte bei 600 nm ( $OD_{600}$ ) gegen entionisiertes Wasser als Nullwert verfolgt.

### 2.2.2. Expressionstest

#### 2.2.2.1. Anzucht

Von einer 2 mL Übernachtskultur wurden zwei 1,25 mL Kulturen mit je 25 µL angeimpft. Nach 3 h bei 37 °C wurde zu einer der beiden Probe IPTG bis zu einer Endkonzentration von 1 mM zugegeben, beide Proben weitere 5 h bei 37 °C kultiviert und dann durch Zentrifugieren (1 min, 14000 Upm, RT) geerntet. Nach Zugabe von 50 µl SAMPLE-Puffer wurden die Proben mittels Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt.

### 2.2.2.2. Herstellung von Rohextrakt

Zur Gewinnung des Zellproteins wurden Flüssigkulturen abzentrifugiert (10 min, 4800 Upm, 4 °C), das Sediment einmal mit 1 mL Saline gewaschen, die Zellen in 600-800 µL Aufschlußpuffer resuspendiert und mittels Ultraschallbehandlung (6 Pulse Stufe 5, Abgabeleistung Stufe 4) unter Eiskühlung aufgeschlossen. Nach Abzentrifugieren der Zelltrümmer konnte der Überstand direkt weiterverwendet werden.

### 2.2.2.3. Analyse von Einschlußkörpern

Zum Sediment, das nach dem Ultraschallaufschluß erhalten wurde, werden 300 µL SAMPLE-Puffer gegeben und 15 min gekocht. Nach Abzentrifugation des Sediments werden 8 µL des Überstands mittels Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt.

### 2.2.3. Großanzucht von *E. coli*-Stämmen

Als Vollmedium wurde LB-Medium verwendet, welches mit den entsprechenden Antibiotika komplementiert wurde. 3 L LB-Medium wurden mit einer Übernachtskultur 1/100 überimpft und bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Bei einer OD<sub>600</sub> von 0,5-0,7 wurde IPTG in einer Endkonzentration von 1 mM zugegeben und über Nacht geschüttelt. Die Zellen wurden pelletiert (20 min, 4000 Upm, 4 °C), mit 100 mL Saline gewaschen, erneut pelletiert (30 min, 4800 Upm, 4 °C) und anschließend bei -20 °C gelagert.

### 2.2.4. Großanzucht von *B. Subtilis*-Stämmen

Als Vollmedium wurde LB-Medium verwendet, welches mit den entsprechenden Antibiotika komplementiert wurde. Als normale Anzuchttemperatur wurde wegen dem hitzesensitiven origin des Plasmids [pB11] 30-32 °C gewählt. 5 L LB-Medium wurden mit einer Übernachtskultur 1/100 überimpft und bei 32 °C unter Schütteln inkubiert. Bei einer OD<sub>600</sub>

von 0,7 wurde IPTG in einer Endkonzentration von 1 mM zugegeben und über Nacht geschüttelt. Die Zellen wurden pelletiert (20 min, 4000 Upm, 4 °C), mit 100 mL Saline gewaschen, erneut pelletiert (30 min, 4800 Upm, 4 °C) und anschließend bei -20 °C gelagert.

### 2.2.5. Anzucht von *A. nidulans*

Als optimale Anzuchtbedingungen wurden 26 °C unter Belichtung im Erlenmeyerkolben mit Schikanen gewählt. Nach Animpfen von 2 mL Medium aus einer Dauerkultur wurde 2 Tage geschüttelt, danach auf 20 mL Medium überimpft und weitere 3 Tage geschüttelt. Zuletzt wurde auf 100 mL Medium überimpft, und weitere 4 Tage geschüttelt. Vor jedem Überimpfen wurde die Kultur mikroskopisch auf Gesundheit und Infektionen überprüft. Die Zellen wurden durch Zentrifugation geerntet (20 min, 4000 Upm, 4 °C).

### 2.2.6. Anzucht von *T. thermophilus*

Als optimale Anzuchtbedingungen wurden 75 °C im Erlenmeyerkolben mit Schikanen gewählt. Nach Animpfen von 100 mL *T. thermophilus* Mediums aus einer Dauerkultur wurde über Nacht geschüttelt und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 3,5 geschüttelt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation geerntet (20 min, 4000 Upm, 4 °C).

### 2.2.7. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Proteingemische wurden durch Gelelektrophorese in denaturierenden SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt (Laemmli 1970). Es wurde ein diskontinuierliches System, bestehend aus Sammel- und Trenngel, verwendet. Zunächst wurde das Trenngel in die Kammer gegossen und polymerisiert, wobei mit einer 50 % igen Isopropanollösung überschichtet wurde. Nach Entfernung der Isopropanollösung nach 1 h mit Wasser, wurde das Sammelgel aufgetragen und 1 h polymerisiert. Das fertige Gel wurde in die Elektrophoreseapparatur eingesetzt und der Elektrophoresepuffer zugegeben. Die Proben wurden zuvor in SAMPLE-Puffer 1:1 verdünnt und 10 min auf 95 °C erhitzt.

Folgende Lösungen wurden dazu angesetzt:

**Trenngel (10 %):**

2,50 mL Acrylamidlösung  
2,50 mL Trenngelpuffer  
5,00 mL  $H_2O$   
75  $\mu$ L PS  
5  $\mu$ L TEMED

**Sammelgel (3 %):**

0,5 mL Acrylamidlösung  
2,5 mL Sammelgelpuffer  
2,0 mL  $H_2O$   
75  $\mu$ l APS  
5  $\mu$ l TEMED

Die Elektrophorese wurde bei konstantem Strom (20 mA pro Gel) durchgeführt und war nach etwa 1 h beendet. Die Gele wurden in Färbelösung mindestens 1 h gefärbt und danach in Entfärbelösung I 30 min und in Entfärbelösung II 4-5 h entfärbt. Als Proteinstandard diente eine Probe mit Proteinbanden bei 66, 44, 36, 29, 24, 20 und 14 kDa.

## 2.2.8. Herstellung von stabilisotopen-markiertem Riboflavin

### 2.2.8.1. Anzuchtbedingungen

Es wurde Vorkultur von 100 mL Volumen in *B. Subtilis* RF69 Mineral-Medium angeimpft und mit 60 mg/L Chloramphenicol komplementiert. Am nächsten Tag wird die Hauptkultur (2-4 L Kultur) 1/100 überimpft und täglich  $OD_{600}$  und  $OD_{450}$  nach Zentrifugation der Zellen (1 min, 14000 Upm, RT) bestimmt. Ändert sich die  $OD_{450}$  nicht mehr, werden die Zellen durch zweimaliges Zentrifugieren (20 min, 4000 Upm, 4 °C) geerntet.

### 2.2.8.2. Reinigung des Riboflavins

Die Zellen werden verworfen und der Überstand auf eine Florisil-Säule ( $V = 100 \text{ mL}$ ) aufgetragen und solange mit Wasser gespült, bis bei  $250 \text{ nm}$  keine Absorption mehr festgestellt werden konnte. Eluiert wurde mit einem Gemisch von  $70 \%$  (v/v) Aceton,  $5 \%$  (v/v)  $\text{NH}_3$ ,  $25 \%$  Wasser. Das Eluat wurde am Rotationsverdampfer auf ca. halbes Volumen eingengt und anschließend mit  $\text{HCl}$  neutralisiert. Dann wurde die Lösung bis auf ca.  $1 \text{ mL}$  an der Lyophille eingengt und das ausgefallene Riboflavin abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Die Ausbeute an Riboflavin betrug ca.  $1 \%$  bezogen auf eingesetzte Glucose.

### 2.2.9. Herstellung von stabilisotopenmarkierter Photolyase

#### 2.2.9.1. Herstellung von Photolyase mit stabilisotopen-markiertem Riboflavin

Als Medium wurde *B. Subtilis* Mineral-Medium verwendet, dem  $3 \text{ mg/L}$  markiertes Riboflavin zugegeben wurde.  $5 \text{ L}$  Mineral-Medium, das mit  $10 \text{ mg/L}$  Erythromycin und  $15 \text{ mg/L}$  Kanamycin komplementiert wurde, wurden mit einer Übernachtskultur BR151 [pB11] [p602E109A] in LB-Medium  $1/100$  überimpft und bei  $32 \text{ }^\circ\text{C}$  unter Schütteln inkubiert. Bei einer  $\text{OD}_{600}$  von  $0,7$  wurde IPTG in einer Endkonzentration von  $1 \text{ mM}$  zugegeben und über Nacht geschüttelt. Die Zellen wurden pelletiert ( $20 \text{ min}$ ,  $4000 \text{ Upm}$ ,  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ ), mit  $100 \text{ mL}$  Saline gewaschen, erneut pelletiert ( $30 \text{ min}$ ,  $4800 \text{ Upm}$ ,  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ ) und anschließend bei  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  gelagert. Das nicht metabolisierte Riboflavin wurde wie unter 2.2.6.2. beschrieben rückgereinigt.



### 2.2.9.2. Herstellung von stabilisotopenmarkiertem Apoenzym und Cofaktor

Als Medium wurde *B. Subtilis* Mineral-Medium verwendet, dem 2 g/L U-<sup>15</sup>NH<sub>4</sub>Cl, 10 mg/L Erythromycin und 15 mg/L Kanamycin zugegeben wurde. 5 L Mineral-Medium wurden mit einer Übernachtskultur BR151 [pB11] [p602E109A] in LB-Medium 1/100 überimpft und bei 32 °C unter Schütteln inkubiert. Bei einer OD<sub>600</sub> von 0,7 wurde IPTG in einer Endkonzentration von 1 mM zugegeben und über Nacht geschüttelt. Die Zellen wurden pelletiert (20 min, 4000 Upm, 4 °C), mit 100 mL Saline gewaschen, erneut pelletiert (30 min, 4800 Upm, 4 °C) und anschließend bei -20 °C gelagert.

### 2.2.10. Proteinreinigung

#### 2.2.10.1. Reinigung der DNA-Photolyase aus *E. coli*

##### 2.2.10.1.1. Allgemeine Arbeitsbedingungen

DNA-Photolyase aus *E. coli* ist ein instabiles Enzym. Es neigt unter oxidativen Bedingungen zur Selbst-Aggregation; außerdem kann der katalytische Kofaktor FAD in drei verschiedenen Oxidationsstufen vorliegen, die Licht- und Luftabhängig ineinander umgewandelt werden können. Deshalb sollten ALLE Arbeiten mit dem Enzym unter Sauerstoffausschluß durchgeführt werden, zur Verhinderung einer Oxidationsstufenveränderung wird das Enzym nur in abgedunkelten Behältern bei wenigstens -70 °C gelagert.

##### 2.2.10.1.2. Puffer

Puffer A:                    50 mM 2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazino]-ethanesulfonic acid  
                                  (HEPES)  
                                  10 mM DTT  
                                  100 mM NaCl

---

	10% (w/v) Saccharose pH 7.0
Puffer B	50 mM HEPES 100 mM KCl 10 mM DTT 10% (v/v) Glycerin pH 7.0
Puffer C	50 mM HEPES 2 M KCl 10 mM DTT 10% (v/v) Glycerin pH 7.0
Puffer D	50 mM HEPES 50 mM NaCl 10 mM DTT 10% (v/v) Glycerin pH 7.0
Puffer E	50 mM HEPES 0,1 mM KCl 10 mM DTT 10% (v/v) Glycerin pH 7.0
Puffer F	50 mM HEPES 1 M KCl 10 mM DTT 10% (v/v) Glycerin pH 7.0

### 2.2.10.1.3. Zellaufschluss

Für den Zellaufschluß wurden je 5 g feuchte Zellmasse in je 20 mL Puffer A aufgetaut. Es wurde Lysozym (1 mg/1 mL Puffer), Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) (1 mM) und eine Spatelspitze DNase zugegeben und 20 min bei 4 °C unter Inertgas inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mittels Ultraschall aufgeschlossen (4 · 10 sec, Stufe 4). Die Zelldebris wurden abzentrifugiert (30 min, 14000 Upm, 4 °C) und der Rohextrakt sofort weiterverarbeitet.

### 2.2.10.1.4. Farbstoff-Affinitätschromatographie

Bei der Farbstoff-Affinitätschromatographie wird die Interaktion von Farbstoffen mit Proteinregionen ausgenutzt, die zumeist für die Bindung von Cofaktoren wie ATP, NADH, NADPH verantwortlich sind. Da die Wechselwirkungen mit der Salzkonzentration abnehmen, kann mit einem steigenden Salzgradienten Protein von der Säule eluiert werden.

Die Säule Blue Sepharose Cl-6B (Pharmacia, Freiburg; Säulenvolumen: 45 cm<sup>3</sup>) wurde zunächst mit 3 Säulenvolumen Puffer B äquilibriert. Der Rohextrakt wurde in Puffer A aufgetragen. Es wurden 10 Säulenvolumen gewaschen und dann mit einem steigenden Salzgradienten eluiert (Puffer C). Das Eluat wurde manuell gesammelt. Alle Schritte wurden bei einer Fliessgeschwindigkeit von 4 mL/min durchgeführt. Fraktionen, die das Protein enthielten, wurden vereinigt. Zum Tausch des Puffers wurden zwei verschiedene Methoden verwendet: Erstens die Ammoniumsulfat-Fällung und zweitens eine Entsalzungssäule.

### 2.2.10.1.5. Ammoniumsulfat-Fällung

Die Löslichkeit eines Proteins im wässrigen Milieu ist empfindlich von der Konzentration gelöster Salze abhängig. Bei hoher Ionenstärke sinkt die Löslichkeit eines Proteins aufgrund Konkurrenz zwischen Salz-Ionen und Protein um die solvatisierenden Moleküle. Somit kann eine einfache und schnelle Aufkonzentrierung und gleichzeitige Umpufferung einer Proteinlösung durch Ausfällen erreicht werden. Am häufigsten wird aufgrund seiner guten Löslichkeit in Wasser und hohen Ionenstärke Ammoniumsulfat verwendet.

Die enthaltene Photolyase-Lösung wird mit Ammoniumsulfat-Lösung (0.43 g/mL) versetzt, 2 min inkubiert, zentrifugiert (6000 Upm, 10 min, 4 °C) und der Überstand verworfen. Das Zentrifugat wird in möglichst wenig neuem Puffer D resuspendiert und weiterverarbeitet.

### 2.2.10.1.6. Entsalzungssäule

Proteine werden aufgrund unterschiedlicher Größe in einer Matrix aus feinporigen Agarose-Kügelchen getrennt. Entsalzungssäulen funktionieren nach demselben Prinzip wie Gelfiltrationen, außer dass das Ausschlussvolumen kleiner als alle Proteine ist. Dadurch wird kein Protein durch Kapillaren aufgehalten, während Salz und niedermolekulare Substanzen in den Poren zurückgehalten werden. So kann einfach, schnell und ohne Verlust an Protein umgepuffert werden.

Es wurde die Entsalzungssäule HiPrep 26/10 Desalting ( $V_0 = 39,81$  mL,  $V_f = 96,50$  mL; Pharmacia, Freiburg) mit einem Ausschlussvolumen von 5 kDa verwendet. Die Säule wurde mit 2 Säulenvolumen Puffer D äquilibriert. Die Proteinprobe wurde in maximal 10 mL Quell-Puffer auf die Säule aufgetragen und bei einer Fließgeschwindigkeit von 5 mL/min eluiert. Protein enthaltende Fraktionen wurden vereinigt.

### 2.2.10.1.7. Affinitätschromatographie

Bei Affinitätschromatographie wurde das Säulenmaterial Heparin-Sepharose CL-6B (Pharmacia, Freiburg; Säulenvolumen: 30 cm<sup>3</sup>) verwendet. Das Material besteht aus 6 % quervernetzter Agarose, die 3 mg Heparin / mL Säulenvolumen beinhaltet. Dieses Material weist eine Affinität zu oligonukleotidbindenden Stoffen auf.

Die Säule wurde zunächst mit 3 Säulenvolumen Puffer E äquilibriert. Die Proteinlösung wurde mit Puffer D aufgetragen. Es wurden 10 Säulenvolumen gewaschen und dann mit einem steigenden Salzgradienten (Puffer F) eluiert. Das Eluat wurde manuell gesammelt. Alle Schritte wurden bei einer Fließgeschwindigkeit von 5 mL/min durchgeführt. Fraktionen, die das Protein enthielten, wurden vereinigt, erneut Ammoniumsulfat gefällt und in Puffer D aufgenommen.

### 2.2.10.1.8. Proteinkonzentrierung durch Ultrafiltration

Die Ultrafiltration diente der Konzentrierung von Proteinen. Es wurden Konzentratoren der Fa. Pall Gelman (Ann Arbor, MI, USA) mit einem Volumen von 25 mL, 2,5 mL und 0,6 mL und einer Porengröße von 10 kDa und 30 kDa verwendet. Die Porengröße wurde so gewählt, dass das gewünschte Protein zurückgehalten wurde, niedermolekulare Substanzen, kleinere Proteine und Wasser aber ungehindert die Membran durchqueren konnten.

Im Verlauf der Konzentrierung wurde die Glycerin-Konzentration je nach späterer Anwendung auf 20 % (v/v) oder 50 % (v/v) erhöht und die Photolyase-Konzentration photometrisch bei 580 nm verfolgt. Erreichte die Konzentration an Radikal 1 mM, wurde das Enzym bei  $-70\text{ °C}$  gelagert.

### 2.2.10.2. Reinigung der DNA-Photolyase aus *A. nidulans*

Die Reinigung der heterolog aus *E. coli* exprimierten DNA-Photolyase aus *A. nidulans* wurde analog zur Reinigung der DNA-Photolyase aus *E. coli* durchgeführt: Nachdem Aufschluss der Zellen in Puffer A wurde der Rohextrakt auf eine Blaue Sepharose aufgetragen, mit Puffer A gewaschen und analog mit Puffer B eluiert. Nach Ammoniumsulfat-Fällung und Entsalzung des Proteinmixes in Puffer C wurde auf eine Heparin-Sepharose aufgetragen und mit Puffer C eluiert (DNA-Photolyase aus *A. nidulans* bindet nicht an Heparin-Sepharose). Der Proteinmix wurde nun in Puffer C auf eine Mono-Q-Säule (Pharmacia, Freiburg; Säulenvolumen:  $8\text{ cm}^3$ ) aufgetragen. Das Material hat als aktive Gruppen quartäre Ammoniumverbindungen kovalent gebunden und gehört zu den starken Anionenaustauschern. Die Trennung beruht auf den einzigartigen  $pK_s$ -Werten jedes Proteins. Eluiert wurde mit Puffer F. DNA-Photolyase aus *A. nidulans* eluierte bei einem Salzgehalt von ca. 150 mM KCl. Das entsalzte Enzym wurde mittels Ultrafiltration konzentriert und bei  $-70\text{ °C}$  gelagert, wobei die Glycerinkonzentration auf 20 % (v/v) erhöht wurde.

### 2.2.10.3. Reinigung der DNA-Photolyase aus *T. thermophilus*

Die Reinigung der heterolog aus *E. coli* exprimierten DNA-Photolyase aus *T. thermophilus* wurde nach folgender Strategie gereinigt: Nachdem Aufschluss der Zellen in Puffer D (pH 6,7) wurde der Rohextrakt auf eine Blaue Sepharose aufgetragen, mit Puffer D (pH 6,7)

gewaschen und mit Puffer B (pH 6,7) eluiert. Nach Ultrafiltration des Proteinmixes wurde auf eine Gelfiltrationssäule S75-Superdex-prepgrade ( $V_0 = 39,81$  mL,  $V_f = 96,50$  mL; Pharmacia, Freiburg) aufgetragen, die mit Puffer B (pH 6,7) equilibriert war. Bei der Gelfiltration werden Proteine aufgrund unterschiedlicher Größe in einer Matrix aus feinporigen Agarose-Kügelchen getrennt. Die Proteinprobe wurde in maximal 5 mL (maximal 30 mg Protein) auf die Säule aufgetragen und mit einem Säulenvolumen Puffer von der Säule bei einer Fließgeschwindigkeit von 3 mL/min eluiert. Das Eluat wurde in 3 mL Fraktionen gesammelt und Fraktionen, die das gewünschte Protein enthielten, wurden vereinigt, durch Ultrafiltration konzentriert und bei  $-70$  °C gelagert, wobei die Glycerinkonzentration auf 20 % (v/v) erhöht wurde.

### 2.2.11. Protein-Konzentrationsbestimmungen der DNA-Photolyasen

Proteinkonzentration von DNA-Photolyasen aus *E. coli* wurde photometrisch aufgrund ihrer Absorption im sichtbaren Bereich bestimmt:

Wellenlänge [nm]	Oxidationsstufe FAD		
	oxidiert	radikalisch	reduziert
	Molarer Extinktionskoeffizient [1/M · cm]		
380	11000	6000	5680
443	11200	--	--
580	--	4800	--

Tabelle 2.6.: Molare Extinktionskoeffizienten von DNA-Photolyase aus *E. coli* in verschiedenen Oxidationsstufen (Jorns et al. 1990).

Die Absorption an den Stellen wurde vermessen und so die Konzentration bestimmt. Bei Chargen mit mehreren Oxidationsstufen des Proteins konnte so die genaue Zusammensetzung ermittelt werden (die Überlagerung einzelner Oxidationsstufen wurde additiv behandelt).

### 2.2.12. Aktivitätsbestimmung von DNA-Photolyasen

Um die Aktivität von DNA-Photolyase qualitativ abschätzen zu können, wurde ein Verfahren nach Kim und Mitarbeiter (Kim et al. 1992) angewandt. Ausgenutzt wurde dabei die Tatsache, dass photogeschädigte Thyminе aufgrund der Auflösung des quasiaromatischen Systems einen deutlich erniedrigten Extinktionskoeffizient bei 260 nm als normale Thyminе besitzen. Werden geschädigte DNA und die zu messende DNA-Photolyase mittels Weißlicht bestrahlt, kann man bei 260 nm einen Anstieg der Absorption verfolgen, wenn die DNA-Photolyase aktiv ist und die geschädigte DNA repariert. Als Reaktionspuffer wurde verwendet:

50 mM HEPES pH 7,0

100 mM NaCl

1 mM EDTA

Es wurden 0.12  $\mu\text{mol}$  18T DNA und ca. 1 pmol DNA-Photolyase pro Ansatz verwendet. Das Gesamtvolumen des Ansatzes betrug 350  $\mu\text{L}$ . Es wurde jeweils 1 min mit Weißlicht bestrahlt und dann die Änderung der Absorption bei 260 nm gemessen. Nach ca. 20 min konnten keine Änderungen mehr detektiert werden und der Versuch wurde abgebrochen. Die Änderung der Absorption sollten ca. 25 % betragen. Aufgrund der geringen Änderungen bei 260 nm und der starken Eigen-Absorption der DNA-Photolyase eignete sich dieser Test nur für qualitative Aussagen.

### 2.2.13. Herstellung von verschiedenen Oxidationszuständen der DNA-Photolyase

Nach Reinigung der DNA-Photolyase liegt das Enzym in der stabilen Radikal-Form vor. Die aktive, vollreduzierte Form wird durch Zugabe von weiteren 10 mM DTT und Bestrahlung mit Weißlicht (5 min) unter Argon-Atmosphäre hergestellt. Der Fortschritt der Reaktion wird durch UV-VIS Spektroskopie verfolgt. Die aktive Form reoxidiert zur Radikal-Form langsam bei Inkubation bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  (ca. drei Tage). Die inaktive, vollreduzierte Form wird durch zweiwöchige Inkubation unter Argon bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  hergestellt. Am Ende wurde Kaliumhexacyanoferrat zugegeben, um die Oxidation zu vervollständigen (Gindt et al. 1999). Auch hier wird der Fortschritt der Reaktion durch UV-VIS Spektroskopie verfolgt. Die

oxidierte Form der DNA-Photolyase ist extrem instabil und denaturiert schon bei kleinsten Kristallisationskeimen, bei Erwärmung über 4 °C, oder bei Kontakt mit Sauerstoff.



## 2.3 Molekularbiologische Arbeitsmethoden

### 2.3.1 Isolierung von DNA

#### 2.3.1.1. Schnellisolierung von Plasmid-DNA mit Hitzeschock (Minipräparation)

Diese Methode zur Plasmidgewinnung (Holmes und Quigley 1981) diene in erster Linie zur schnellen Überprüfung, ob und gegebenenfalls welche Plasmide in transformierten Bakterien enthalten waren. Die isolierbaren Mengen lagen bei etwa 1 µg.

Eine Spatelspitze Zellen von Agarplatten oder 2 mL Flüssigkultur wurden in 300 µL STET-Puffer resuspendiert. Dann wurden 10 µL Lysozym-Lösung (10 mg/mL in 10 mM Tris/HCl, pH 8,0) zugegeben und 30 s bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 120 s bei 100 °C wurde der Ansatz zentrifugiert (14000 Upm, 15 min, RT). Der Überstand wurde zum Ausfällen der DNA mit 200 µL Isopropanol versetzt. Die ausgefallene DNA wurde abzentrifugiert (13000 Upm, 30 min, 20 °C) und mit 300 µL eiskaltem Ethanol (70 %) (v/v) gewaschen. Das Pellet wurde 5 min an Luft getrocknet und in 30 µL bidestiliertem Wasser aufgenommen.

#### 2.3.1.2 Isolierung von Plasmid-DNA mittels PEQLAB-Plasmid-Isolation-Kit

Für die Isolierung mittlerer Mengen Plasmid-DNA (20 µg) wurde folgende Methode angewandt: 10 mL einer Übernachtskultur wurden zentrifugiert (4800 Upm, 15 min, RT) und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 250 µL P1-Puffer resuspendiert. Um die Zellen aufzuschließen, wurden 250 µL P2-Puffer zugegeben, kurz geschwenkt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 350 µL N3-Puffer zugegeben und durch sanftes Schütteln sorgfältig vermischt. Anschließend wurde zentrifugiert (14000 Upm, 10 min, RT). Der Überstand wurde vorsichtig in ein „spin column“ abdekantiert und auf die mikro Säule zentrifugiert (14000 Upm, 1 min, RT). Nach Zugabe von 500 µL PB-Puffer wurde erneut zentrifugiert (4800 Upm, 15 min, RT). Dann wurde mit 750 µL PE-Puffer gewaschen und

zwecks vollständiger Entfernung des im PE-Puffer vorkommenden Ethanolts zweimal je 1 min bei 14000 Upm zentrifugiert. Die Elution erfolgte mit 50-100 µL bidestiliertem Wasser.

### 2.3.1.3. Isolierung bakterieller chromosomaler DNA:

100 mL Kultur (ca. 0,25 g Zellen) wurden in 3 mL TE- Puffer gewaschen und bei 4800 Upm zentrifugiert. Das Pellet wurde in 2 mL TE resuspendiert und 15 min bei 65 °C inkubiert, wobei die Zellen ausfallen sollten. Nach Zugabe von 0,01 mL RNase-Lösung (20 mg/mL) und 0,1 mL Aufschlußpuffer (100 mg/mL Lysozym, 10 mM EDTA) wurde weitere 15 Minuten bei 37 °C inkubiert. Weiterhin wurden 0,02 mL Proteinase K-Lösung (Konzentration 10 mg/mL) und 0,33 mL einer 10 % igen SDS-Lösung zugegeben. Nach 30 minütiger Inkubation bei 37 °C sollte die Lösung klar sein. 0,5 mL einer 5 M NaCl-Lösung wurden zugegeben und gut gemischt. Danach wurden 0,48 mL einer 10 % (CTAB)-Lösung in 0,7 M NaCl zugegeben und gut gemischt, wobei sich nach 10 minütiger Inkubation bei 65 °C ein flockiger Niederschlag bildet. Nun wird mit Isoamylalkohol/Chloroform 24/1 ausgeschüttelt und 8 Minuten mit einer Festwinkelzentrifuge bei 3000 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reagenzglas gegeben und der Vorgang zweimal wiederholt. Weitere 3 mal wurde mit einem Gemisch Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol 25/24/1, welches frisch angesetzt wurde, ausgeschüttelt. Der Überstand wird mit dem 0,6 fachen Überschuss an Isopropylalkohol versetzt und mäßig geschwenkt, was die Bildung von DNA-Ballen und Fäden zur Folge hat. Diese werden 30 min bei 14000 Upm und 4 °C zentrifugiert und mit 1 mL eiskaltem 70 % Ethanol gewaschen. Als Ergebnis erhält man 0,12 mL Lösung mit einer Konzentration von 70 ng/µL.

### 2.3.2. Reinigung von DNA

Zur DNA-Reinigung von Fragmenten über 50 bp wurde ein Reinigungsakit von PEQLAB (Erlangen) verwendet. Das Prinzip dieses Verfahrens beruht darauf, dass das in den Säulchen vorhandene Harz DNA unter Hochsalzbedingungen bindet, während bei niedrigen Salzstärken eluiert werden kann.

Zu der DNA-Lösung wurde das fünffache Volumen PB-Puffer zugesetzt, geschüttelt, in ein „spin column“ pipettiert und zentrifugiert (14000 Upm, 1min, RT). Der Waschschrift erfolgte

mit 750 µL PE-Puffer und zweimaliger Zentrifugation (14000 Upm, 1 min, RT). Die Elution erfolgte mit 50 µl bidestiliertem Wasser. Die Ausbeute betrug bis zu 90 %.

### 2.3.3. Agarosegelelektrophorese

Um DNA ihrer Größe nach aufzutrennen und so zu charakterisieren oder um bestimmte Fragmente zu isolieren, wurden die Proben auf Agarosegelen elektrophoretisch getrennt. Als Längenstandard wurde der DNA-Molekulargewichtsmarker von PEQLAB (peqgold) (Erlangen) verwendet. Die Größe der darin enthaltenen Fragmente betrug in bp: 10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3500, 3000, 2500, 2000, 1500, 1200, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100.

Als Elektrophoresepuffer diente TAE-Puffer. Je nach Größe der aufzutrennenden Fragmente wurden Gele mit 0,5-2 % Agarose verwendet. Zur Gelherstellung wurde die Agarose in Elektrophoresepuffer erhitzt, bis sie sich gelöst hatte. Nachdem sich diese Lösung auf etwa 60 °C abgekühlt hatte, wurde sie auf den Gelträger gegossen und nach Erstarren so in die Elektrophoresekammer eingesetzt, dass das Gel etwa 5 mm mit Puffer bedeckt war. Die Proben wurden vor dem Auftragen mit Probenpuffer versetzt, der zum Beschweren und als Farbmarker diente.

Die besten Resultate ergaben sich bei etwa 10 ng DNA pro Bande. Die Dauer der Elektrophorese richtete sich nach der angelegten Spannung, die zwischen 70 und 120 V variiert wurde.

Das Gel wurde nach dem Lauf in Ethidiumbromid-Lösung (1 µg/mL H<sub>2</sub>O) 30 min unter Lichtausschluss angefärbt, mit H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> gewaschen und unter UV-Licht fotografiert.

Bei präparativen Gelen wurden die benötigten Banden auf dem UV-Leuchttisch ausgeschnitten und das Gel durch Reinigung mit Peqlab-Säulchen entfernt. Dazu wurde die ausgeschnittene, gewogene Bande mit dem dreifachen Gewichts-Volumen QX1-Puffer versetzt und 10 min bei 50 °C inkubiert. Nach Zugabe von einem Gewichts-Volumen Isopropanol wurde der gesamte Ansatz in ein „spin column“ gegeben und 1 min bei 14000 Upm und RT zentrifugiert. Die Reinigung erfolgte durch zweimaliges Zentrifugieren nach der Zugabe von 750 µl PE-Puffer. Die Elution der DNA erfolgte mit 50-100 µl Wasser. Die Ausbeute betrug bis zu 70 %.

### 2.3.4. Herstellung elektrokompenter Zellen

Elektrokompente Zellen sind nach dem Protokoll von Dower und Mitarbeiter (Dower et al. 1988) in leicht modifizierter Form hergestellt worden.

Mit 50 mL einer Vorkultur, die nicht länger als 16 h bei 37 °C bebrütet wurde, wurden 1000 mL LB-Medium angeimpft. Sobald die Kultur eine optische Dichte von 0,5-0,7 (bei 600 nm) erreicht hatte, wurde sie 15 min lang auf Eis gestellt. Wichtig war, dass die Zellen ab diesem Zeitpunkt nicht mehr über 4 °C erwärmt wurden, um eine Verminderung der Transformationsrate zu vermeiden. Danach wurden die Zellen in einem auf 4 °C vorgekühlten Rotor bei 4000 Upm abzentrifugiert. Der Überstand wurde möglichst vollständig abdekantiert und das Pellet in 1 L 10%igem eiskalten, sterilen Glycerin resuspendiert. Diese Prozedur wurde zweimal wiederholt, wobei das Pellet das erste Mal in 500 mL, das zweite Mal in 20 mL 10 %igem eiskalten, sterilen Glycerin resuspendiert wurde. Dann wurde nochmals wie oben zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in einem endgültigen Volumen von 2 mL 10 %igem eiskalten, sterilen Glycerin suspendiert. Die Zellkonzentration sollte  $1-3 \cdot 10^{10}$  Zellen/mL betragen. Die Suspension wurde in sterile Kryotubes aliquotiert und in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Die Transformationsrate betrug ca.  $3 \cdot 10^7$  Transformanten/ $\mu$ g DNA.

### 2.3.5. Elektrotransformation von *E. coli*-Stämmen

Parameter des Gene-Pulsers und Pulse-Controllers:

Kapazität: 25  $\mu$ F  
Widerstand: 200  $\Omega$   
Spannung: 2,5 kV

40  $\mu$ L elektrokompente Zellen wurden auf Eis aufgetaut und in ein steriles, vorgekühltes 1,5 mL Eppendorf-Reaktionsgefäß transferiert. Dazu gab man zwischen 10 pg und 100 ng Plasmid-DNA, wobei das zugefügte Volumen 2  $\mu$ L nicht übersteigen sollte. Eine Elektroporationsküvette (Spaltbreite 0,2 cm) wurde auf Eis vorgekühlt. Dann wurde die Zellen/DNA-Mixtur in die Elektroporationsküvette überführt, die Suspension durch Schütteln auf den Küvettenboden gebracht und die gut abgetrocknete Küvette samt Küvettenhalter in die Elektroporationskammer geschoben, so dass Kontakt zu den Elektroden bestand.

Anschließend wurde ein Puls mit den oben aufgeführten Parametern appliziert, die Zellen sofort in 1 mL SOC-Medium suspendiert und 1 h bei 37 °C bebrütet. Die Halbwertszeit  $t_{1/2}$  des Kondensators sollte 4,5-5,0 msec betragen. Es wurde auf selektivem Medium ausplattiert.

### 2.3.6. Elektrotransformation mit frisch ausplattierten *E. coli*-Stämmen

Die Methode eignet sich besonders zur Subklonierung bereits fertig klonierter Plasmide (Enderle und Farwell 1998). Der zu transformierende Stamm wird auf eine mit den entsprechenden Antibiotika supplementierten LB-Agar Platte ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C bebrütet. Am nächsten Tag werden mittels einer Impföse ungefähr 3 mg der Zellen in ein mit 500 µL sterilem Wasser gefülltes 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt und vollständig resuspendiert. Nach Zentrifugation (14.000 Upm, 1 min, RT) wird der Überstand verworfen und erneut mit 500 µL sterilen Wasser resuspendiert und nochmals zentrifugiert (14.000 Upm, 1 min, RT). Der Überstand wird erneut verworfen und die nun kompetenten Zellen in 40 µL sterilen Wasser resuspendiert und bei 4 °C bis zur Transformation gelagert.

Als Plasmid-DNA werden 5-10 µL wässriger DNA Lösung mit einer Stoffmenge zwischen 5 und 50 ng verwendet. Die DNA/Zell Suspension wird in eine Elektroporationsküvette gegeben und im weiteren wie unter 2.3.5. beschrieben verfahren. Als Transformationsrate ergab sich  $1 \cdot 10^4$  Transformanten/µg DNA.

### 2.3.7. Elektrotransformation von *B.Subtilis*-Stämmen

#### 2.3.7.1. Herstellung von elektrokompenten *B.Subtilis*-Zellen

Kompetente Zellen wurden nach einer modifizierten Methode von Brigidi und Mitarbeiter (Brigidi et al. 1989) hergestellt.

500 mL mit entsprechendem Antibiotika komplementiertes LB-Medium wurde 1/100 mit *B. subtilis* Zellen angeimpft und bei 32 °C bis zu einer  $OD_{600}$  von 0,6 bebrütet. Zum Abstoppen des Zellwachstums wurden die Zellen 30 min bei 4 °C inkubiert und anschließend zur Gewinnung der Zellmasse zentrifugiert (4000 Upm, 15 min, 4 °C). Der Überstand wurde

verworfen, das Zellpellet mit 300 mL eiskaltem, sterilen 1 mM HEPES-Puffer gewaschen und erneut zentrifugiert. Das Sediment wurde zweimal in je 200 mL PEB-Puffer gewaschen und zentrifugiert. Das Zellpellet wurde abschließend in 16 mL PEB-Puffer resuspendiert, zu 0,4 mL Portionen in Cryo-Gefäße aliquotiert und in flüssigem Stickstoff gelagert.

HEPES-Puffer:

1 mM HEPES  
pH 7,0

PEB-Puffer:

272 mM Saccarose  
1 mM MgCl<sub>2</sub>  
7 mM K-Phosphat  
pH 7,4

### 2.3.7.2. Elektrotransformation

Da die Leitfähigkeit des Transformationsansatzes bei der Elektroporation eine entscheidende Rolle spielt, sollte immer nur salzfreie Plasmid-DNA verwendet werden.

Die Zellen und die Elektroporationsküvette (Spaltbreite 0,2 cm) wurden 15 min auf Eis aufgetaut. 200 µL Zellen und 500 ng Plasmid DNA wurden zusammen in die Küvette pipettiert und 10 min auf Eis inkubiert. Die anschließende Elektroporation wurde mit folgenden Parametern durchgeführt: 1,5 µF Kondensatorleistung, 335 Ω Widerstand und 2,5 kV Spannung. Die Halbwertszeit  $t_{1/2}$  betrug 1,7 msec. Zur Expression des Phänotyps (neue Antibiotika-Resistenz) wurden die transformierten Zellen in 1,2 ml LB-Medium suspendiert und 2 h bei 32 °C bebrütet. Nun wurden Portionen von 100 µL und 400 µL des Ansatzes auf selektiven LB-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 32 °C bebrütet. Der restliche Ansatz (0,9 mL) wurde in 5 mL selektivem LB-Medium verdünnt und über Nacht bebrütet. Am nächsten Tag wurden Einzelkolonien umplattiert.

### 2.3.8. DNA-Sequenzierung

Zur Sequenzbestimmung von DNA-Molekülen wurde nach dem Prinzip der enzymatischen Kettenabbruchmethode nach Sanger und Mitarbeitern gearbeitet (Sanger et al. 1977), wobei die Sequenzierung entweder im Arbeitskreis oder bei der Firma MWG-Biotech (Ebersberg) durchgeführt wurde.

### 2.3.9. Restriktionsanalyse

Reaktionen von DNA mit Restriktionsenzymen wurden im Bezug auf Pufferbedingungen und Inkubationstemperaturen den Angaben des Herstellers entsprechend durchgeführt.

Für Hydrolysen im analytischen Maßstab wurden 5 µl von Minipräparationen verwendet, 2 µl des entsprechenden Puffers (10x) sowie je 1 µl Restriktionsenzym zugegeben, auf 20 µl mit sterilem Wasser aufgefüllt, 1h bei 37 °C (oder bei anderer Temperatur nach Angaben des Herstellers) inkubiert und nach Zugabe von 2 µl Auftragspuffer direkt auf ein Agarosegel aufgetragen.

### 2.3.10. Ligierung von DNA-Fragmenten

Für eine Ligation wurde der „Rapid-DNA“- Ligationskit (Boehringer, Mannheim) verwendet. Hierfür wird die Vektor-DNA mit dem Insert im molaren Verhältnis 1:3 gemischt, mit Wasser auf 8 µl aufgefüllt, 2µl DNA-Ligationspuffer zugegeben, geschüttelt, 10 µl Ligasepuffer sowie 2 µl Ligase zugegeben, gut geschüttelt und 15 min bei RT inkubiert.

### 2.3.11. Amplifikation von DNA mittels PCR-Reaktion

Die PCR-Reaktion wurde genutzt, um gezielt einzelne DNA-Stücke durch die Wahl spezifischer Primer zu amplifizieren. Ein typischer Ansatz bestand aus:

DNA-Matritze ( 0,5-25 ng)	1 $\mu$ L
dNTP's (je 5 mM)	4 $\mu$ L
Oligonukleotide (20 $\mu$ M)	je 2 $\mu$ L
Puffer (10x)	10 $\mu$ L
MgCl <sub>2</sub> (100mM)	6 $\mu$ L
Taq-DNA-Polymerase (oder VENT-Polymerase)	1 $\mu$ L
bidest. Wasser	74 $\mu$ L
<b>Gesamt</b>	<b>100 <math>\mu</math>L</b>

Der PCR-Ansatz wurde anschließend einem dreistufigen Temperaturzyklus unterworfen, nachdem 4 min auf 94 °C erhitzt wurde, um die DNA-Doppelstränge zu trennen:

Stufe	Temperatur [°C]	Dauer [s]	Funktion
1	94	30	Trennung der DNA-Doppelstränge
2	48-55	30	Primer-Hybridisierung
3	72	45-90	Primer-Verlängerung

Tab.2.7.: Stufen bei der PCR

Die Primer-Hybridisierungs-Temperatur hängt von der zu amplifizierenden DNA und von der Länge der verwendeten Primer ab, die Dauer der Primer-Verlängerung variiert je nach Länge des zu amplifizierenden DNA-Stücks. Je 1000 bp wurden 60 s veranschlagt. Es wurden 25-30 der Zyklen 1-3 durchgeführt. Anschließend erfolgte eine 20 minütige Inkubation bei 72 °C, um nicht komplettierte Doppelstränge fertig zu synthetisieren.

Bei PCR-Reaktionen, die mit thermophiler DNA durchgeführt wurden, wurde der oben stehende Ansatz variiert: Es wurde ausschließlich mit VENT-Polymerase gearbeitet, da diese eine deutlich erhöhte Lebensdauer bei Temperaturen >95 °C besitzt. Das Reagenz GC-Melt (Clontech, Heidelberg) wurde zu 10 % (v/v) dem Ansatz zugegeben, um ein erfolgreiches Aufschmelzen der DNA zu ermöglichen.



Es wurde folgendes PCR Programm durchgeführt:

	Stufe	Temperatur [°C]	Dauer [s]	Funktion
		98,5	300	Trennung der DNA-Doppelstränge
25 Cyclen	1	94	30	Trennung der DNA-Doppelstränge
	2	53-60	30	Primer-Hybridisierung
	3	72	45-90	Primer-Verlängerung
		72	1200	Primer-Verlängerung

Tab.2.8.: Stufen bei der PCR mit thermophiler DNA

## 2.4. Bestrahlung von DNA-Oligonukleotiden

### 2.4.1. Verwendete DNA-Sequenzen

Es wurden drei verschiedene DNA Substrate verwendet: Einmal ein einzelsträngiges 18mer-polyT Stück, einmal ein einzelsträngiges 18mer-polyFluoruracil(FU) Oligonukleotid und einmal ein doppelsträngiges DNA Oligonukleotid mit der Sequenz GCACGAATTAAT (Mc Ateer et al. 1998).

### 2.4.2. DNA Konzentrationsbestimmung

Die in bidestiliertem Wasser gelöste DNA wurde 1/1000 verdünnt und die Absorption bei 260 nm bestimmt. Die DNA Konzentration wurde mittels des Lambert-Beerschen Gesetzes berechnet, wobei der molare Extinktionskoeffizient der jeweiligen DNA mit der Methode des nächsten Nachbarn berechnet wurde (Cantor et al. 1970). Die Konzentrationen betragen vor Bestrahlung zwischen 2 und 6 mM.

### 2.4.3. Schädigung der DNA

Die Bestrahlung der DNA-Stücke erfolgte mittels einer UV-Lampe (Silvana G8W) bei 254 nm oder bei 306 nm, wobei hier als Hilfsreagenz 13 mM Acetophenon (Koning et al. 1991) zugegeben wurden. Die Bestrahlung wurde 90 min bei 4 °C durchgeführt und bei 260 nm photometrisch verfolgt.

### 2.4.4. Bestimmung des Schädigungsgrades der DNA

### 2.4.4.1. Qualitative Bestimmung des Schädigungsgrades

Der Bestahlungsgrad der Pyrimidin Dimeren wurde quantitativ durch Titration mit Kaliumpermanganat bestimmt. Zwei Ansätze wurden unter Argon Atmosphäre bei Raumtemperatur zusammenpipettiert; ein Ansatz mit DNA und ein Kontrollansatz mit Wasser. Nach 5 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde der Reaktionsansatz eine Minute bei 10000 g zentrifugiert. Von beiden Überständen wurde ein UV-VIS Spektrum zwischen 460 und 590 nm gemessen. Das Integral der beiden Ansätze wurde verglichen, wobei der Kontrollansatz 100 % entsprach. Aus dem Verbrauch an  $\text{KMnO}_4$ , der äquimolar der Menge an ungeschädigten Thyminen entspricht, konnte der Bestahlungsgrad berechnet werden.

Verwendete Stocklösungen:

0.1 M  $\text{KMnO}_4$   
4 mM PolyT  
0,1 M HCl

Ansatz:

30  $\mu\text{l}$   $\text{KMnO}_4$   
2-10  $\mu\text{l}$  18T-DNA  
6 $\mu\text{l}$   $\text{KH}_2\text{PO}_4$   
ad.600  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$

### 2.4.4.2. Quantitative Bestimmung des Schädigungsgrades

Die Quantifizierung des Bestahlungsgrades wurde mittels HPLC bestimmt. Folgende Puffer-Lösungen wurden verwendet:

Puffer A:

10 mM NaOH pH 12.0

Puffer B:

10 mM NaOH pH 12.0  
1 M NaCl

Als HPLC-Säule wurde NUCLEOGEL SAX (Machery-Nagel, Düren) (50 mm · 4.6 mm) verwendet. Es wurden 0.12 µmol DNA aufgetragen und mit einem linearen Gradienten (0-100 % B in 100 min) eluiert. Die Detektion erfolgte mittels Absorption bei 260 nm. Ungeschädigte DNA eluiert nach 75 min, geschädigte nach 70 min. Die Ausbeute wurde über das Integral der Absorption bei 260 nm bestimmt.

#### 2.4.4.3. Herstellung von doppelsträngiger DNA mit einem Pyrimidin Dimer

Beide DNA-Stränge wurden in bidestiliertem Wasser gelöst und deren Konzentration bestimmt. Der zu schädigende Strang wurde wie in 2.4.3. beschrieben, bestrahlt und der Bestahlungsgrad bestimmt. Nun wurde der Gegenstrang äquimolar zugegeben, wobei angenommen wurde, das der 5'-Strang während der Bestahlung keine Konzentrationsänderung erfahren hat.

Acetophenon wurde durch Säulenchromatographie an einer Entsalzungssäule (siehe 2.2.8.1.6.) entfernt (der Doppelstrang besitzt mit 7,5 kDa eine größere Masse als die Ausschlußgröße der Säule). Die eluierte DNA wurde lyophilisiert und in der gewünschten Konzentration wieder gelöst.

## 2.5. Spektroskopische Methoden

### 2.5.1. FT-IR-Spektroskopische Messungen

Die FT-IR Messungen wurden an IFS 66, 66V, 66VS, 88 Spektrometern von Bruker Instruments (Rheinstetten, Deutschland) durchgeführt. Alle Geräte verfügen über einen Globar als Lichtquelle, einen KBr-Strahlteiler und sind mit einem hoch sensitiven, über den gesamten Spektralbereich konstanten MCT-Detector ausgestattet. Um bei unterschiedlichen Spektralbereichen bestrahlen zu können, sind die Spektrometer mit unterschiedlichen Lichtquellen ausgestattet. Die Bestrahlung mit sichtbarem Licht wurde mit einer Halogenlampe (Spindler & Hoyer, Deutschland) durchgeführt, der gegebenenfalls ein optischer OG 530 nm Filter (Schott, Deutschland) vorgesetzt wurde. Für die Bestrahlung mit UV-Licht (308 nm) wurde ein gepulster XeCl-Excimer Laser (LPX 240i und LPX 305, Lambda Physik, Deutschland) verwendet. Die Energie eines Pulses betrug 10 mJ.

Die Probenküvette bestand aus zwei Calciumfluorid-Fenstern, die in einer temperierbaren Messinghalterung eingespannt wurden. Als Abstandshalter wurden zwischen 2,5 und 5  $\mu\text{m}$  dicke Mylar-Folien verwendet. Zusätzlich wurden die Fenster an den Rändern mit Apiezonfett abgedichtet. Eines der Fenster enthielt jeweils eine Nut, die eventuellen Flüssigkeitsüberschuss aufnahm. Das Probenvolumen betrug etwa 3  $\mu\text{L}$ . Die Konzentration an DNA-Photolyase (E109A-Mutante) betrug 1.2 mM, die Konzentrationen an Substrat und Produkt betragen jeweils 4 mM. Die Proben wurden unter einem Inertgas Strom und unter schwachem Rot-Licht auf das Fenster aufgebracht und die Küvette verschlossen.

Als Messtemperatur wurde 4  $^{\circ}\text{C}$  gewählt. Alle Spektren wurden mit einer spektralen Bandweite von 2  $\text{cm}^{-1}$  von 1800 bis 1150  $\text{cm}^{-1}$  aufgenommen. Andere Spektralbereiche sind entweder durch starke Wasserabsorptionen nicht auswertbar oder zeigen keine Infrarot-Änderungen bei Bestrahlung.

Typischerweise wurden 200 Scans aufgenommen und Fourier-transformiert. Die Messdaten wurden mit dem Programm Opus von Bruker, (Deutschland), sowie Origin 6.0 von MicroCal (Northhampton, Massachussets, USA) ausgewertet. Es benötigte einige Stunden, bis die Probe soweit äquilibriert war, dass die Extinktionsänderung im Bereich der Wasserbande bei 1650  $\text{cm}^{-1}$  geringer als  $1 \cdot 10^{-3}$  pro 5 min war. Zusätzlich zur Schichtdickenänderung, die eine Änderung der Wasserbande bewirkt, tritt meist ein geringer Basisliniendrift auf. Ist der MCT-

Detektor noch nicht ausreichend äquilibriert oder sind Luftblasen zwischen der Probe, kommt es zu wellenförmigen Verzerrungen der Basislinie.

Folgende Messreihen wurden durchgeführt:

Messung der Photoreduktion	Photoschädigung der DNA	Photoreparatur der DNA mittels DNA-Photolyase
- Messung eines Ausgangsspektrums	- Messung eines Ausgangsspektrums	- Messung eines Ausgangsspektrums
- 2 min Bestrahlung mittels sichtbaren Lichts (mit oder ohne OG 530 Filter)	- Bestrahlung mittels Excimer-Laser	- 1,5 min Bestrahlung mittels sichtbaren Lichts
- Messung des Endspektrums	- Messung von Endspektren (nach jeweils 100, 500 und 1000 Pulsen)	- Messung des Endspektrums
- Bildung des Differenzspektrums	- Bildung der Differenzspektren	- Zehnmahlige Wiederholung der Bestrahlungs/Messungs- Zyklen
		- Bildung der Differenzspektren
Messung des gesamten Schädigungs/Reparatur-Zyklus		
- Messung eines Ausgangsspektrums		
- Bestrahlung mittels Excimer-Laser		
- Messung von Endspektren (nach jeweils 100, 500 und 1000 Pulsen)		
- Messung eines neuen Ausgangsspektrums		
- 1,5 min Bestrahlung mittels sichtbaren Lichts		
- Messung des Endspektrums		
- Zehnmahlige Wiederholung der Bestrahlungs/Messungs-Zyklen		
- Bildung der Differenzspektren		

### 2.5.2. EPR/ENDOR-Spektroskopische Messungen

Für zeitaufgelöste EPR Spektroskopie wurde ein X-Band Spektrometer (X-Band: 9.5 GHz / 3400 G) verwendet, dessen Hauptkomponenten ein Elektromagnet (AEG X-20) und eine Mikrowellenbrücke (Bruker ER041MR) sind. Das direkt detektierte EPR-Signal wird zu einem digitalen Speicheroszilloskop (Tektronix TDS 520 A) weitergeleitet, wo eine

festgelegte Anzahl an Signalen zur Verbesserung des Signal/Rausch-Verhältnisses aufsummiert wird. Die Steuerung des Spektrometers und die Aufnahme der Daten erfolgte über das von Dr. Jens Törring selbst entwickelte Messprogramm „fsc2“. Zur Messung der Magnetfeldstärke  $B_0$  wird ein NMR-Gaußmeter (Bruker ER035M) verwendet. Um eine hohe Empfindlichkeit zu erreichen, erfolgten die Messungen im dielektrischen Resonator, der im leeren Zustand eine Güte von 10000 hat und mit dem eine Zeitauflösung von etwa 100 ns erreicht werden kann. Zur Proben temperierung wurde der gesamte Resonator in einen Helium-Durchflussskryostaten eingebaut. Die Regulierung des Heliumstroms wurde mit einer Gasflusskontrolleinheit (Oxford VC 31) durchgeführt. Reguliert wurde die Temperatur durch eine Temperaturkontrolleinheit (Lake Shore 321). Die Lichtanregung der Probe erfolgte mit einem frequenzverdreifachten Nd-YAG-Laser bei einer Wellenlänge von 355 nm, wobei die Pulsrate 1-2 Hz und die Laserenergie 2-4 mJ/Puls betrug. Zur Synchronisation der Signalaufzeichnung wird mit einer Photodiode Streulicht des Lasers aufgefangen und als Triggersignal an das digitale Speicheroszilloskop geschickt.

Für EPR Spektroskopie bei 95 GHz wurde ein Eigenbau W-Band Spektrometer (W-Band: 94-96 GHz) verwendet, das mit einem zylindrischen  $TE_{011}$  Resonator (Burghaus et al. 1992) bestückt war.

Für die ENDOR-Spektroskopie wurde ein selbst gebautes X-Band Spektrometer benutzt, das aus einem Elektromagnet, einer Bruker ER041MR Mikrowellenbrücke und einem Bruker EN801 ENDOR Resonator besteht. Ein Radio-Frequenz (RF) Generator Hewlett-Packard 8660c (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA) in Verbindung mit einer RF Verstärker ENI A-300 (ENI, Rochester, NY) wurde zur Erzeugung eines RF-Feldes im ENDOR Resonator verwendet. Die Spektren wurden mittels eines Bruker Temperaturkontrollers ER4111VT bei -113 °C unter einem Stickstoff-Strom vermessen.

Die Enzym-Chargen wurden in die EPR Quarz Röhren (3 mm für X-Band; 0.6 mm für W-Band) unter einem Argon-Strom in Dunkelheit überführt. Die Probe wurde zügig in flüssigem Stickstoff gefroren und gegebenenfalls darin gelagert. Die Konzentration an DNA-Photolyase (E109A-Mutante) betrug 1.2 mM, die Konzentrationen an Substrat und Produkt betragen jeweils 4 mM.

## 3. Ergebnisse

### 3.1. Darstellung von Substrat

Es wurden drei DNA Oligonukleotide hergestellt: Ein synthetisches, einzelsträngiges 18T-DNA Oligonukleotid, ein synthetisches, einzelsträngiges 18Fluoruracil (FU)-DNA Oligonukleotid und ein doppelsträngiges 12-mer DNA Oligonukleotid mit zwei Thyminen in der Mitte eines Strangs. Alle DNA Oligonukleotide wurden mittels UV-Strahlung photochemisch bestrahlt. Um die Ausbeute an Dimeren bestimmen zu können, wurde der Schädigungsgrad der Substrate gemessen.

#### 3.1.1. Bestimmung des Schädigungsgrades von polyT DNA

Um eine möglichst große Anzahl an CPD's pro Molekül DNA zu haben, wurde ein synthetisches einzelsträngiges 18T DNA (oder 18FU) Oligonukleotid für die meisten Untersuchungen verwendet. Der Schädigungsgrad der polyT DNA wurde mittels photometrischer Titration mit Kaliumpermanganat bestimmt. Die photometrische Messung aufgrund der Eigenabsorption der CPD und der nichtbestrahlten Thymine bei 260 nm ist aus zwei Gründen nicht möglich: Erstens ist der Extinktionkoeffizient bei 260 nm eines CP-Dimeren nicht bekannt, zweitens ergibt die Bestrahlung eines 18mer polyT DNA Oligonukleotids eine Schädungsverteilung, die auch mittels HPLC nicht getrennt werden kann.

Kaliumpermanganat reagiert spezifisch mit Olefinen unter Ausbildung von *cis*-Diolen. Ramaiah und Mitarbeiter (Ramaiah et al. 1998) konnten zeigen, dass Kaliumpermanganat mit Thyminen deutlich schneller reagiert als mit [2+2] Thyminen (Abb.3.1.). Dadurch ergibt die Titration mit Kaliumpermanganat die Anzahl der unbestrahlten Basen (entspricht der Anzahl der Doppelbindungen), aus denen der Schädigungsgrad berechnet werden kann.



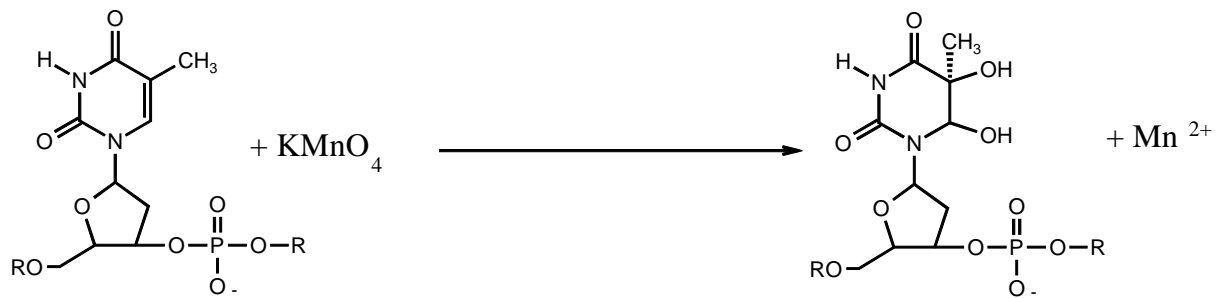


Abb. 3.1. Schematischer Reaktionsverlauf bei der Umsetzung von Thymidin mit  $\text{KMnO}_4$ .

Um die Methode zu testen, wurden unterschiedliche Stoffmengen an unbestrahlter einzelsträngiger 18T-DNA vermessen und mit der vorher aufgrund der Eigenabsorption bei 260 nm bestimmten Stoffmenge verglichen. Es wurden Proben mit 16,1 nmol, 8,05 nmol und 3,22 nmol ungeschädigte polyT DNA mit der in Material und Methoden beschriebenen Methode gemessen. Abb. 3.2. zeigt den Vergleich zwischen den mit beiden Methoden gemessenen Stoffmengen.

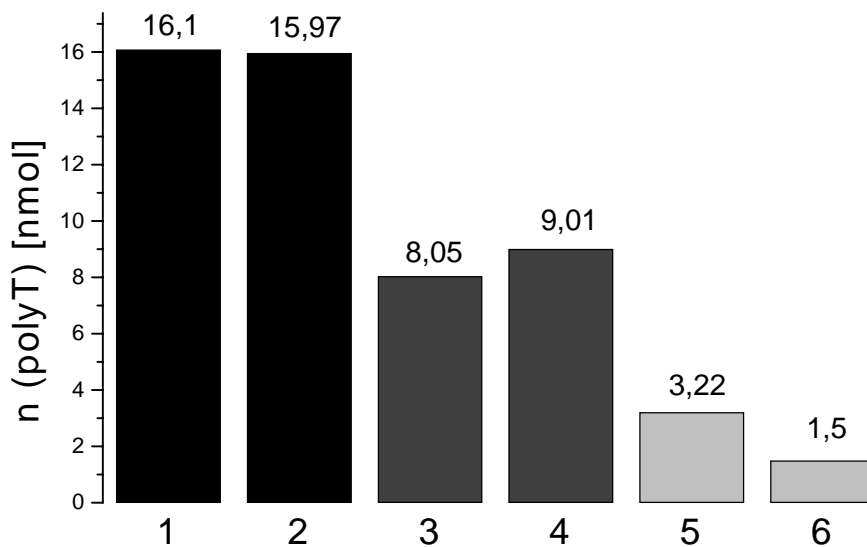


Abb. 3.2.: Konzentrationsbestimmung eines 18mer polyT DNA Oligonukleotids. Säule eins, drei und fünf sind die photometrisch bestimmten Konzentrationen; zwei, vier und sechs die mit Kaliumpermanganat bestimmten Konzentrationen.

Deutlich zu erkennen ist, dass die Genauigkeit der Methode stark von der Menge der eingesetzten DNA abhängt. Während die beiden Ansätze mit jeweils 16,1 nmol und

8,05 nmol polyT DNA 0,3 % bzw. 10,7 % vom photometrisch bestimmten Wert abweichen, zeigt der Messwert mit 3,22 nmol eingesetzter polyT DNA über 100 % Abweichung vom photometrisch bestimmten Wert. Der Grund dafür ist vermutlich die optische Auswertung der Messung. Geringfügige Änderungen der  $\text{KMnO}_4$  Konzentration ergeben eine kleine Änderung des Integrals der Absorption zwischen 470 und 530 nm und damit eine prozentuale Erhöhung des statistischen Fehlers.

### 3.1.2. Bestimmung des Schädigungsgrades von DNA mit einem CPD

Um den Schädigungsgrad eines DNA Oligonukleotids, das nur ein Cyclobutandimer enthält (GCACGAATTAAG), verfolgen zu können, kann die unter 3.1.1. beschriebene Methode nicht mehr angewendet werden, da die Änderungen in der Absorption so gering sind, dass eine Auswertung nicht mehr möglich ist. Darüber hinaus müssten, um reproduzierbare Resultate zu erhalten, große Mengen an DNA verwendet werden. Dies ist aus Kostengründen nicht möglich. Deshalb wurde der Schädigungsgrad mittels HPLC bestimmt.

Um möglichst denaturierende Bedingungen zu haben, wurde die DNA unter stark alkalischen Bedingungen ( $\text{pH} = 12$ ) an einen Anionentauscher gebunden und mit einem linearen Salzgradienten eluiert. Die Elutionsprofile sind in Abb. 3.3. zusammengefasst. Ungeschädigte DNA eluierte nach 75 min, photo-geschädigte nach 70 min. Das gelbe Spektrum (bei  $t = 0$  min) zeigt eine kleine Bande bei einer Retentionszeit von 70 min und eine Hauptbande bei 75min. Die Bande bei 70 min ist vermutlich auf Verunreinigungen der DNA mit kürzeren Oligonukleotiden zurückzuführen, die während der Synthese des Oligonukleotides als Nebenprodukte anfallen. Im Laufe der Bestrahlung verringert sich die Hauptbande in Abhängigkeit von der Bestrahlungszeit deutlich und eine zweite, kleinerer Bande entsteht, der dem Anteil an photogeschädigter DNA entspricht. Diese Bande zeigt außerdem eine kleine Schulter mit einer Retentionszeit von 65 min. Es ist gut zu erkennen, dass der Absorptionskoeffizient von geschädigter DNA deutlich niedriger als der von ungeschädigter DNA ist, da der Peak der geschädigten DNA deutlich geringer ist als die der ungeschädigten DNA.

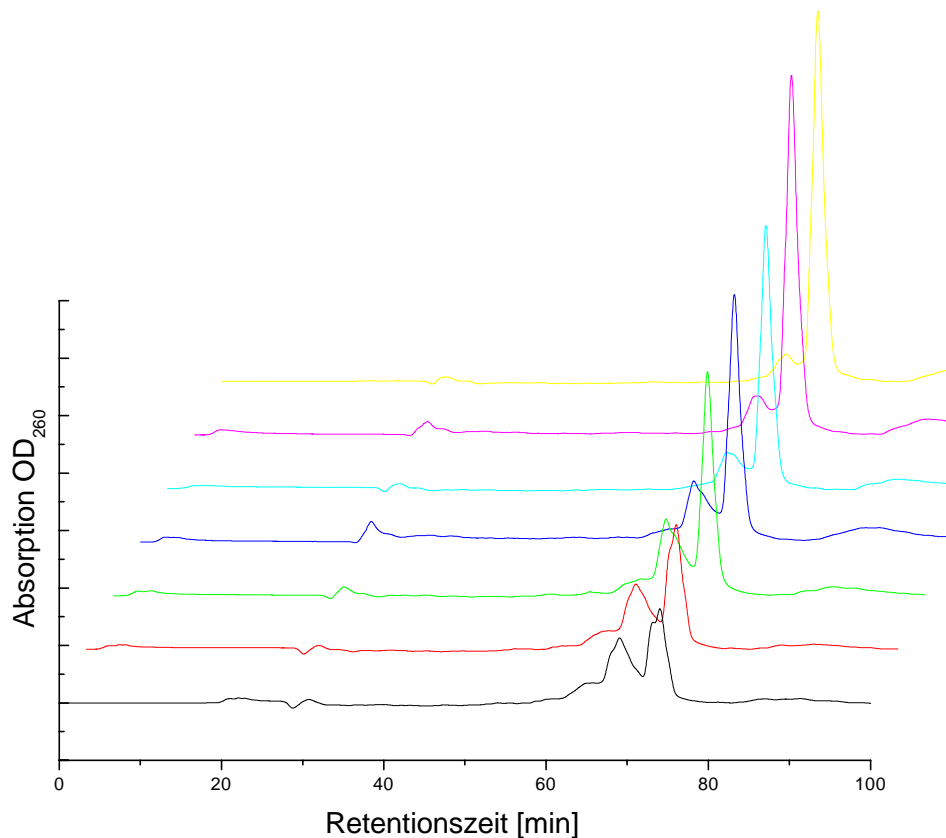


Abb. 3.3.: Spektrenfolge der Bestrahlung eines DNA Oligonukleotids mit der Sequenz GCACGAATTAAG.

Gelbes Spektrum: Absorption bei 260 nm nach 0 min Bestrahlung

Violettes Spektrum: Absorption bei 260 nm nach 20 min Bestrahlung

Hellblaues Spektrum: Absorption bei 260 nm nach 40 min Bestrahlung

Blaues Spektrum: Absorption bei 260 nm nach 60 min Bestrahlung

Grünes Spektrum: Absorption bei 260 nm nach 80 min Bestrahlung

Rotes Spektrum: Absorption bei 260 nm nach 100 min Bestrahlung

Schwarzes Spektrum: Absorption bei 260 nm nach 120 min Bestrahlung

Wie zu erkennen ist, wurde die Bestrahlung bei ca. 75 % Schädigungsgrad abgebrochen, weil bei größerem Schädigungsgrad (> 75 %) auch eine lange Bestrahlungsdauer wenig Änderung des Schädigungsgrades zur Folge hatte. Als Literaturwert für eine Bestrahlung von poly Thymidin-Dimeren wurde ein maximaler Schädigungsgrad (Anteil an geschädigter DNA im Verhältnis zur Gesamt DNA) von 0,8 (Rahn und Landry 1971) gefunden.

Dass im Verlauf der Bestrahlung keine weiteren signifikanten Banden entstehen, unterstützt die Annahme, dass die Photo-Dimerisierung von Thyminen die einzige signifikante Schädigung der DNA ist und andere Photoschädigungen eine untergeordnete Rolle spielen.

## 3.2. Biochemische Arbeiten mit rekombinanter DNA-Photolyase

### 3.2.1. Biochemische Arbeiten mit rekombinanter DNA-Photolyase aus *E. coli*

#### 3.2.1.1. Reinigung der rekombinanten DNA-Photolyase aus *E. coli*

Rekombinante DNA-Photolyase wurde nach einer abgewandelten Methode von Gindt und Mitarbeitern (Gindt et al. 1999) gereinigt. Wie in Material und Methoden beschrieben wurden etwa 15 g feuchte Zellmasse aufgeschlossen, vom Zelldebris abgetrennt und auf eine mit Blauer Sepharose gefüllte Säule aufgetragen. Es wurde solange gewaschen, bis bei 280 nm keine Absorption mehr festgestellt wurde. Anschließend wurde mit einem Salzgradienten über 160 mL eluiert. Das schematische Elutionsprofil ist in Abb. 3.4. **A** dargestellt. Alle blau gefärbten Fraktionen wurden vereinigt und entsalzt.

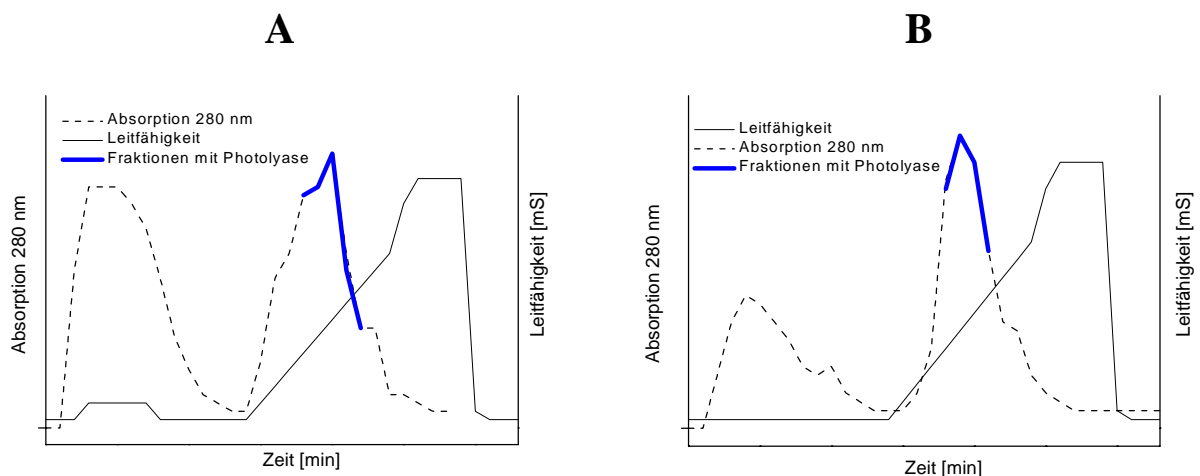


Abb. 3.4.: Elutionsprofil (schematisch) der beiden Chromatographieschritte: **A**: Blaue Sepharose; **B**: Heparin Sepharose

Der entsalzte Proteinmix wurde auf eine mit Heparin-Sepharose Material gefüllten Säule aufgetragen, gewaschen und mit einem linearen Salzgradienten über 200 mL eluiert (Elutionsprofil: Abb. 3.4. **B**). Alle blau gefärbten Fraktionen wurden vereinigt, mit Ammoniumsulfat gefällt, in Puffer D aufgenommen und durch Ultrafiltration aufkonzentriert.

Wurden Enzymproben ohne DTT benötigt, wurde nochmals über eine Entsalzungssäule in Puffer D ohne DTT umgepuffert. Benötigte man Proben mit deuteriertem Puffer, wurde die Umpufferung durch fünfmalige Ultrafiltration und Verdünnen mit dem deuteriertem Puffer D erreicht. Der Deuterierungsgrad betrug etwa 90 %. Die Lagerung der Enzymproben erfolgte in Puffer D mit 50 % Glycerin bei  $-70^{\circ}\text{C}$ .

In Abb. 3.5. ist eine SDS-PAGE der Reinigungsschritte gezeigt. Im Rohextrakt (Spur 1) ist die Photolyase-Bande bei ca. 50 kDa kaum zu erkennen. Dies zeigt, dass über 80 % des exprimierten Proteins im Zelldebris wiederzufinden ist. Nach dem ersten Reinigungsschritt mittels Blauer Sepharose ist das Enzym zu ca. 60 % gereinigt (Spur 2). Es zeigt deutlichen Hintergrund und eine starke Proteinbande bei 14 kDa. Die Spur des gereinigten Enzyms (Spur 4) zeigt nur Hintergrund-Proteine im Bereich zwischen 80 kDa und 20 kDa. Die so erhaltene Reinheit zu (mindestens 90 %) der DNA-Photolyase ist für spektroskopische Anwendungen ausreichend.

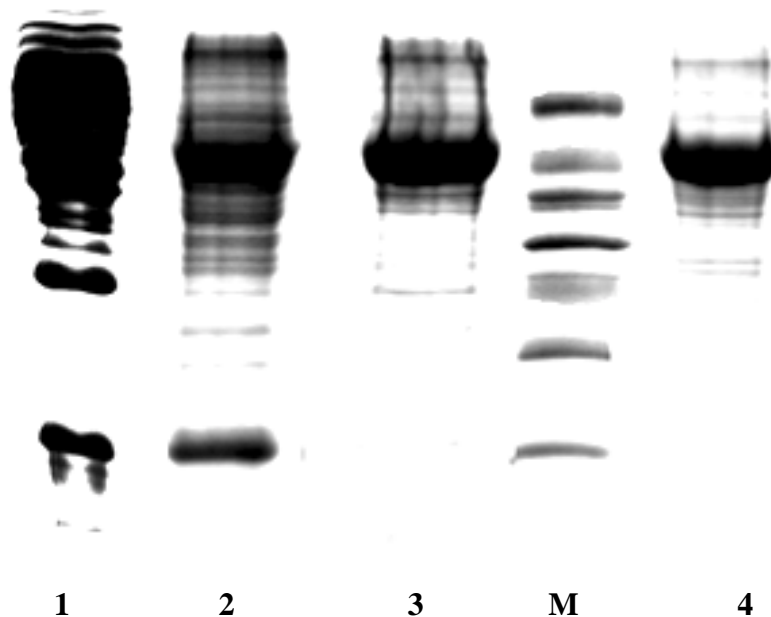


Abb. 3.5.: 15 % SDS-PAGE der Reinigung der DNA-Photolyase aus *E. coli*.

Spur 1: Rohextrakt aus *B. Subtilis*

Spur 2: Vereinigte Fraktionen nach Blauer Sepharose

Spur 3: Vereinigte Fraktionen nach Heparin Sepharose

Spur M: Molekular-Marker (66 kDa, 44 kDa, 36 kDa, 28 kDa, 24 kDa, 20 kDa und 14 kDa)

Spur 4: gereinigte DNA-Photolyase nach Ultrafiltration

Die Absorptionsspektren der Photolyase enthaltenden Fraktionen, die während der Reinigung des Proteins erhalten wurden, sind in Abb. 3.6. dargestellt.

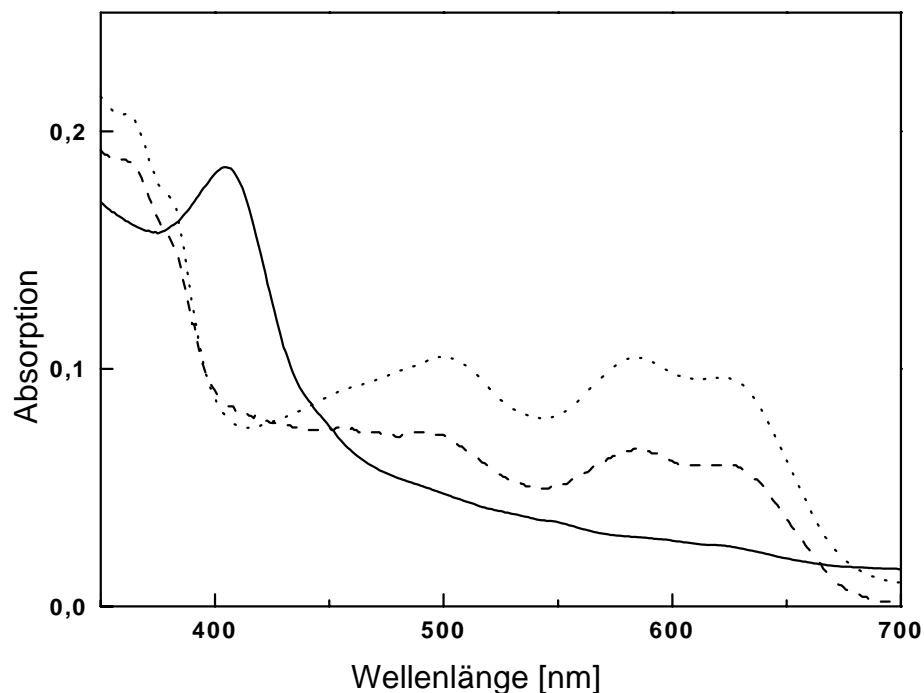


Abb. 3.6.: UV-VIS-Spektroskopie während der Reinigung der DNA-Photolyase: durchgezogene Linie: Rohextrakt; gestrichelte Linie: Pool nach Blauer Sepharose; gepunktete Linie: reine DNA-Photolyase

Die fehlende Absorption im Bereich von 600 nm verdeutlicht, dass im Rohextrakt kaum radikalische Photolyase vorhanden ist; die *in vivo*-Form der Photolyase ist die aktive, reduzierte Form (Payne et al. 1987). Im Gegensatz dazu zeigt das Spektrum der vereinigten Fraktionen nach der Säulenchromatographie mit Blauer Sepharose nur noch kleine Abweichungen gegenüber dem reinem Enzym im Bereich zwischen 400 und 500 nm. Die Tatsache, dass die beiden Spektren über 500 nm keine Unterschiede aufweisen, zeigt, dass die DNA-Photolyase während der Säulenchromatographie auf Blauer Sepharose zur radikalischen Form oxidiert und sich der Oxidationszustand während der Säulenchromatographie mit Heparin Sepharose nicht mehr ändert.

### 3.2.1.2. Mutation der DNA-Photolyase aus *E. coli*

Der Antennencofaktor der DNA-Photolyase, MTHF, besitzt keine katalytische Aktivität und erhöht hauptsächlich die Quantenausbeute der Reaktion. Da die Affinitätskonstante zwischen

MTHF und Enzym sehr gering ist, geht ein Teil (30-50 %) des zweiten Cofaktors während der Reinigung verloren (Kim und Sancar 1993). Deshalb enthalten die einzelnen Enzymchargen unterschiedliche Mengen an MTHF (Hamm-Alvarez et al., 1990). Da außerdem die starke Eigenfluoreszenz des 2. Chromophors einige spektroskopische Messungen stört, wurde ganz auf den zweiten Cofaktor zu verzichtet. Prinzipiell gibt es verschiedene Methoden, den zweiten Cofaktor zu eliminieren: Durch Bestrahlung mit UV-Licht (370 nm) (Li und Sancar 1990) oder durch Behandlung mit Natriumborhydrid (Jorns et al. 1987b) wird der 5,10-Fünfring gespalten und die entstandene Folsäure bindet nicht mehr an DNA-Photolyase. Eleganter jedoch kann die Bindungstasche molekularbiologisch destabilisiert werden. Abb. 3.7. zeigt die Umgebung des 2.Chromophors anhand kristallographischer Daten (Park et al. 1995). Der Cofaktor wird nur von wenigen Aminosäuren im Protein stabilisiert.

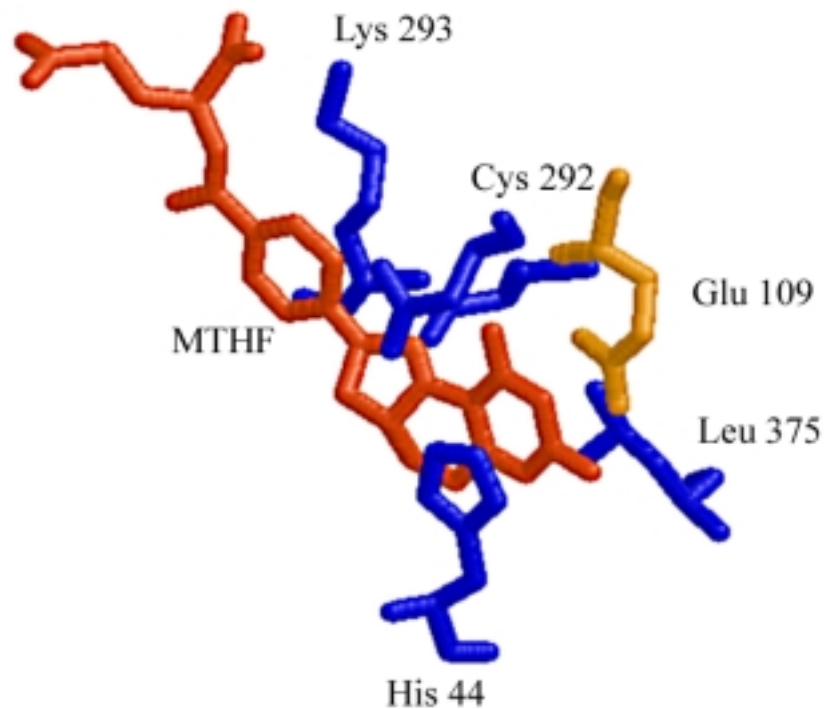


Abb. 3.7.: Proteinumgebung am 2. Chromophor MTHF. MTHF ist rot, Aminosäuren blau und die Aminosäure Glutamin 109 gelb dargestellt.

Besonders geeignet ist das bei Folat-bindenden Photolyasen hochkonservierte Glutamat 109. Wie aus Abb. 3.7. zu erkennen ist, ist die 2-Amino und die 3-Imino-Gruppe des Pterin-Restes am MTHF in einem geeigneten Abstand zur Carboxyl-Seitengruppe des Glutamats, um eine oder zwei Wasserstoffbrücken auszubilden.

Die Mutationsstrategie wurde mittels einer PCR getriebenen „site directed“ Mutationsstrategie (Marini et al., 1993) von V. Illanorova durchgeführt. Als „template“-DNA



diente das Plasmid pEPHR (Kay et al., 1999). Die verwendeten Primer sind in Tab. 2.3. gezeigt. Mit dieser Strategie wird das Codon 109 gegen ein Alanin-Codon ausgetauscht; gleichzeitig wird durch eine stille Mutation eine ubiquitäre Restriktionsschnittstelle (hier *Ava*I) erzeugt, um einen Mutationsmarker zu erhalten.

Das entstandene 1,5 kbp große Fragment wurde mit den Restriktionsendonukleasen *Eco* RI und *Bam* HI verdaut und in den *Eco* RI/*Bam* HI verdauten Vektor pNCO113 ligiert. Das nun entstandene Plasmid pNE109A wurde anschließend in *E. coli* XL1-Blue-Zellen elektrotransformiert. Das exprimierte Genprodukt wurde auf Enzymaktivität überprüft, sequenziert und in den Shuttle-Vektor p602-CAT umkloniert. Das entstandene Plasmid p602E109A wurde in den *B. subtilis* Stamm BR151 [pBL1] elektrotransformiert und das Genprodukt auf Expression und Löslichkeit überprüft.

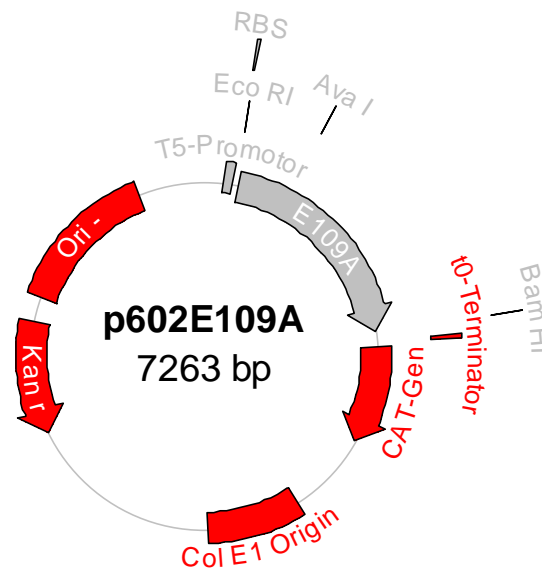


Abb. 3.8.: Das Plasmid p602E109A.

Nach Reinigung der E109A-Mutante aus *B. subtilis*, die in deutlich besserer Ausbeute als bei Reinigung aus *E. coli* erhalten wurde, wurden UV-VIS Spektren der Mutante und des Wildtyps gemessen (Abb. 3.9.).

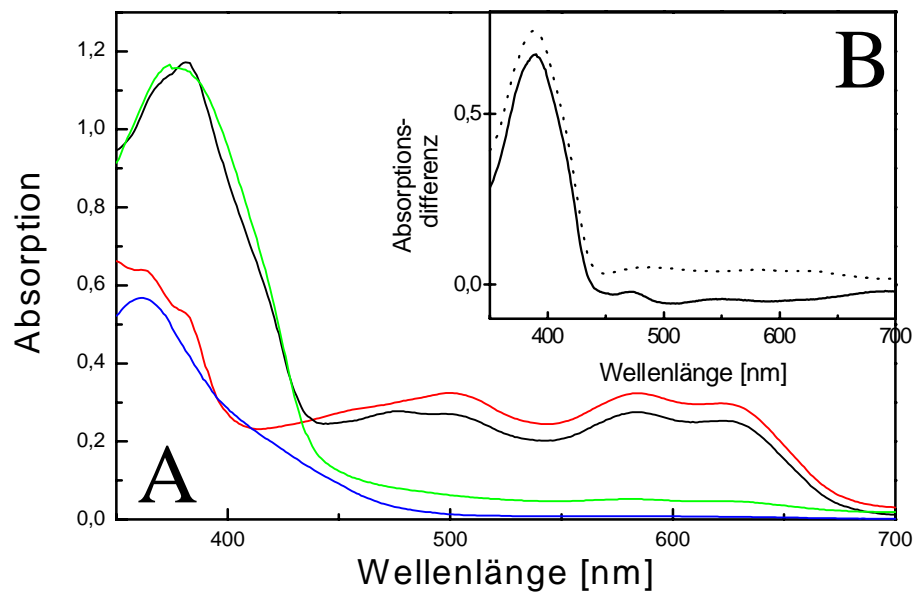


Abb. 3.9.: Normalisierte UV-VIS-Spektroskopie an DNA-Photolyase-Wildtyp und E109A-Mutante.

Spektrum **A**: Vergleich zwischen Wildtyp und E109A-Mutante: schwarze Linie: Wildtyp Photolyase in Radikal-Form; grüne Linie: Wildtyp Photolyase in Reduzierter Form; rote Linie: E109A-Mutante in Radikal-Form; blaue Linie: E109A-Mutante in reduzierter Form.

Spektrum **B**: durchgängige Linie: Differenzspektrum von Wildtyp DNA-Photolyase und E109A Mutante in Radikal-Form; gepunktete Linie: Differenzspektrum von Wildtyp DNA-Photolyase und E109A Mutante in reduzierter Form.

Wildtyp Photolyase (enthält MTHF) und E109A Mutante in der blauen Radikal-Form zeigen über 450 nm große Ähnlichkeiten in ihrem Absorptionsverhalten. Bei niedrigeren Wellenzahlen zeigt die Mutante eine deutlich verringerte Absorption. Werden beide Spektren dieser Oxidationsstufe voneinander abgezogen, ergibt sich das Spektrum in Abb. 3.9. **B**. Dieses hat eine substantielle Ähnlichkeit mit einem Spektrum eines enzymgebundenen MTHF's (Payne und Sancar 1990). Die E109A Mutante zeigte dasselbe Ausbleichen durch Belichtung mit Weißlicht wie Wildtyp-Photolyase (Jorns et al. 1987a), wodurch die katalytisch aktive reduzierte Form entsteht. Sowohl Wildtyp als auch E109A Photolyase zeigen in dieser Form keine nennenswerte Absorption oberhalb 530 nm. Unterhalb dieser Wellenlänge zeigt die Mutante eine deutlich verringerte Absorption. Die Differenz der beiden Spektren (Abb. 3.9. **B**, gepunktete Linie) zeigt wiederum ein enzymgebundenes MTHF.

### 3.2.1.3. Herstellung von stabilisotopenmarkierter DNA-Photolyase aus *E. coli*

#### 3.2.1.3.1. Herstellung von stabilisotopenmarkierter DNA-Photolyase aus *E. coli* (Apoenzym und FAD)

Um eine Vollmarkierung des exprimierten Enzyms einschließlich seines Cofaktors zu gewährleisten, wurden alle mit stabilen Isotopen markierten Stoffwechsel-Bausteine dem Medium zugesetzt. Ein potentielles Problem des verwendeten *B. subtilis*-Stamms BR151 ist seine Defizienz in der Biosynthese der Aminosäuren Tryptophan, Lysin und Histidin. Diese Aminosäuren werden dem Medium unmarkiert zugegeben und sollten nicht in der Biosynthese von Riboflavin und damit  $\text{FADH}^-$  beteiligt sein. Weiterhin muss Threonin dem Medium zugegeben werden, da Lysin und Threonin im selben Stoffwechselweg synthetisiert werden und mittels Rückkopplungshemmung reguliert sind. Der Biosyntheseweg von Riboflavins ist schematisch in Abb. 3.10. dargestellt.

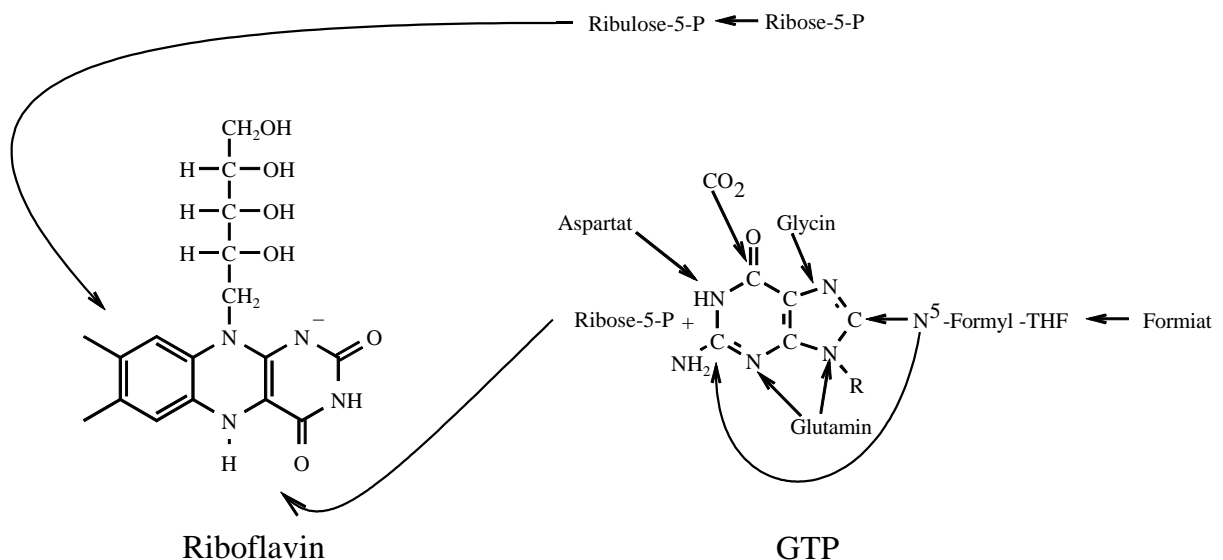


Abb. 3.10.: Schematische Darstellung des Biosyntheseweges von Riboflavin.

Wie in Abb. 3.10. dargestellt ist, wird das Flavingerüst aus drei Bausteinen synthetisiert: aus Ribulose-5-P, welches aus Ribose-5-P und damit aus Glucose gebildet wird, aus Ribose-5-P und aus GTP. Dieses wiederum wird wieder aus Ribulose-5-P synthetisiert. Das Guanosin-

Gerüst wird aus den Aminosäuren Aspartat, Glycin und Glutamin gebildet. Weiterhin stammen zwei Kohlenstoffe des Guanosin-Gerüsts vom N<sup>10</sup>-Formyl-THF das wiederum aus Formiat gebildet wird. Außerdem wird das C6 aus CO<sub>2</sub> fixiert. Da keine dieser Aminosäuren oder Stoffwechselprodukte aus den Aminosäuren Tryptophan, Lysin, Histidin oder Threonin synthetisiert wird, ist eine Teilmarkierung des Enzyms und eine Vollmarkierung des Cofaktors möglich. Entsprechend wurde eine <sup>15</sup>N-Markierung durch Anzucht des *B. subtilis* Stammes BR151[pB11] [p602E109A] auf *B. subtilis* Mineral Medium mit <sup>15</sup>NH<sub>4</sub>Cl durchgeführt.

### 3.2.1.3.2. Herstellung von DNA-Photolyase aus *E. coli* mit stabilisotopenmarkiertem Riboflavin

Um differentiell markierte Photolyasen herstellen zu können, sind zwei Voraussetzungen nötig: Erstens die Verfügbarkeit von vollmarkiertem (und differentiell markiertem) Riboflavin und zweitens eine effektive Möglichkeit des markierten Riboflavin Imports in die verwendeten Zellen.

Stabilisotopenmarkiertes Riboflavin wird durch Anzucht eines Riboflavin-produzierenden Stamms auf stabilisotopenmarkierten Vorstufen hergestellt.

In den *B. subtilis* Stamm RB50 wurden zwei Riboflavin Operons ([pRF69] und [pRF93]), die mit einem starken Phagenpromotor und einer Antibiotikaresistenz versehen wurden, ins Genom integriert. Er enthält somit im Genom eine repetierende Sequenz, die einerseits die Gene der Riboflavin-Synthese, andererseits das Gen für Chloramphenicol-Resistenz codieren (Hümbelin et al. 1999). Der Stamm RB50::[pRF69]<sub>n</sub>::[pRF93]<sub>m</sub> produziert ca. 100 mal mehr Riboflavin als entsprechende Wildtyp-Stämme (Perkins et al. 1998). Der Stamm wurde auf Mineral-Medium, dem Stickstoff-und/oder Kohlenstoff-Quelle stabilisotopenmarkiert wurde, angezogen und das ins Medium exportierte Riboflavin gereinigt. Es wurde angenommen, dass die Konzentration von endogenem Riboflavin in den Zellen gering ist.

Mit dieser Methode wurden zwei Markierungen synthetisiert: Eine <sup>15</sup>N-Markierung und eine <sup>13</sup>C-Markierung. Wie in Abb. 3.11., die den Verlauf der Zelldichte und der Riboflavinkonzentration zeigt, zu erkennen ist, wachsen die Zellen innerhalb von einem Tag an und sind die restlichen sechs Tage in einer quasistationären Phase, in der trotzdem noch Riboflavin gebildet wird.

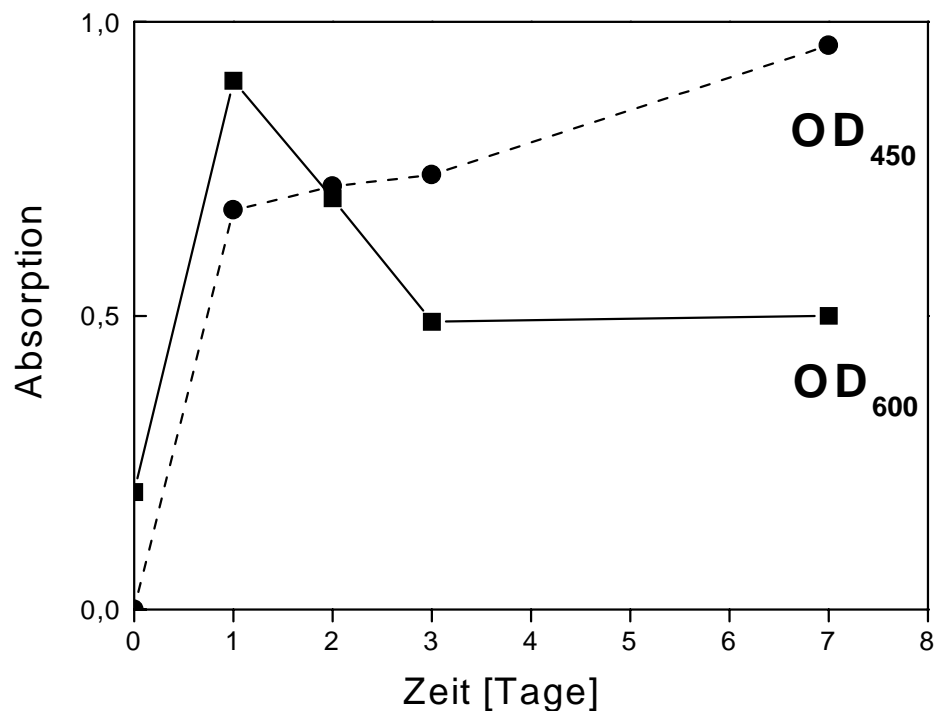


Abb. 3.11.: Anzucht des Stammes RB50::[pRF69]<sub>n</sub>::[pRF93]<sub>m</sub>: durchgezogene Linie: Absorption bei 600 nm, gestrichelte Linie: Absorption bei 450 nm.

Die Reinigung des Riboflavins erfolgt durch Säulenchromatographie mit Florisil. Dieses Material bindet unter wässrigen Bedingungen Riboflavin mit hoher Affinität.

Die Ausbeute an reinem Riboflavin beträgt 1-2 % bezogen auf eingesetzte Glucose. In Abb. 3.12. ist ein UV-VIS-Spektrum des gereinigten Riboflavins gezeigt. Es entspricht dem in der Literatur beschriebenen Spektrum von Riboflavin. Auch das gemessene <sup>13</sup>C-NMR-Spektrum zeigt keine Verunreinigungen und entspricht einem Riboflavinspektrum (Spektrum nicht gezeigt).

Die Ausbeute an Riboflavin ist zwar eigentlich sehr gering; der Prozess ist aber auf eine kontinuierliche Fermenter-Kultur ausgelegt. Darum ist ein „down-scaling“ auf eine Kolben-Anzucht vermutlich nicht ohne Ausbeuteverluste zu verwirklichen. Außerdem ist das Mineral-Medium nicht auf eine hauptsächlich stationär wachsende Kultur ausgelegt. Sicherlich kann die Ausbeute an Riboflavin deutlich gegenüber den erzielten Werten gesteigert werden, dazu muss aber eine langwierige Medien und Anzucht-Optimierung vorgenommen werden.

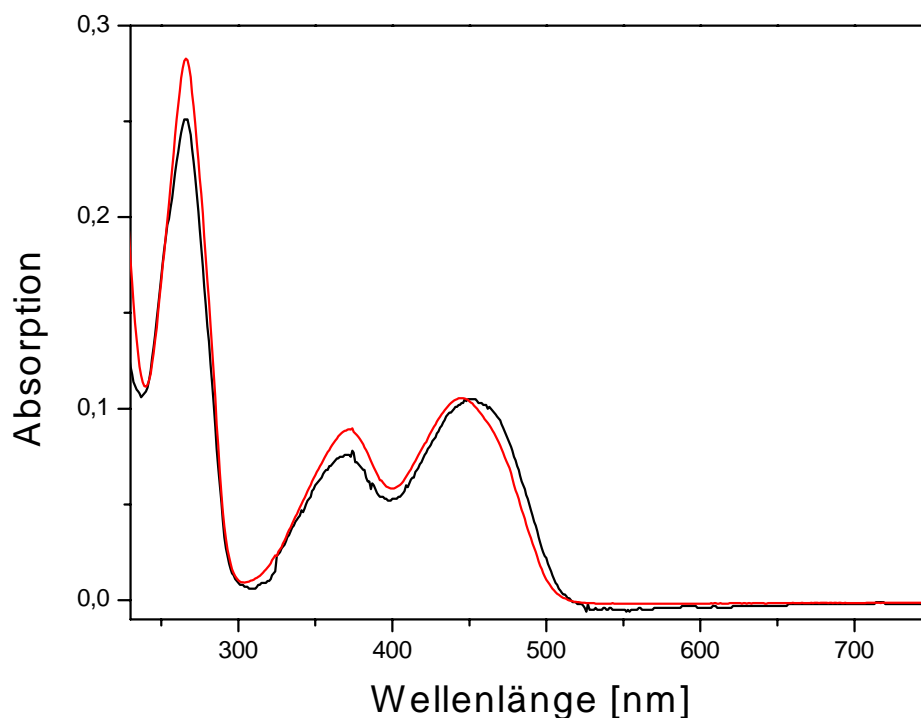


Abb. 3.12.: UV-VIS-Spektrum von Riboflavin. Schwarze Linie:  $^{13}\text{C}$ -Isotopenmarkiertes Riboflavin, rote Linie: unmarkiertes Riboflavin zum Vergleich. Das UV-VIS-Spektrum des  $^{15}\text{N}$ -Isotopenmarkierten Riboflavins unterscheidet sich nicht.

Das gereinigte Riboflavin wird zu einem *B. subtilis* Mineral Medium mit einer Endkonzentration von 3 mg/L supplementiert und der Stamm BR151[pB11] [p602E109A] angezogen. *B. subtilis* verfügt über eine effiziente Aufnahme von Riboflavin (Cecchini et al. 1979). Wie in Material und Methoden beschrieben, wurde die Proteinexpression bei einer  $\text{OD}_{600}$  von 0,7 durch Zugabe einer finalen IPTG Konzentration von 1 mM gestartet und ca. 16 h weitergeschüttelt. Die Aufarbeitung der erhaltenen Zellen und Reinigung des Proteins erfolgte analog von unmarkierter DNA-Photolyase.

### 3.2.1.3.3. Herstellung von DNA-Photolyase aus *E. coli* mit differenziell-stabilisotopenmarkiertem Riboflavin

Differenziell markiertes Riboflavin wurde mit einer kombinierten chemischen und enzymatischen Synthese von Dr. K. Kis hergestellt. Es wurde ein  $^{15}\text{N}$ -markiertes Riboflavin analog zum voll-stabilisotopenmarkierten Riboflavin dem *B. subtilis* Mineral Medium mit einer Endkonzentration von 3 mg/L supplementiert und der Stamm BR151[pB11]

[p602E109A] darauf angezogen. Wie in Material und Methoden beschrieben, wurde die Proteinexpression bei einer  $OD_{600}$  von 0,7 durch Zugabe einer finalen IPTG Konzentration von 1 mM gestartet und ca. 16 h weitergeschüttelt. Die Aufarbeitung der erhaltenen Zellen und Reinigung des Proteins erfolgte analog von unmarkierter DNA-Photolyase.

### 3.2.2. Biochemische Arbeiten mit DNA-Photolyase aus *A. nidulans*

#### 3.2.2.1. Isolierung chromosomaler DNA aus *A. nidulans*

Es wurden 100 mL Mineral-Medium mit dem Cyanobakterium *A. nidulans* bis zu einer  $OD_{600}$  von 1,2 angezogen und wie in 2.2.5. beschrieben, geerntet. Zur Isolierung der chromosomalen DNA wurden 0,25 g Zellfeuchtmasse wie in Material und Methoden beschrieben aufgeschlossen, DNA mittels eines Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Gemisches extrahiert und mit Isopropanol gefällt. Nach Waschen mit Ethanol und Resuspendierung in Wasser betrug die DNA Konzentration 70 ng/ $\mu$ L. Zur Überprüfung der Isolierung wurde eine 0,8 % Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Es zeigt eine breite, aber deutliche Bande im Bereich von 15-20 kbp. Keinerlei weiterer Hintergrund war sichtbar.

#### 3.2.2.2. Klonierung und Expression des Photolyase-Gens aus *A. nidulans*

Mit den beiden Primern ANA-1A und ANA-1B wurde eine PCR mit der vorher isolierten chromosomalen DNA durchgeführt. Die Annealingtemperatur betrug 52 °C. Das erhaltene PCR-Produkt enthält das Gen der DNA-Photolyase sowie ca. 50 bp Überhang auf beiden Seiten. Das Fragment wurde in einen Eco RV verdauten pZERO2 Vektor ligiert und in *E. coli* XL1-Blue Zellen elektrotransformiert, um das DNA Fragment mittels Restriktionsanalyse zu überprüfen. Das Plasmid pZERO2 ist ein Klonierungsvektor, bei dem hinter der „multi cloning site“ (mcs) ein für *E. coli* toxisches Gen codiert ist. Wird nun ein PCR-Fragment in die mcs ligiert, ist die Wahrscheinlichkeit groß, dass das lethale Gen aufgrund einer Verschiebung des Leserasters nicht mehr translatiert wird und die Zelle damit überlebt.

Schließt sich der ohne Überhänge geschnittene Vektor während der Ligation wieder, wird das *ccnB*-Gen exprimiert und die Zelle geht zu Grunde. Der große Vorteil dieses Vektors ist somit, dass PCR-Fragmente ohne weitere Bearbeitung in einen Vektor ligiert und weiterverarbeitet werden können.

Eine zweite PCR wurde nach Reinigung des Vektors mit den Primern ANA-2A und ANA-2B-Hind durchgeführt (Annealingtemperatur: 52 °C). Mit diesen Primern wird am 3'-Ende eine Hind III Restriktionsschnittstelle eingeführt und am 5'-Ende ein Überhang eingeführt, welcher mit der Sequenz des in der nachfolgenden PCR verwendeten Primers *kEco RI* übereinstimmt. Die dritte PCR wurde nach Reinigung des Fragments mit den Primern *kEco RI* und ANA-2B-Hind durchgeführt (Annealingtemperatur: 55 °C). Der Primer *kEco RI* besitzt eine Erkennungssequenz der *Eco RI* Restriktionsendonuklease und eine ribosomale Bindungsstelle (RBS). Somit ist eine optimale Expression garantiert. Das DNA Fragment wurde mit den beiden Restriktionsendonukleasen *Eco RI* und *Hind III* verdaut, über ein Agarose-Gel gereinigt, mit einem *Eco RI* und *Hind III* verdauten Vektor pNCO 113 ligiert und in *E. coli* XL1-Blue Zellen elektrotransformiert. Es resultierte das neue Plasmid pNANA.

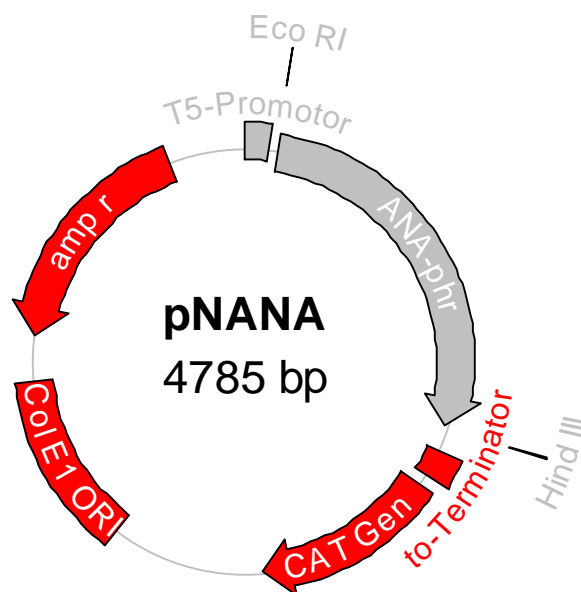


Abb. 3.13.: Schematische Darstellung des Plasmids pNANA.

Vier positive Klone wurden auf Expression getestet. Drei zeigten auf der SDS-PAGE eine gut sichtbare Bande bei ungefähr 50 kDa. Ein Klon wurde ausgewählt und mit den Primern pNCO(-180), pNCOterm, ANA-3A-500 und ANA-3A-901 sequenziert, wobei keine Mutation



festgestellt werden konnte. Für eine stabilere Expression wurde das Plasmid pNANA in den Stamm M15 [pREP4] durch Elektrotransformation umklontiert.

Auch hier konnte eine deutliche Expression sowohl in den gesamten Zellen als auch im Rohextrakt festgestellt werden.

### 3.2.2.3. Reinigung von rekombinanter DNA-Photolyase aus *A. nidulans*

Nach einer Großanzucht von 4 L Medium wurden die Zellen (es wurden Chargen von etwa 10 g Feuchtzellmasse gewählt) aufgeschlossen. Der vom Zelldebris befreite Rohextrakt wurde auf eine Blaue Sepharose-Säule aufgetragen und solange nachgewaschen, bis keinerlei Absorption bei 280 nm mehr messbar war. Es wurde mit einem Salz-Gradienten über 150 mL eluiert. Das Elutionsprofil ist schematisch in Abb. 3.14. A dargestellt.

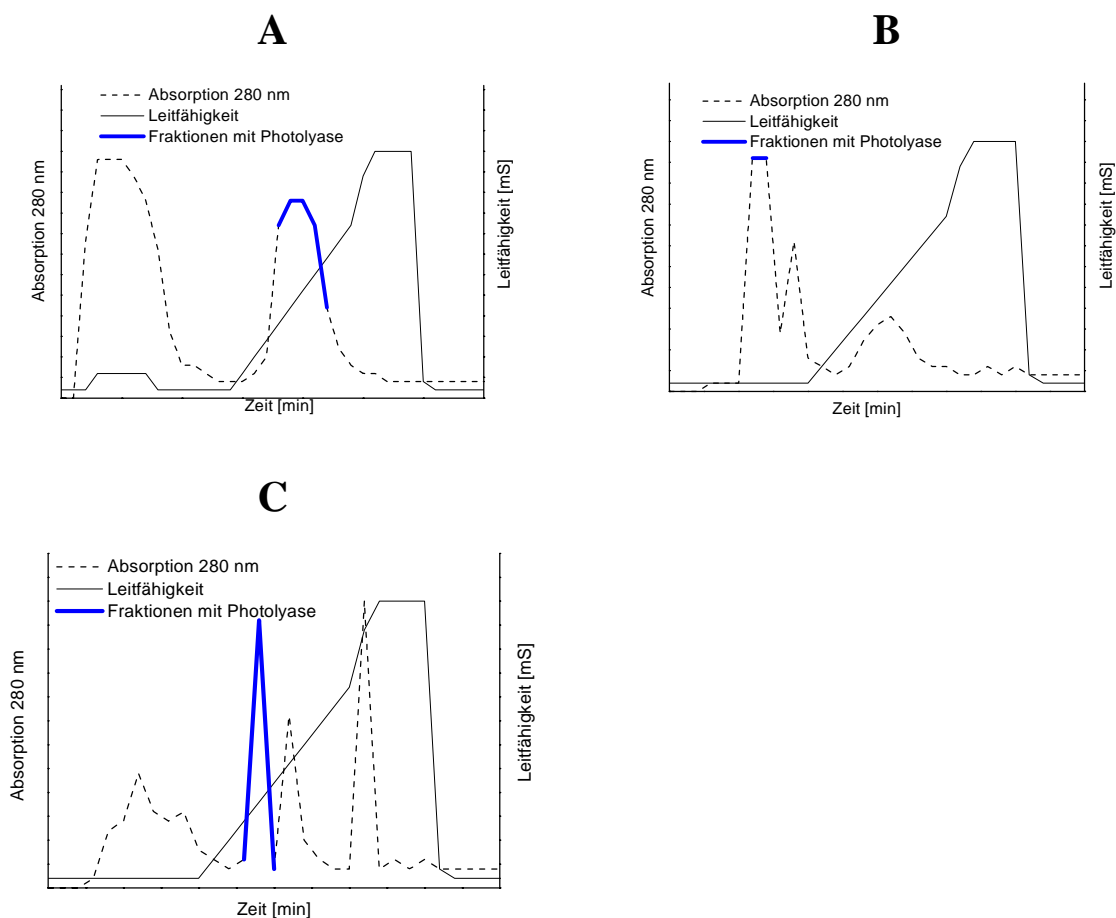


Abb. 3.14.: Elutionsprofil (schematisch) der drei Chromatographieschritte: **A:** Blaue Sepharose; **B:** Heparin Sepharose und **C:** Mono-Q-Sepharose.

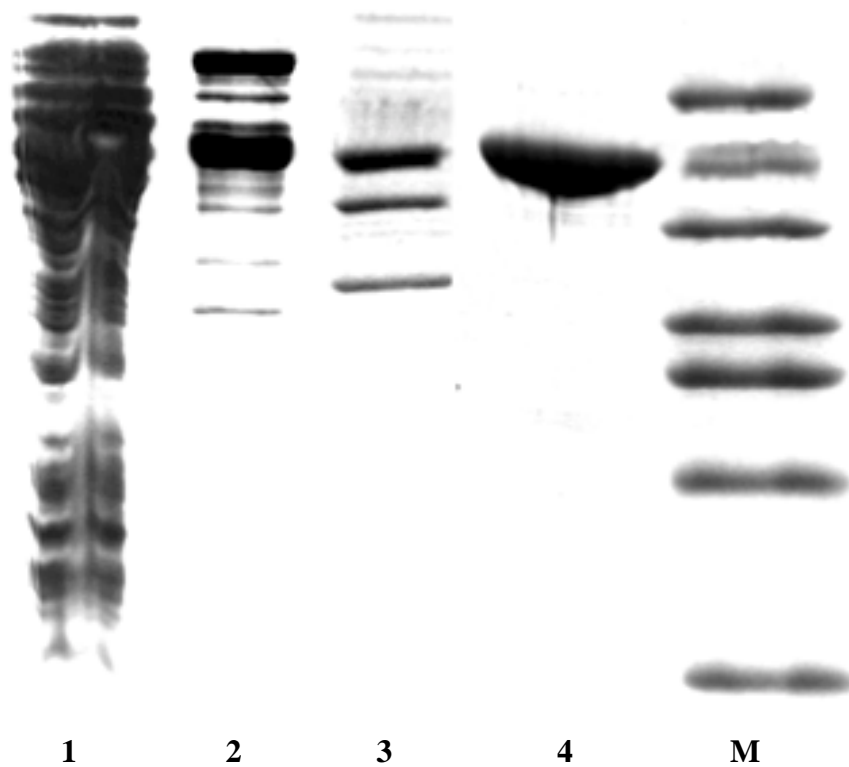


Abb. 3.15.: 15 %SDS-PAGE der Reinigung der DNA-Photolyase aus *A. nidulans*.

Spur 1: Rohextrakt aus *E. coli*

Spur 2: Vereinigte Fraktionen nach Blauer Sepharose

Spur 3: Vereinigte Fraktionen nach Heparin Sepharose

Spur 4: Vereinigte Fraktionen nach Q-Sepharose

Spur M: Molekular-Marker (66 kDa, 44 kDa, 36 kDa, 28 kDa, 24 kDa, 20 kDa und 14 kDa)

Eine SDS-PAGE wurde zur Überprüfung durchgeführt (Abb. 3.15, Spur 2). DNA-Photolyase aus *A. nidulans* konnte mit gutem Reinigungseffekt von Blauer Sepharose eluiert werden. Die vereinigten und entsalzten Proteinfractionen wurden auf eine mit Heparin-Sepharose Material gefüllten Säule aufgetragen, gewaschen und mit einem Salzgradienten über 200 mL eluiert (Elutionsprofil: Abb. 3.14. **B**). Im Gegensatz zur DNA-Photolyase aus *E. coli* band die DNA-Photolyase aus *A. nidulans* nicht an dieses Säulenmaterial, sondern wurde komplett im Durchlauf wiedergefunden. Trotzdem war ein deutlicher Reinigungseffekt zu erkennen (Abb. 3.15, Spur 3). Die wiedervereinigten Proteinfractionen wurden auf eine Mono-Q-Sepharose aufgetragen und mit einem Salz-Gradienten eluiert. DNA-Photolyase aus *A. nidulans* band auf dem Säulenmaterial und konnte in einer scharfen Bande bei ca. 150 mM

KCl eluiert werden (Elutionsprofil: Abb. 3.14. C). Wie im SDS-PAGE zu sehen ist, war das Protein zu mindestens 95 % sauber. Die Chargen wurden durch Ultrafiltration auf die gewünschte Konzentration gebracht, die Glycerinkonzentration wurde auf 20 % erhöht und das Protein bei -70 % gelagert.

### 3.2.3. Biochemische Arbeiten mit DNA-Photolyase aus *T. thermophilus*

#### 3.2.3.1. Isolierung chromosomaler DNA aus *T. thermophilus*

Es wurden 100 mL Voll-Medium mit dem Bakterium *T. thermophilus* bis zu einer OD<sub>600</sub> von 3,2 angezogen und wie in 2.2.5. beschrieben, geerntet. Zur Isolierung der chromosomalen DNA wurden 0,25 g Zellfeuchtmasse wie in Material und Methoden beschrieben aufgeschlossen, DNA mittels eines Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Gemisches extrahiert und mit Isopropanol gefällt. Nach Waschen mit Ethanol und Resuspendierung in Wasser betrug die DNA Konzentration 20 ng/μL. Zur Überprüfung der Isolierung wurde eine 0,8 % Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Es zeigt eine breite, aber deutliche Bande im Bereich von 15-20 kbp, wobei kein weiterer Hintergrund sichtbar war.

#### 3.2.3.2. Klonierung und Expression des Photolyase-Gens aus *T. thermophilus*

Mit den beiden Primern TH-1A und TH-1B wurde eine PCR mit der vorher isolierten chromosomalen DNA durchgeführt. Es wurden 5 Zyklen mit einer Annealingtemperatur von 53 °C und 20 Zyklen mit einer Annealingtemperatur von 57 °C durchgeführt. Wichtig für die Durchführung aller PCR's mit thermophiler DNA ist die Zugabe des Reagenz GC-Melt, weil sonst aufgrund des hohen GC-Gehalts der DNA keine komplette Einzelstrangbildung möglich ist und daher zu kleine PCR-Produkte entstehen. Das erhaltene PCR-Produkt mit einer Länge von ca. 1300 bp enthält das Gen der DNA-Photolyase sowie ca. 50 bp Überhang auf beiden Seiten. Das Fragment wurde mittels präparativer Gelelektrophorese gereinigt, in einen

Eco RV verdauten pZERO2 Vektor ligiert und in *E. coli* XL1-Blue Zellen elektrotransformiert, um das DNA Fragment mittels Restriktionsanalyse zu überprüfen.

Eine zweite PCR wurde nach Reinigung des Vektors mit den Primern TH-4A-Nco und TH-4B-Bam durchgeführt (Annealingtemperatur: 63 °C). Mit diesen Primern wird am 3'-Ende eine Bam HI Restriktionsschnittstelle und am 5'-Ende eine Nco I Restriktionsschnittstelle eingeführt. Das DNA Fragment wurde mit den beiden Restriktionsendonukleasen Nco I und Bam HI verdaut, über ein Agarose-Gel gereinigt, mit einem Nco I und Bam HI verdauten Vektor pNCO 113 ligiert und in *E. coli* XL1-Blue Zellen elektrotransformiert. Es resultierte das neue Plasmid pNCO-TPL.

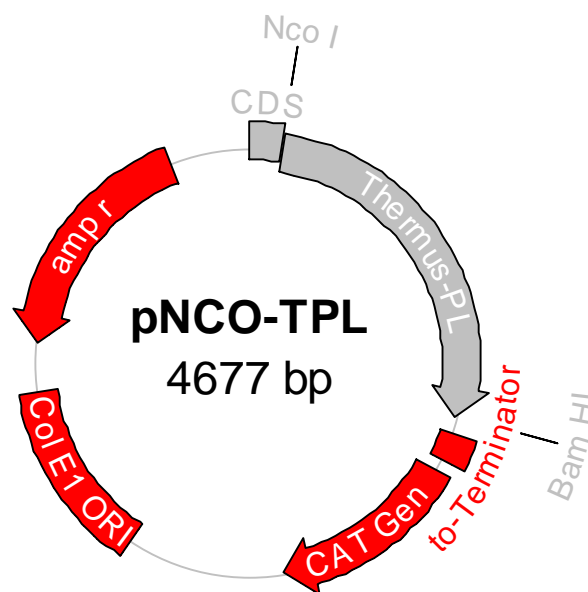


Abb. 3.16.: Schematische Darstellung des Plasmids pNCO-TPL.

Vier positive Klone wurden auf Expression getestet. Drei zeigten auf der SDS-PAGE eine gut sichtbare Bande bei ungefähr 47 kDa. Ein Klon wurde ausgewählt und mit den Primern pNCO(-180), pNCOterm, TH-3A-500 und TH-3A-901 sequenziert, wobei keine Mutation festgestellt werden konnte. Für eine stabilere Expression wurde das Plasmid pNCO-TPL in den Stamm M15 [pREP4] durch Elektrotransformation umklont.

Auch hier konnte eine deutliche Expression sowohl in den gesamten Zellen als auch im Rohextrakt festgestellt werden.

### 3.2.3.3. Reinigung von rekombinanter DNA-Photolyase aus *T. thermophilus*

Nach einer Großanzucht von 4 L Medium wurden die Zellen (es wurden Chargen von etwa 13 g Feuchtzellmasse gewählt) aufgeschlossen. Der vom Zelldebris befreite Rohextrakt wurde auf eine Blaue Sepharose aufgetragen und solange nachgewaschen, bis keinerlei Absorption bei 280 nm mehr messbar ist. Mit einem linearen Salz-Gradienten über 150 mL wurde eluiert. Das Elutionsprofil ist schematisch in Abb. 3.17. **A** dargestellt. Nach Ultrafiltration wurde der Proteinmix auf eine Gelfiltrationssäule (Superdex 75) aufgetragen und entwickelt (Abb. 3.17. **B**). Die DNA-Photolyase aus *T. thermophilus* eluierte nach 145 mL. Die vereinigten Fraktionen wurden mittels Ultrafiltration konzentriert, mit 10 % Glycerin versetzt und bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

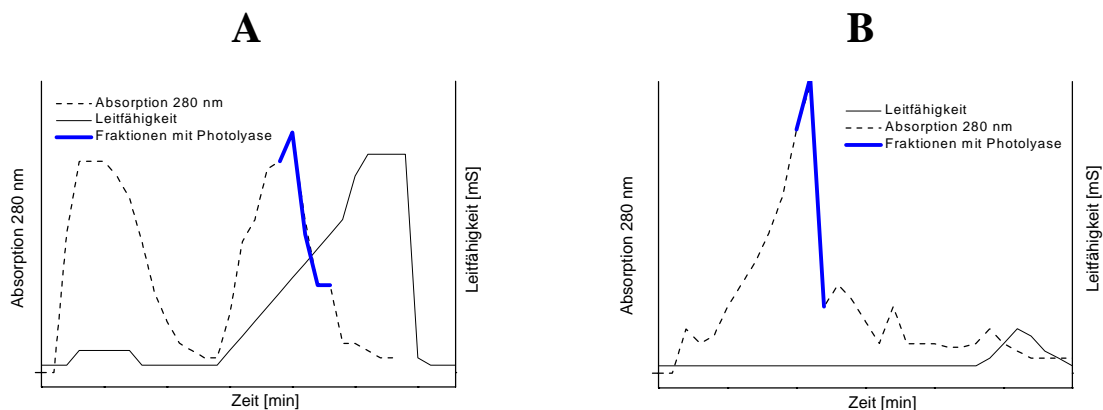


Abb. 3.17.: Elutionsprofil (schematisch) der beiden Chromatographieschritte: **A**: Blaue Sepharose; **B**: Superdex 75.

Zur Überprüfung der Reinheit wurde eine SDS-PAGE durchgeführt (Abb. 3.18.). Im Gegensatz zu der DNA-Photolyase aus *E. coli* ist im Rohextrakt eine deutliche Bande der DNA-Photolyase aus *T. thermophilus* zu erkennen (Abb. 3.18. Spur 1). DNA-Photolyase aus *T. thermophilus* konnte mit gutem Reinigungseffekt von Blauer Sepharose eluiert werden. Die nach Gelfiltration vereinigten Proteinfractionen sind in Spur 3 aufgetragen. Das Protein ist zu  $> 90\%$  gereinigt und kann weiterverwendet werden (Abb. 3.18.).

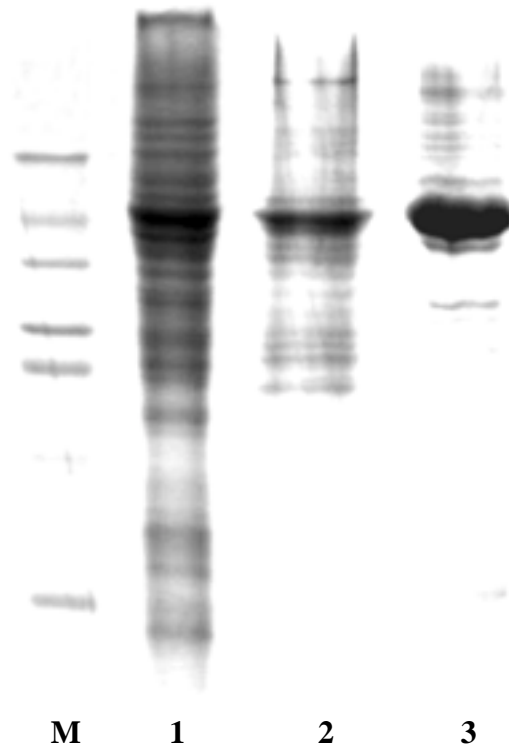


Abb. 3.18.: 15 % SDS-PAGE der Reinigung der DNA-Photolyase aus *T. thermophilus*.  
Spur M: Molekular-Marker (66 kDa, 44 kDa, 36 kDa, 28 kDa, 24 kDa, 20 kDa und 14 kDa)  
Spur 1: Rohextrakt aus *E. coli*  
Spur 2: Vereinigte Fraktionen nach Blauer Sepharose  
Spur 3: Vereinigte Fraktionen nach Superdex 75

- 3.3. Spektroskopische Arbeiten mit DNA-Photolyase aus *E. coli*.
- 3.3.1. Fourier-Transform-Infrarot-Spektroskopie mit rekombinanter DNA-Photolyase aus *E. coli*.
- 3.3.1.1. Theoretische Grundlagen der Fourier-Transform-Infrarot-Spektroskopie

Struktur und Funktion von Proteinen auf atomarem Niveau zu bestimmen, stellt für die heutige naturwissenschaftliche Forschung eine Herausforderung dar. Durch Röntgenstrukturanalyse kann die Struktur von Proteinen, die sich kristallisieren lassen, auf atomarer Ebene bestimmt werden. Bei Struktur- und Funktionsbestimmung mit Hilfe der NMR Spektroskopie kann in Lösung gearbeitet werden, diese Methode ist aber bisher auf kleine Proteine beschränkt. Beide Methoden liefern ein Bild der Struktur der Proteine in einem statischen Zustand.

Um Änderungen von Proteinen, Substraten und Cofaktoren auf atomarem Niveau während einer Reaktion verfolgen zu können, hat sich Fourier-Transform-Infrarot-(FT-IR)-Spektroskopie als eine neue, sensitive und sehr spezifische Methode entwickelt (Gerwert, 1988). Mit der FT-IR-Spektroskopie können sowohl Protein-Seitengruppen als auch Rückrat-Vibrationen verfolgt werden (Brainman und Rothschild, 1988). Außerdem kann mittels verschiedener zeitaufgelöster Techniken wie „rapid-scan“ und „step-scan“ (Uhmann et al., 1991) eine Zeitauflösung bis in den Nanosekundenbereich erreicht werden (Rammelsberg et al. 1997). Um zeitaufgelöste Spektren messen zu können, müssen aber mehrere Bedingungen erfüllt sein: Der Prozess muss zyklisch steuerbar sein und muss mindestens 1000 Zyklen unverändert sein; denn um ein annehmbares Signal zu Rausch Verhältnis zu erhalten, werden Tausende von aufgenommenen Zyklen überlagert.

Um aus der Gesamtabsorption eines Proteins, das im wesentlichen durch die Absorptionsbanden des Proteingerüsts wie der Amid I-Bande bei ca.  $1650\text{ cm}^{-1}$  (C=O) und Amid II Bande bei ca.  $1550\text{ cm}^{-1}$  (C-N, NH) bestimmt wird, die Banden der funktionell

relevanten Gruppen zu selektieren, werden Differenzspektren zwischen den Ausgangs- und Endzuständen gebildet (Siebert et al. 1983).

Ein weiterer wichtiger Schritt ist die Zuordnung der einzelnen Differenzbanden zu den verschiedenen Gruppen des Proteins. Dies wird durch Stabilisotopenmarkierung oder durch gerichtete Mutation mittels molekularbiologischer Methoden durchgeführt (Gerwert 1999). Weiterhin können einzelne Aminosäuren und das Peptid-Rückgrat mittels genetischer Methoden stabilisotopenmarkiert werden (Ludlam et al. 1995).

Die DNA-Photolyase stellt ein gutes Modellsystem für eine Untersuchung enzymatischer Reaktionen mittels FT-IR-Spektroskopie dar: Die enzymatische Reaktion kann mit Licht kontrolliert werden und das Enzym durchläuft während der enzymatischen Reaktion einen zyklischen Prozess. Folgende lichtgesteuerten Prozesse können unterschieden werden:

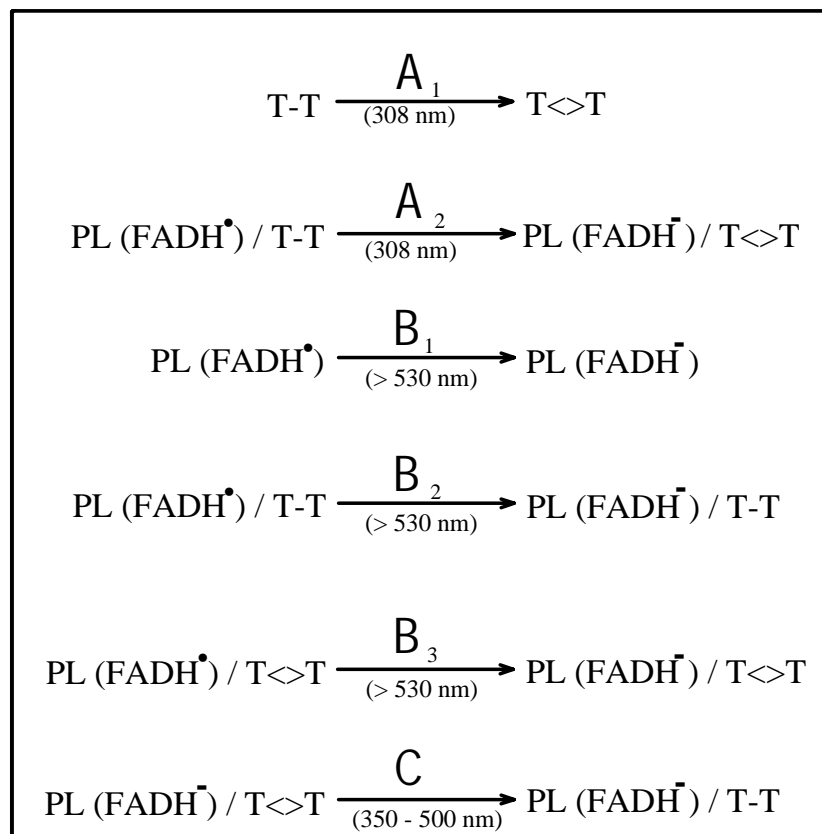


Abb. 3.19.: Beobachtbare Reaktionen von DNA-Photolyase und Substrat/Produkt.

**A<sub>1</sub>**: Schädigung von DNA ; **A<sub>2</sub>**: Schädigung von DNA in Anwesenheit von DNA-Photolyase; **B<sub>1</sub>**: Photoreduktion von DNA-Photolyase; **B<sub>2</sub>**: Photoreduktion von DNA-Photolyase in Anwesenheit von Produkt; **B<sub>3</sub>**: Photoreduktion von DNA-Photolyase in Anwesenheit von Substrat; **C**: Photoreparatur von Substrat durch DNA-Photolyase. Die benötigten Wellenlängen sind in Klammern angegeben.



Erstens kann DNA mittels Excimer-Laserstrahlung (308 nm) geschädigt werden (Reaktion **A<sub>1</sub>**). Es wird davon ausgegangen, dass die Hauptschädigung der DNA aus Cyclobutan-Dimeren (T<>T) besteht und andere Schädigungen eine untergeordnete Rolle spielen. Dieser Prozess kann auch in Anwesenheit von DNA-Photolyase durchgeführt werden (Reaktion **A<sub>2</sub>**). Zweitens kann DNA-Photolyase aus der katalytisch inaktiven Semichinon-Form in die katalytisch aktive reduzierte Form photoreduziert werden, wenn dem Puffer reduzierende Reagenzien wie DTT zugesetzt werden (Reaktion **B<sub>1</sub>**). Dies kann auch unter Anwesenheit von Produkt (Reaktion **B<sub>2</sub>**) oder Substrat (Reaktion **B<sub>3</sub>**) durchgeführt werden. Drittens kann die enzymatische Reaktion zwischen geschädigter DNA und DNA-Photolyase verfolgt werden (Reaktion **C**).

Langfristig sollen zeitaufgelöste Messungen von Enzym mit oder ohne Substrat erfolgen. Als Vorversuche müssen aber alle vorkommenden Reaktionen durchgeführt werden, um eine Bandenzuordnung vornehmen zu können.

Alle FT-IR spektroskopischen Untersuchungen wurden mit der E109A-Mutante der *E. coli* DNA-Photolyase durchgeführt, weil einerseits homogene Chargen gefordert sind und andererseits die Prozesse am Antennen-Cofaktor in diesem Stadium nicht messbar sind.

### 3.3.1.2. Messungen der Photoreduktion der rekombinanten DNA-Photolyase aus *E. coli*.

Die Photoreduktion der DNA-Photolyase wird durch Bestrahlung der Enzymprobe mit Rotlicht ( $\lambda > 530$  nm) durchgeführt (Reaktion **B<sub>1</sub>**). Ein FT-IR-Spektrum wird vor Belichtung gemessen, ein weiteres nach 3 min Belichtung. Die Differenz der beiden Spektren wird für die Auswertung benutzt. Sowohl positive als auch negative Differenzbanden mit einer relativen Intensität von ca. 0,1 % können identifiziert werden. Positive Vibrationsänderungen werden der reduzierten-Form der DNA-Photolyase zugeordnet, negative Vibrationsänderungen der Semichinon-Form der DNA-Photolyase. Diese Reaktion wurde außerdem mit zugegebenem Produkt bzw. Substrat, komplett <sup>15</sup>N-markierter und Deuterium ausgetauschter DNA-Photolyase durchgeführt. Alle Daten sind in Abb. 3.20. zusammengefasst.

Spektrum 1 zeigt ein deutliches Differenzmuster im Bereich der Amid-Bindungen zwischen 1700 und 1600 cm<sup>-1</sup>, weiterhin eine starke negative Bande bei 1532 cm<sup>-1</sup>, eine positive Bande bei 1396 cm<sup>-1</sup> und kleinere Differenzmuster im fingerprint-Bereich (1300 bis 1100 cm<sup>-1</sup>).

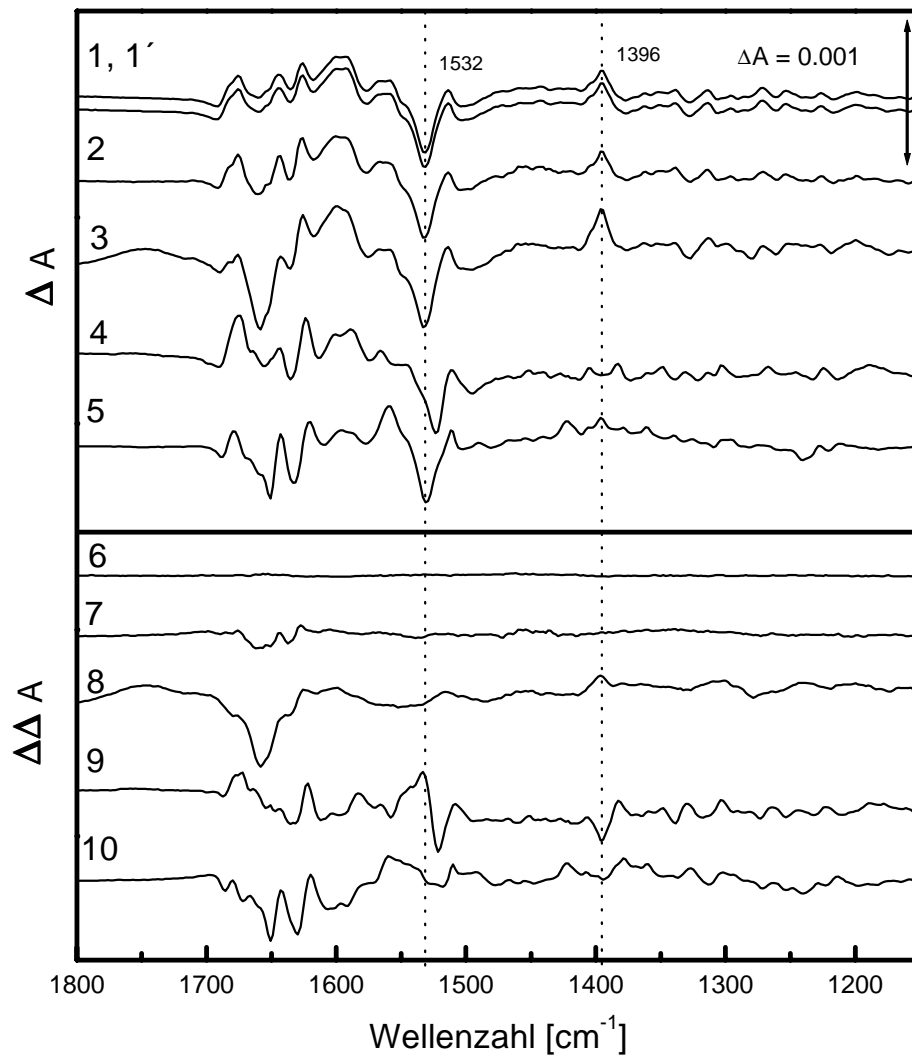


Abb. 3.20.: Photoreduktion von DNA-Photolyase in der radikalischen Form.  
 Spektrum 1: Photoreduktion von DNA-Photolyase;  
 Spektrum 2: Photoreduktion von DNA-Photolyase und Produkt;  
 Spektrum 3: Photoreduktion von DNA-Photolyase; und Substrat;  
 Spektrum 4: Photoreduktion von  $^{15}\text{N}$  markierter DNA;  
 Spektrum 5: Photoreduktion von Deuterium ausgetauschter DNA-Photolyase;  
 Spektrum 6: Differenzspektrum zwischen Spektrum 1 und Spektrum 1';  
 Spektrum 7: Differenzspektrum zwischen Spektrum 2 und Spektrum 1;  
 Spektrum 8: Differenzspektrum zwischen Spektrum 3 und Spektrum 1;  
 Spektrum 9: Differenzspektrum zwischen Spektrum 4 und Spektrum 1;  
 Spektrum 10: Differenzspektrum zwischen Spektrum 5 und Spektrum 1.  
 Die beiden gestrichelten Linien geben die Positionen  $1396\text{ cm}^{-1}$  und  $1532\text{ cm}^{-1}$  an.

Um die Reproduzierbarkeit der Messmethodik zu überprüfen, wurde die Reaktion mit zwei verschiedenen Enzymchargen, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten hergestellt wurden, durchgeführt (Abb. 3.20., Spektrum 1 und 1'). Beide Spektren zeigen exakt dieselben Banden und Differenzmuster. Zur Verdeutlichung ist die Differenz der Spektren 1 und 1' in Spektrum 6 gezeigt: die Subtraktion der beiden Spektren ergibt eine gerade Linie. Daraus folgt, dass beide Spektren nahezu identisch sind.

Die Photoreduktion von DNA-Photolyase in Anwesenheit von Produkt (ungeschädigter DNA) ist in Spektrum 2 gezeigt (Reaktion **B**<sub>2</sub>). Auch hier sind kaum Unterschiede zum Spektrum 1 erkennbar. Die Differenz der beiden Spektren (Spektrum 7) zeigt eine gerade Linie mit zwei kleinen Differenzmustern, eins im Amid-Bereich um  $1650\text{ cm}^{-1}$  und das zweite im Bereich von  $1450\text{ cm}^{-1}$ . Beide Differenzmuster haben jedoch geringe Absorptionsänderungen.

Die Photoreduktion von DNA-Photolyase in Anwesenheit von Substrat (UV-geschädigte DNA) ist in Spektrum 3 gezeigt (Reaktion **B**<sub>3</sub>). Qualitativ sind kaum Unterschiede zum Spektrum 1 erkennbar. Die Differenz der beiden Spektren (Spektrum 8) zeigt deutlich sichtbare Abweichungen. Besonders auffällig ist die Differenzbande im Bereich  $1670\text{ cm}^{-1}$ . Darüber hinaus sind im ganzen Spektrum weitere, allerdings geringe Differenzmuster zu erkennen.

Die Photoreduktion von <sup>15</sup>N-markierter DNA-Photolyase ist in Spektrum 4 gezeigt. Spektrum 4 ist ähnlich Spektrum 1, aber die starke negative Bande bei  $1532\text{ cm}^{-1}$  in Spektrum 1 ist nach  $1524\text{ cm}^{-1}$  verschoben und die positive Bande bei  $1396\text{ cm}^{-1}$  in Spektrum 1 ist verschwunden. Stattdessen sind zwei kleinere Banden bei  $1381\text{ cm}^{-1}$  und  $1408\text{ cm}^{-1}$  zu erkennen. Eine umfangreichere Bewertung des Einflusses der <sup>15</sup>N-Markierung ist wieder durch die Subtraktion der stabilisotopenmarkierten Photolyase von Spektrum 1 (Photoreduktion mit unmarkierter Photolyase) möglich (Spektrum 9). Deutlich zu erkennen ist, dass sich die Hauptdifferenzmuster nicht auslöschen, sondern starke Doppeldifferenzmuster bilden (im Bereich  $1530\text{ cm}^{-1}$  und  $1300\text{ cm}^{-1}$ ). Auch der Amid II Bereich ( $1550\text{ cm}^{-1}$ ) ist stark verschoben. Zusammengefasst werden kann, dass, wie erwartet, zahlreiche Banden aufgrund der <sup>15</sup>N-Markierung verschoben sind.

Wird DNA-Photolyase mit Deuteriumoxid enthaltendem Puffer behandelt, werden alle aciden Protonen durch Deuterium ausgetauscht. Die Photoreduktion der Radikalform der DNA-Photolyase in D<sub>2</sub>O-Puffer ist in Spektrum 5 dargestellt, welches wiederum qualitativ dem Spektrum 1 entspricht. Die negative Bande bei  $1532\text{ cm}^{-1}$  ist aber nach  $1530\text{ cm}^{-1}$  verschoben und die Bande bei  $1396\text{ cm}^{-1}$  hat deutlich an Intensität verloren und eine weitere Bande bei

1420  $\text{cm}^{-1}$  entsteht. Dass die Bande bei 1396  $\text{cm}^{-1}$  nicht vollständig ausgelöscht wird, deutet darauf hin, dass der Deuterium-Austausch nicht vollständig verlaufen ist. Das Doppeldifferenzspektrum 10 zeigt die Differenz zwischen der Photoreduktion Deuterium ausgetauschter DNA-Photolyase und DNA-Photolyase in wässrigem Puffer. Ähnlich dem Doppeldifferenzspektrum bei  $^{15}\text{N}$ -Markierung zeigt das Spektrum 10 eine deutliche Verschiebung zahlreicher Banden, besonders im Bereich zwischen 1500 to 1700  $\text{cm}^{-1}$ . Es ergeben sich einige Unterschiede gegenüber der  $^{15}\text{N}$ -Markierung der DNA-Photolyase: Die starke negative Bande bei 1532  $\text{cm}^{-1}$  zeigt in Spektrum 10 keine Doppeldifferenzbande, auch das neu entstandene Bandenmuster bei 1396  $\text{cm}^{-1}$  zeigt kein Doppeldifferenzmuster. Stark ausgeprägte Doppeldifferenzmuster sind besonders im Amid-Bereich (1600-1650  $\text{cm}^{-1}$ ) zu erkennen.

### 3.3.1.3. Messungen der Photoreparatur und der Photoschädigung von DNA

Die Photoschädigung von einzelsträngiger 18T-DNA wurde in der IR-Küvette mittels eines Excimer-Lasers (308 nm) durchgeführt. Infrarot-Spektren wurden vor und nach UV-Bestrahlung aufgenommen und subtrahiert, wobei keinerlei Veränderungen an der Küvette vorgenommen wurden. Das IR-Differenzspektrum (Abb. 3.21. Spektrum 1) zeigt deutliche Differenzbanden. Positive Differenzbanden sind bei 1464, 1396 und 1302  $\text{cm}^{-1}$ , negative Differenzbanden bei 1483 and 1289  $\text{cm}^{-1}$  zu beobachten. Der Spektralbereich zwischen 1670 und 1570  $\text{cm}^{-1}$  zeigt starke, nicht reproduzierbare Banden, welche im Bereich von Wasser-Absorptionsbanden sind. Diese entstehen durch Temperaturänderungen in der Küvette während der Bestrahlung. Dadurch ändern sich die Absorptionsfrequenzen von Wasser und bei Bildung der Differenzspektren löschen sich diese Wasserbanden nicht aus. Deshalb wurde dieser Spektralbereich nicht berücksichtigt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass hoch charakteristische und reproduzierbare Veränderungen im Vibrationsspektrum der DNA bei Bestrahlung festzustellen sind.

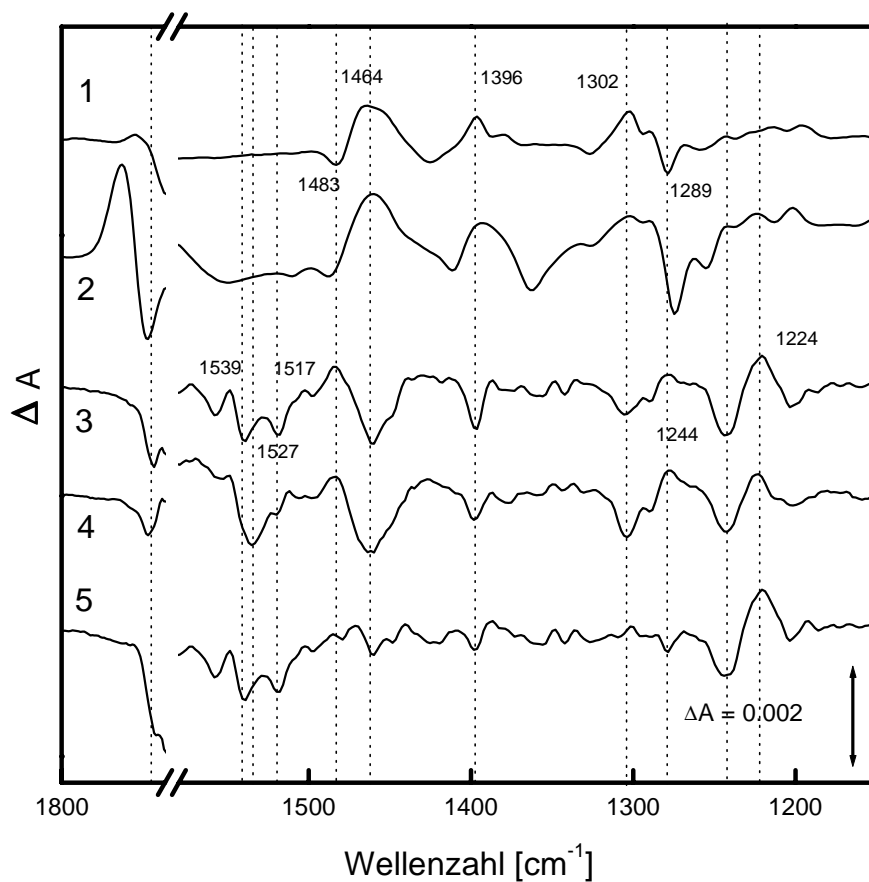


Abb. 3.21.: Photobestrahlung von DNA und Photoreparatur von DNA mit DNA-Photolyase  
 Spektrum 1: Photobestrahlung von einzelsträngiger 18T-DNA  
 Spektrum 2: Photobestrahlung von einzelsträngiger 18FU-DNA  
 Spektrum 3: Photoreparatur von DNA mit DNA-Photolyase in der radikalischen Form;  
 Spektrum 4: Photoreparatur von DNA mit DNA-Photolyase in der reduzierten Form;  
 Spektrum 5: Addition der Spektren 1 und 2.  
 Die Wellenzahlen der zusätzlichen Linien sind dem Spektrum zugefügt.

Um erste Bandenzuordnungen vornehmen zu können, wurde dasselbe Experiment mit einzelsträngiger 18FU-DNA wiederholt. Durch den Austausch der Methyl-Gruppe an der 5'-Position durch Fluor sollten einige Schwingungen charakteristische Änderungen erfahren. In Abb. 3.21 Spektrum 2 ist das Differenzspektrum der Bestrahlung nach 1000 Excimer-Laserpulsen gezeigt. Auch hier entstehen charakteristische Differenzbanden. Das Spektrum zeigt qualitative Ähnlichkeiten mit dem Spektrum 1 (Banden bei 1464, 1396 und dem Bandenmuster bei ca. 1290  $\text{cm}^{-1}$ ). Auf der anderen Seite treten zwei neue Banden auf: Eine starke Differenzbande bei 1742/1720  $\text{cm}^{-1}$  und eine negative Bande bei 1361  $\text{cm}^{-1}$ . Durch den

Massenunterschied durch den Seitengruppen-Austausch (15 Da der Methylgruppe gegenüber 19 Da von Fluor) sollten sich alle Schwingungen der Atome, die eine Fluor gekoppelte Schwingungsmode haben, in Richtung höherer Wellenzahl hin verschieben.

Als weitere Experimente wurden Photoreparaturen von vorher UV-bestrahlter einzelsträngiger 18T-DNA mit DNA-Photolyase durchgeführt. Titration der geschädigten DNA mit Kaliumpermanganat ergab einen Dimerisierungsgrad von etwa 50 %. Als Proben wurden eine Mischung von Photolyase in der blauen Radikal-Form und UV-bestrahlter DNA im molaren Verhältnis von 1:4 verwendet.

Als Bestrahlungsprotokoll wurden zwei Varianten verwendet: Als erste Variante wurde ein Zwei-Stufen Protokoll verwendet, bei dem zuerst mittels eines 530 nm Kantenfilters (Rotlicht) die DNA-Photolyase photoreduziert wurde (vgl. Abb. 3.20.). In einem zweiten Schritt wurde dann die Photoreparatur mittels Bestrahlung mit weißem Licht durchgeführt. Dieses Vorgehen ist möglich, da DNA-Photolyase in der vollreduzierten Form keinerlei Absorption über 500 nm besitzt (vgl. Abb. 3.9.). Dieses Differenzspektrum ist in Abb. 3.21. Spektrum 3 gezeigt. Es ist erstaunlich ähnlich dem Spektrum der DNA Schädigung, die Banden zeigen aber in die entgegengesetzte Richtung.

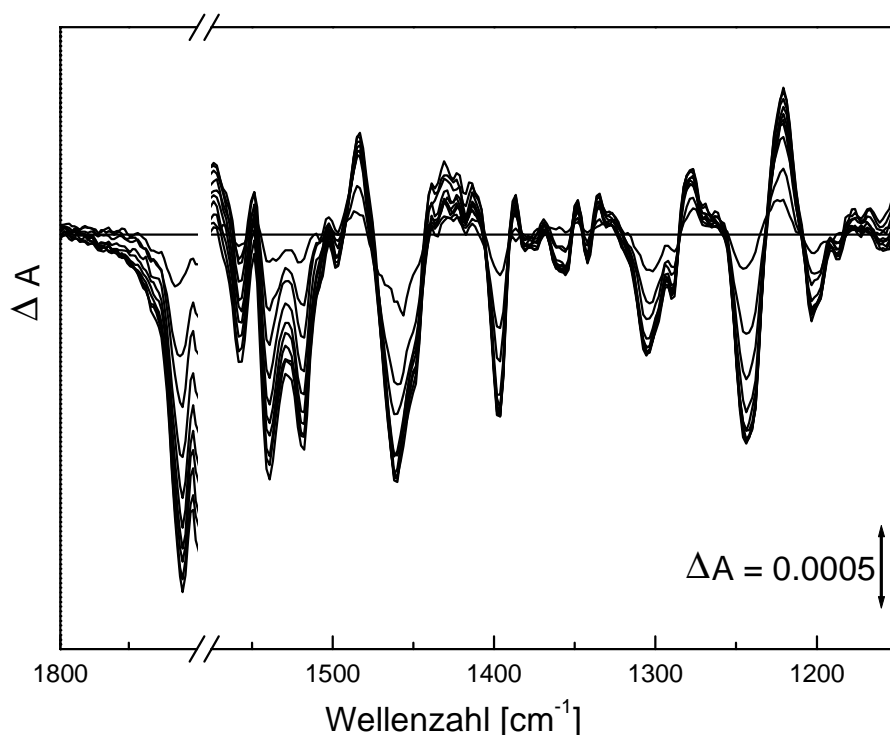


Abb. 3.22.: Photoreparatur von DNA mit DNA-Photolyase: Alle zwei Minuten wurde ein Spektrum aufgenommen. Bestrahlungsprotokoll: Es wurde zuerst Photolyase reduziert und dann die Reparatur gestartet.

Abb. 3.22. zeigt eine zeitaufgelöste Darstellung der Photoreparatur. Jeweils nach 2 Minuten ist ein Differenzspektrum gezeigt. Da im Moment noch keine Bandenzuordnung gemacht werden kann, ist eine kinetische Auswertung zu diesem Zeitpunkt der Messungen nicht sinnvoll.

Als zweites Protokoll wurden radikalische Photolyase und geschädigte DNA mit Weißlicht bestrahlt (Abb. 3.21 Spektrum 4) und die Reparatur gemessen. Spektrum 3 und 4 in Abb. 3.21 ähneln sich sehr. Einzig die negative Bande bei  $1532\text{ cm}^{-1}$  ist offensichtlich zu den in Spektrum 3 schon gemessenen Banden dazugekommen. Dies ist dadurch zu erklären, dass Spektrum 4 aus den beiden Spektren 3 in Abb. 3.21 und 3 in Abb. 3.20 zusammengesetzt ist, da ja Photoreduktion und Photoreparatur in einem Versuch gemessen wurden.

Um die Banden besser zuordnen zu können, wurde Spektrum 3 und 1 addiert (nicht subtrahiert) (Spektrum 5). Hier ist folgendes zu erkennen: Die Banden, die in Spektrum 1 für die Schädigung der Thymidine verantwortlich sind, heben sich in dem Additionsspektrum mit den Banden der Reparatur der Thymidine auf (Differenzbanden bei  $1464$ ,  $1483$ ,  $1396$ ,  $1302\text{ cm}^{-1}$ , und  $1289\text{ cm}^{-1}$ ). Weiterhin gibt es Banden, die sich nicht aufheben, da sie ausschließlich bei der Reparatur auftreten. Es sind die Banden bei  $1539$ ,  $1527$  und  $1517\text{ cm}^{-1}$  und die intensive Differenzbande bei  $1244\text{ cm}^{-1} / 1224\text{ cm}^{-1}$ .

Nachdem diese Banden erstmals bei der Reparatur auftauchen und weder dem Enzym noch der DNA zuzuordnen sind, wurden weitere Versuche unternommen, um die Herkunft dieser Banden zu ergründen.

Die Photoreparaturen wurden wiederholt, wobei die relativen Konzentrationen von Enzym und DNA zueinander variiert wurden. Vier verschiedene molare Verhältnisse zwischen DNA-Photolyase und 18T-DNA wurden vermessen (Tabelle 3.1.).

Enzym/Substrat Verhältnis	Integral zwischen $1267$ und $1230\text{ cm}^{-1}$
0,0625	0,00565
0,1250	0,00913
0,1250	0,01072
0,2500	0,01916
0,5000	0,03266
0,5000	0,03133

Tab. 3.1.: Verhältnis zwischen dem Integral zwischen  $1267$  and  $1230\text{ cm}^{-1}$  und dem molaren Verhältnis von eingesetztem Enzym und Substrat.

Alle Experimente wurden auf die Photoreparaturbande bei  $1302\text{ cm}^{-1}$  graphisch normiert (eine Differenzbande der Photoreparatur) und das Integral zwischen  $1267$  and  $1230\text{ cm}^{-1}$  berechnet. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.23. dargestellt.

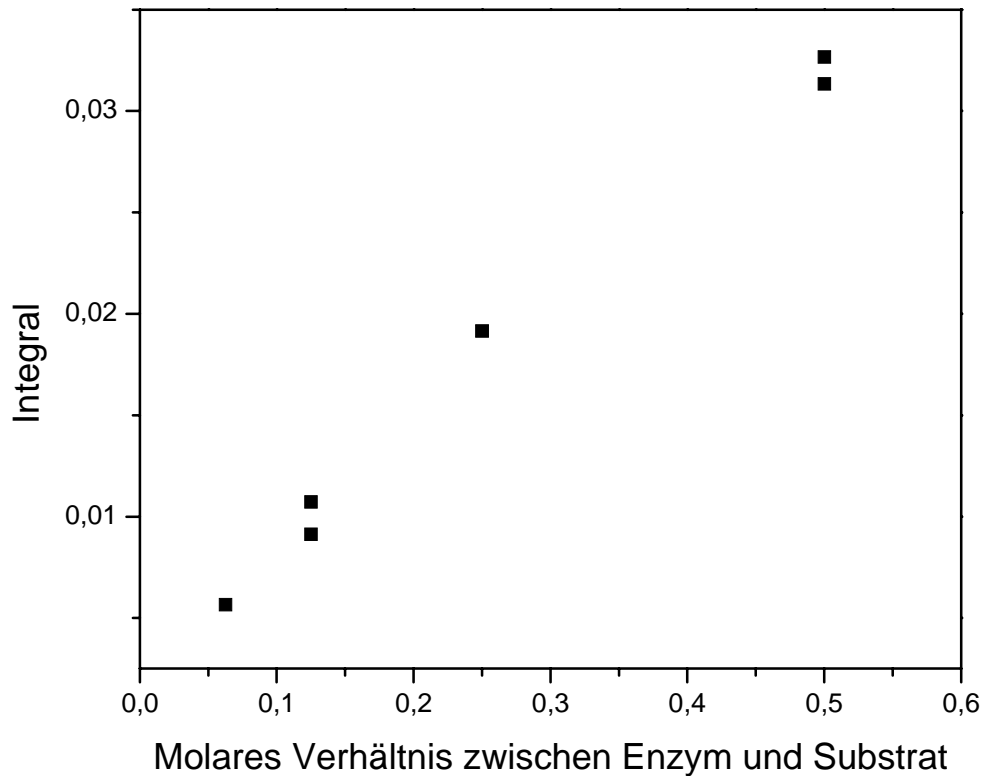


Abb. 3.23.: Verhältnis zwischen dem Integral der Bande zwischen  $1267$  and  $1230\text{ cm}^{-1}$  und dem molaren Verhältnis von eingesetztem Enzym und Substrat.

Der Graph zeigt einen linearen Anstieg des Integrals mit der Photolyase-Konzentration. Daraus lässt sich schließen, dass die Differenzbande bei  $1244\text{ cm}^{-1}$  /  $1224\text{ cm}^{-1}$  dem Enzym zugeordnet werden kann. Nachdem diese Bande aber bei den Photoreduktionen (Abb.3.20.) nicht auftaucht, muss sie bei der Photoreparatur zwischen Enzym und der DNA entstehen. Der gleiche Effekt tritt bei der Bande um  $1224\text{ cm}^{-1}$  auf.

In Tabelle 3.2. sind alle Differenzbanden zusammengefasst.



Photoreduktion (Abb. 3.20.) [cm <sup>-1</sup> ]	Photoreparatur (Abb. 3.21 Spektren/3,4) [cm <sup>-1</sup> ]	DNA Schädigung Thymin (Abb. 3.21 Spektren/1) [cm <sup>-1</sup> ]	DNA Schädigung Fluoruracil (Abb. 3.21 Spektren/2) [cm <sup>-1</sup> ]
1691 (min)	1730 (min)	1730 (max)	1742 (max)
1675 (max)	1716 (min)	1483 (max)	1714 (min)
1660 (min)	1558 (min)	1464 (min)	1481 (min)
1644 (max)	1549 (max)	1427 (max)	1464 (max)
1635 (min)	1539 (min)	1396 (min)	1410 (min)
1627 (max)	1527 (max)	1389 (max)	1391 (max)
1618 (max)	1517 (min)	1378 (min)	1325 (min)
1592 (max)	1483 (min)	1326 (max)	1302 (max)
1575 (min)	1464 (max)	1302 (min)	1275 (min)
1565 (max)	1427 (min)	1294 (max)	1254 (min)
1548 (min)	1396 (max)	1289 (min)	1225 (max)
1532 (min)	1389 (min)	1278 (max)	1202 (max)
1514 (max)	1378 (max)		
1505 (min)	1326 (min)		
1396 (max)	1302 (max)		
	1294 (min)		
	1289 (max)		
	1278 (min)		
	1244 (min)		
	1224 (max)		

Tab. 3.2.: Zusammenfassung aller auftretenden Differenzbanden.

### 3.3.1.4. Messung des gesamten Schädigungs/Reparatur-Zyklus

Um die Brauchbarkeit unserer Messdaten zu überprüfen, wurde ein kompletter Zyklus der DNA vermessen (vgl. Abb. 3.19., Reaktion A<sub>2</sub> und Reaktion C). Einzelsträngige 18T-DNA und Photolyase in der Radikal-Form wurden mittels 1000 Laser-Pulsen und anschließend 20 Minuten mit Weißlicht bestrahlt. Folgende Reaktionen sollten stattfinden: Erstens eine Photoschädigung der DNA aufgrund der Bestrahlung mit UV-Licht, gleichzeitig sollte es zu einer Photoreduktion des Enzyms kommen, da Photolyase auch bei 308 nm absorbiert. Zweitens sollte es bei Bestrahlung mit Weißlicht zu einer Photoreparatur der vorher geschädigten DNA kommen. Durch die lange Reaktionszeit und die dementsprechenden Temperaturänderungen in der IR-Küvette sind Teile des IR-Spektrums stark verrauscht und nur in Teilen auswertbar. In Abb. 3.24. sind zwei Differenzspektren gezeigt: Spektrum 1' zeigt die IR-Differenzen nach 100 UV-Pulsen, Spektrum 2' nach 20 Minuten Bestrahlung mit

Weißlicht. Spektrum 1 entspricht Spektrum 3 in Abb. 3.20 und zeigt die Photoreduktion der Photolyase in Gegenwart von Substrat. Spektrum 2 zeigt die Photoreparatur nach 15 Minuten Bestrahlung mit Weißlicht und ist identisch mit Spektrum 3 in Abb. 3.21.

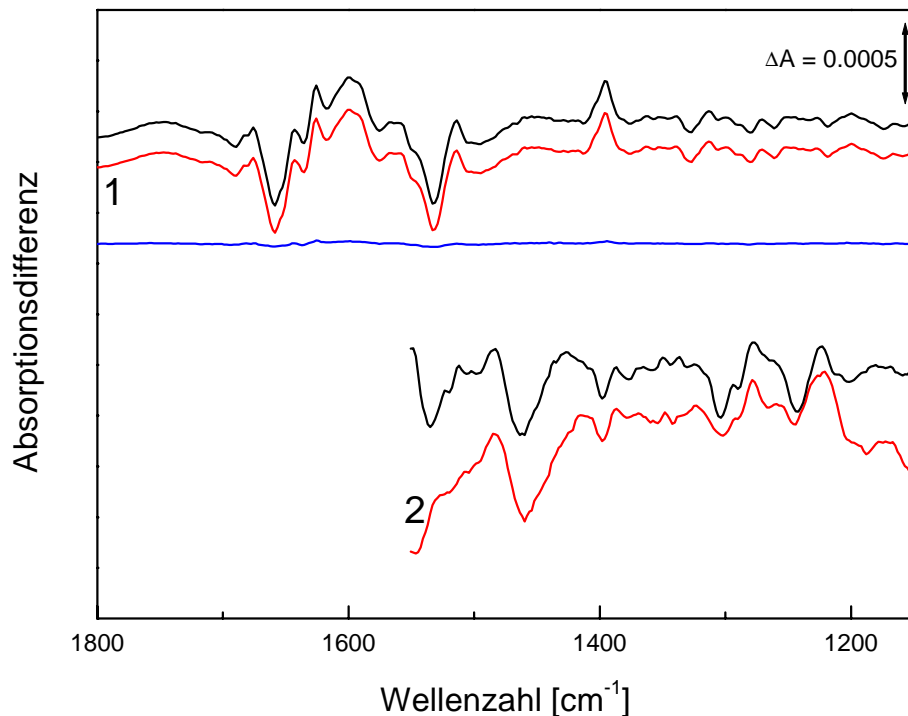


Abb. 3.24.: Photobestrahlung von DNA/DNA-Photolyase und Photoreparatur von DNA mit DNA-Photolyase

Spektrum 1 (schwarz): Photoreduktion von DNA-Photolyase in Anwesenheit von einzelsträngiger 18T-DNA (Abb. 3.20., Spektrum 3)

Spektrum 1 (rot): Photobestrahlung von einzelsträngiger 18T-DNA in Anwesenheit von DNA-Photolyase

Blaues Spektrum: Differenz des schwarzen und roten Spektrums

Spektrum 2 (schwarz): Photoreparatur von DNA mit DNA-Photolyase in der reduzierten Form (Abb. 3.21. Spektrum 3);

Spektrum 2 (rot): Photoreparatur von DNA mit DNA-Photolyase in der reduzierten Form direkt nach Bestrahlung

Das schwarze und das rote Spektrum 1 zeigen qualitativ sehr große Übereinstimmungen. Sowohl die negative Bande bei  $1532\text{ cm}^{-1}$  als auch die positive Bande bei  $1306\text{ cm}^{-1}$  sind sich sowohl in Form als auch in Intensität ähnlich. Auch die kleinen Differenzbanden im Bereich zwischen  $1350\text{ cm}^{-1}$  und  $1200\text{ cm}^{-1}$  sind identisch. Um dies zu verdeutlichen, wurde die Differenz aus beiden Spektren berechnet (blaues Spektrum 1). Alle Differenzbanden löschen

sich aus, eine gerade Linie entsteht. Auch das schwarze und rote Spektrum 2 zeigen qualitativ dasselbe Spektrum, hier ist die Bildung einer doppelten Differenz aufgrund des starken Basisliniendriffs nicht sinnvoll. Trotzdem ist gut zu erkennen, dass die Reparaturbanden z.B. bei 1464, 1396, 1303 und auch bei  $1244\text{ cm}^{-1} / 1224\text{ cm}^{-1}$  in dem roten Spektrum 2 vorhanden sind. Daraus lässt sich folgern, dass die Reaktion wie vermutet stattgefunden hat.

### 3.3.2. Elektronenspinresonanz Messungen an rekombinanter DNA-Photolyase aus *E. coli*

#### 3.3.2.1. Theoretische Grundlagen der Elektronenspinresonanz Spektroskopie

Die Elektronenspinresonanz (EPR: Paramagnetische Elektron Resonanz) ist eine Hochfrequenzspektroskopiemethode, die Einblicke in die Struktur und die Dynamik paramagnetischer Moleküle bietet (Übersicht bei Carrington und McLachlan 1969, Holtzhauer 1996 und Atherton 1993).

In biologischen Systemen treten paramagnetische Moleküle in verschiedenen Formen auf, z. B. als Übergangs-metallkomplexe, als Radikale, die infolge von Elektronentransferprozessen entstehen oder als Moleküle im Triplettzustand.

Wird ein ungepaartes Elektron in ein äußeres Magnetfeld mit der Flussdichte  $B_0$  gebracht, wird die ursprüngliche isotrope Verteilung der Elektronenspins aufgehoben. Die magnetischen Momente der Elektronen wechselwirken mit  $B_0$ . Dadurch wird die Entartung der beiden Spinzustände des Elektrons aufgehoben (Zeemann-Effekt). Übergänge zwischen den beiden Zeemann Energieniveaus werden durch elektromagnetische Strahlung mit der Resonanzfrequenz  $\nu$  angeregt.

Zur Aufnahme eines EPR Spektrums wird die Probe in ein homogenes Magnetfeld eingebracht und mit Mikrowellen konstanter Feldstärke bestrahlt. Durch zeitliche Variation der Feldstärke wird der Übergang der Elektronenniveaus induziert. Im Spektrum wird das erste Ableitungssignal der Absorption von der Feldstärke gegen die Feldstärke aufgetragen.

EPR-Spektroskopie liefert eine Reihe von interpretierbaren Parametern: Der g-Faktor charakterisiert die Position der Mitte einer EPR-Linie im Magnetfeldmaßstab. Er ist ein indirekter Faktor und beträgt für ein freies Elektron 2,00232. Die Hyperfeinstruktur (HFS)

bewirkt die Aufspaltung einer EPR-Linie in mehrere Linien (EPR-Spektrum) und setzt sich aus der Wechselwirkung zwischen Elektronenspin und Kernspin zusammen. Die Wechselwirkung lässt sich in eine isotrope und eine anisotrope Komponente zerlegen. Der anisotrope Anteil ergibt sich aus der klassischen Dipol-Dipol-Wechselwirkung zwischen Elektronenspin und Kernspin und ist damit von der relativen Lage der magnetischen Momente des ungepaarten Elektrons und des Kerns abhängig. Der isotrope Anteil ist auf die Fermi-Kontakt-Wechselwirkung zurückzuführen und ergibt sich aus einer relativistischen Behandlung des Problems. Aus der isotropen HFS-Konstante lassen sich somit Informationen über die Elektronendichte am Kernort gewinnen, aus der anisotropen HFS-Konstante Informationen über die Geometrie des Moleküls. Der g-Faktor wie auch die Hyperfeinkopplungskonstante hängen von der Orientierung des Radikals zum äußeren  $B_0$ -Feld ab, was als spektrale Anisotropie bezeichnet wird. Diese kann durch Tensoren beschrieben werden. Durch Einführung der drei Achsen x y und z im Molekülachsensystem reduziert sich der Tensor auf seine Diagonalelemente. Die Anisotropie des g-Wertes ist dann durch seine Hauptwerte  $g_{xx}$ ,  $g_{yy}$  und  $g_{zz}$  gegeben. Im Fall axialsymmetrischer molekularer Systeme (dies gilt für die meisten aromatischen Systeme) ist  $g_{xx} = g_{yy} \neq g_{zz}$  und damit reichen zwei g-Komponenten aus, um das EPR-Spektrum zu charakterisieren. Konventionsgemäß ist  $g_{zz} = g_{||}$  bei aromatischen Systemen senkrecht zur Molekülebene,  $g_{\perp}$  innerhalb der Molekülebene orientiert.

Als weitere charakteristische Größen dienen die Intensität einer EPR-Linie, die im linearen Bereich proportional zur Konzentration der paramagnetischen Zentren in der Probe ist und die Linienbreite einer EPR-Linie.

Bei der Beteiligung vieler magnetisch nicht-äquivalenter Kerne steigt die Zahl der EPR-Linien multiplikativ mit der Anzahl der Kerne an. Daraus resultiert ein inhomogen verbreitertes, nicht aufgelöstes Spektrum. Eine Methode zur Auflösung vieler HFS-Kopplungen bietet dann eine Doppelresonanz-Technik (ENDOR-Spektroskopie), bei der zusätzlich eine Radiofrequenz eingestrahlt wird (kombiniertes EPR/NMR-Experiment). Bei ENDOR steigt die Zahl der EPR-Linien additiv mit der Anzahl der magnetisch nicht-äquivalenten Kernen an.

### 3.3.2.2. EPR Messungen an rekombinanter DNA-Photolyase in der Radikal-Form

Die X-Band und W-Band EPR-Spektren von radikalischer DNA-Photolyase in gefrorener Lösung sind in Abb. 3.25. gezeigt.

Der Flavin-Cofaktor der DNA-Photolyase zeigt ein stabiles EPR-Signal, dessen Mitte bei  $g = 2,0034 \pm 0,0002$  liegt. Die Breite des EPR-Signals beträgt 1,87 mT, was gut mit dem schon gemessenen Literaturwert übereinstimmt (Gindt et al. 1999). Allgemein entsteht die Linienbreite eines Flavin-Radikals hauptsächlich durch unaufgelöste HFS-Konstanten der  $^{14}\text{N}$  und  $^1\text{H}$ -Kerne im Isoalloxazinring. Durch Verwendung von deuteriertem Puffer und dem damit verbundenen Austausch aller aciden Protonen des Enzyms und des Cofaktors kann die Linienbreite auf 1,30 mT verschmälert werden. Grund dafür ist das kleinere Kernmoment eines Deuterons im Gegensatz zum Proton ( $\gamma_{\text{H}}/\gamma_{\text{D}} = 6,51$ ).

Dies ist ein klares Indiz dafür, dass das Flavin-Radikal in seiner neutralen, nicht in der anionischen Form vorliegt. Deuterierung der anionischen Form würde zu keiner nennenswerten Verschmälerung des Signals führen, da an der N5-Position kein austauschbares Proton vorliegen würde (Çinkaya et al. 1997). Weiterhin wurden von Çinkaya und Mitarbeitern (Çinkaya et al. 1997) für neutrale Flavinradikale eine peak-to-peak Linienbreite von 2,0 mT ermittelt, während sich für Flavinanion-Radikale eine peak-to-peak Linienbreite von etwa 1,5 mT ergaben. Der gemessene Wert von 1.87 mT liegt deutlich in der Nähe des Literaturwertes für neutrale Flavin-Radikale.

Das protonierte Spektrum zeigt weiterhin einige schwach aufgelöste Hyperfeinaufspaltungen mit einem Linienabstand von  $\approx 0,85$  mT. Diese Struktur kann dem isotropen HFS eines stark gebundenen Protons an der N5-Position des Flavins (Abb. 3.26.) zugeordnet werden (siehe Abb. 3.25.).

Das W-Band Spektrum zeigt ein asymmetrisches Spektrum, das charakteristisch für ein statistisch ungeordnetes Radikal ist. Auch die zu höherem Magnetfeld verschobene, schwach aufgelöste Hyperfein Kopplung des N5-Protons ist zu erkennen.

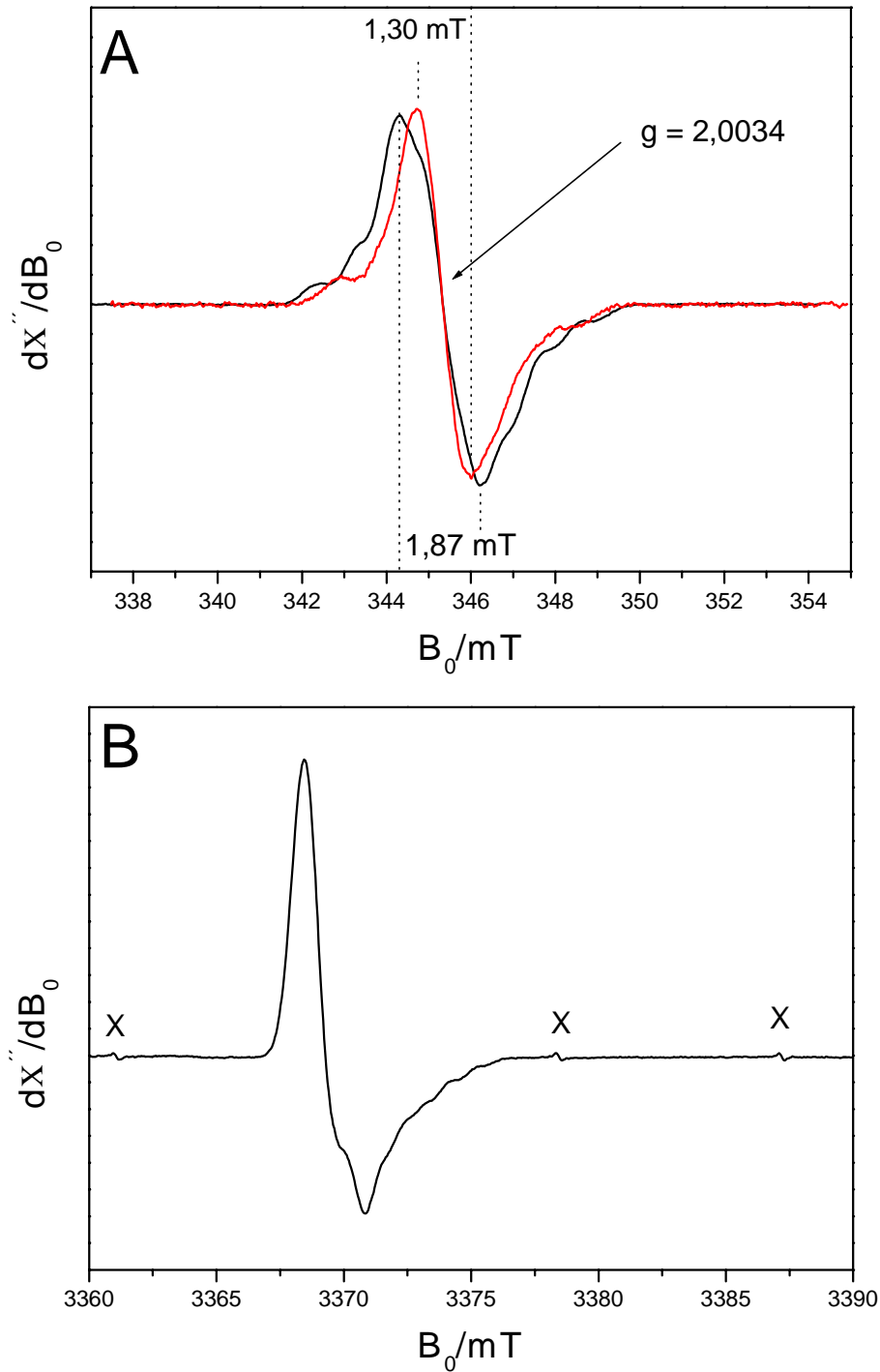


Abb. 3.25.: EPR X-Band (A) und W-Band (B) Spektren von DNA-Photolyase.

Schwarzes Spektrum: DNA-Photolyase in protoniertem Puffer, Rotes Spektrum: DNA-Photolyase in deuteriertem Puffer. Beide Spektren wurden bei  $-73\text{ }^\circ\text{C}$  mit einer Mikrowellenleistung von  $6,1\text{ }\mu\text{W}$ , einer Mikrowellenfrequenz von  $9,6832\text{ GHz}$  und einer Modulationshöhe von  $0,1\text{ mT}$  gemessen.

Spektrum B wurde bei  $-138\text{ }^\circ\text{C}$  mit einer Mikrowellenleistung von  $50\text{ }\mu\text{W}$ , einer Mikrowellenfrequenz von  $94,50\text{ GHz}$  und einer Modulationsamplitude von  $0,1\text{ mT}$  gemessen. Die mit X gekennzeichneten EPR-Linien resultieren vom Mn(II)/MgO-Standard.

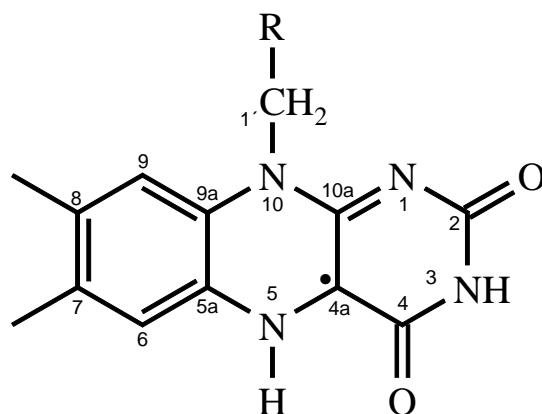


Abb. 3.26.: Schematische Darstellung und IUPAC-Nomenklatur eines neutralen Flavin-Radikals.

Zur Bestimmung des  $g$ -Tensors wurde das EPR-Signal des Flavin-Cofaktors der DNA-Photolyase zwischenzeitlich auch bei einer Mikrowellenfrequenz von 360 GHz aufgenommen (Spektrum nicht gezeigt). Dabei wurden folgende Hauptwerte des  $g$ -Tensors bestimmt:  $g_{xx} = 2,00432$ ,  $g_{yy} = 2,00360$  und  $g_{zz} = 2,00218$ . Somit ergibt sich ein isotroper  $g$ -Faktor von 2,00337.

Wird zur DNA-Photolyase photogeschädigtes 18T DNA Oligonukleotid zugegeben und ein X-Band EPR gemessen, ergibt sich wieder das schwarze Spektrum in Abb. 3.25. Somit ist sowohl qualitativ als auch quantitativ kein Unterschied zum Spektrum ohne Substrat zu erkennen. Auch durch Zugabe eines doppelsträngigen DNA Oligonukleotids mit einem CPD in der Mitte sind keinerlei Änderungen messbar.

### 3.3.2.2. ENDOR Messungen an rekombinanter DNA-Photolyase in der Radikal-Form

Aus ENDOR-Spektren sind vor allem die kleineren HFS-Konstanten ablesbar. Es zeigt die Hyperfeinwechselwirkung der Protonen des Isoalloxazinringes und der Umgebung. Das Spektrum von gefrorener DNA-Photolyase in der Radikal-Form ist in Abb. 3.27 gezeigt. Hier fallen besonders zwei Merkmale auf: Zum einen ein großes Signal in der Nähe der freien Protonenlarmorfrequenz  $\nu_H$ , und zum anderen die symmetrische Anordnung der relativ breiten Banden um diese Frequenz. Damit hat das gemessene Spektrum große Ähnlichkeiten mit einem Pulverspektrum.

Typischerweise zeigen ENDOR-Spektren von neutralen Flavin-Radikalen folgende Resonanzen: Zum einen die frei rotierenden Methylprotonen am C8 $\alpha$ , die ein axial-symmetrisches tensorielles Bandenmuster erzeugen und das Proton am C6, das ein rhombisches tensorielles Bandenmuster erzeugt, von dem typischerweise nur einzelne Komponenten im Spektrum sichtbar sind (Kurreck et al. 1984, Medina et al. 1994, Çinkaya et al. 1997).

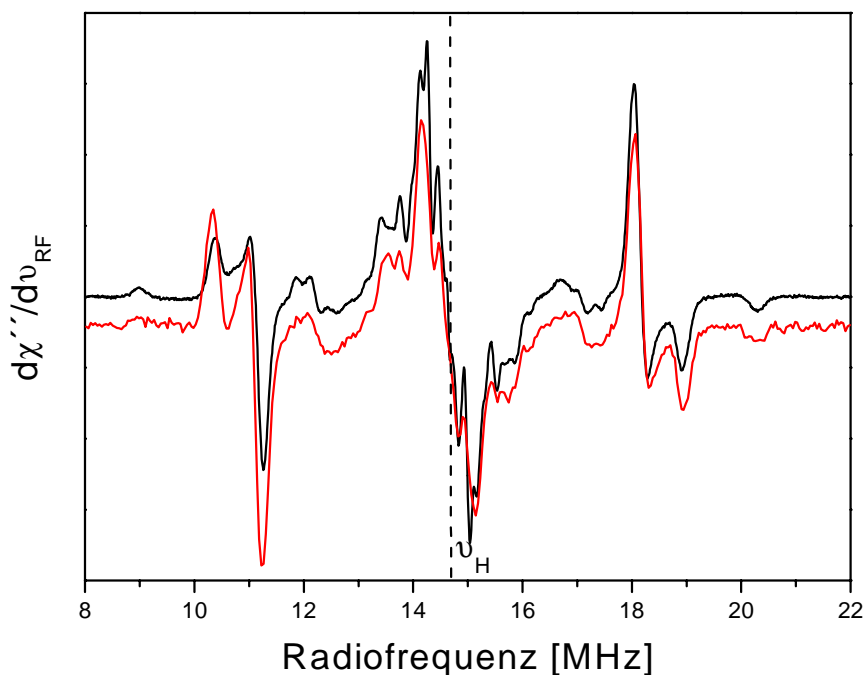


Abb. 3.27.: ENDOR-Spektroskopie an DNA-Photolyase in der Radikal-Form.  
 schwarzes Spektrum: DNA-Photolyase in protoniertem Puffer  
 rotes Spektrum: DNA-Photolyase in deuteriertem Puffer

Die nachfolgende Auswertung der gemessenen ENDOR-Spektren liegt der Bandenzuordnung von Kay und Mitarbeitern (Kay et al. 1999) zugrunde. Das schwarze Spektrum zeigt ein deutliches Bandenmuster im Bereich zwischen 10,0 und 11,6 MHz bzw. zwischen 17,6 und 19,2 MHz. Aus diesem Bandenmuster, das der frei rotierenden Methylgruppe am C8 $\alpha$  zugeordnet werden kann, können die Hyperfeinkopplungen direkt aus dem Linienabstand abgelesen werden ( $A_{||} = 8,52$  MHz und  $A_{\perp} = 6,97$  MHz). Die isotrope Hyperfeinkopplungskonstante  $A_{iso}$ , die direkt mit der Spindichte an diesem Kern zusammenhängt lässt sich daraus wie folgt berechnen:  $A_{iso} = (A_{||} + 2A_{\perp})/3$ . Daraus ergab sich eine Konstante von  $A_{iso} = 7,49$  MHz.



Ein weitere Bande bei  $\nu_H = \pm 4,80$  MHz (entspricht  $A_{iso}$ ) konnte dem C6-Proton zugeordnet werden: Das Signal sollte rhombisches Aussehen besitzen und ist wegen der starken Anisotropie von relativ schwacher Intensität.

Das ENDOR-Spektrum zeigt weiterhin zwei Banden im Bereich 9 bzw. 20 MHz und 13,5 bzw. 16 MHz. Diese können den beiden aufgrund der gehinderten Rotation magnetisch inequivalenten Protonen am C1' zugeordnet werden. Dabei absorbiert das pro-S Proton bei  $\nu_H \pm 5,7$  MHz und das pro-R Proton im Bereich von  $\nu_H \pm 1,47$  MHz.

ENDOR-Signale in der Nähe der freien Protonenlarmorfrequenz werden als Matrix-Signale oder Matrix-ENDOR bezeichnet. In der Hauptsache entstehen sie aus Dipol-Dipol-Wechselwirkung des ungepaarten Elektronenspins auf dem Isoalloxazinringes mit dem Kernspin von Protonen, die bis zu 0,6 nm vom Isoalloxazinring entfernt sein können (insbesondere Wasser und Protonen der Proteinumgebung). Frühere Studien von Modellkomponenten und Molekül-Orbital-Rechnungen ergaben, dass dies besonders auf C7 $\alpha$ , C9 und N3 Protonen zutrifft. Die Hyperfeinkopplungen A betragen unter 2,5 MHz (Kay et al. 1999).

Die isotrope Hyperfeinkopplungskonstante des N5-Protons kann im „continuous-wave“ ENDOR-Spektrum wegen der großen spektralen Anisotropie (Linienbreite im Spektrum) nicht bestimmt werden. Deshalb muss trotz des relativ großen experimentellen Fehlers auf die aus der EPR zugeordneten Hyperfeinkopplungen zurückgegriffen werden.

Durch Austausch des Lösungsmittels Wasser gegen Deuteriumoxid werden Informationen über die Austauschbarkeit der im ENDOR sichtbaren Protonen (sowohl Protonen im Isoalloxazinring als auch Protonen des Apoproteins mit einem Abstand von weniger als 0,6 nm) erhalten. Es zeigt sich, dass die Intensität des Matrix-ENDOR Signals um ca. 15% verringert ist (rotes Spektrum). Dies bedeutet, dass 15 % der Protonen im Matrix-ENDOR Bereich durch Deuterium austauschbar sind, 85 % aber nicht.

Das X-Band ENDOR-Spektrum mit einzelsträngiger 18T-DNA ist in Abb. 3.28. gezeigt (Weber et al. 2001b).

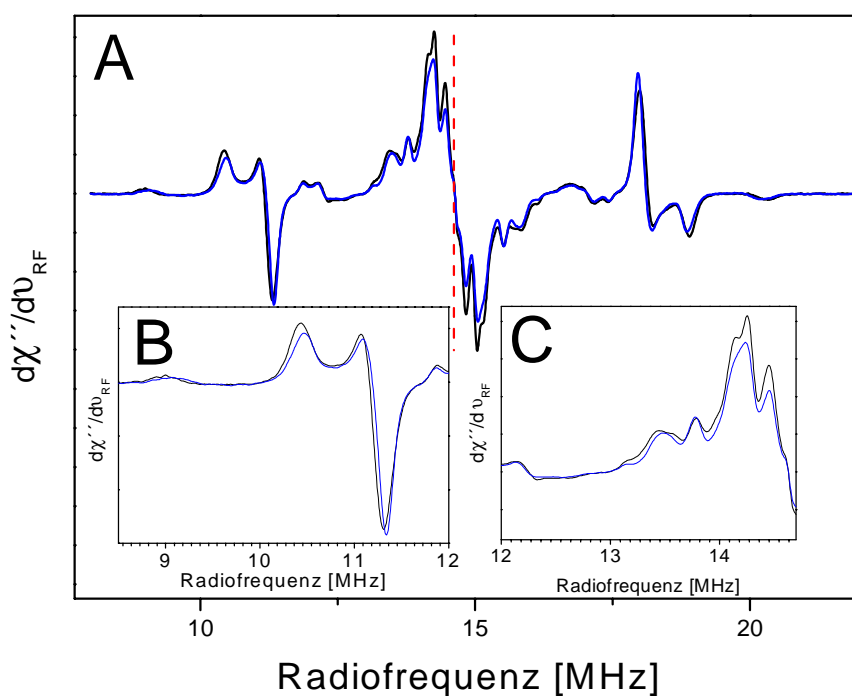


Abb. 3.28.: ENDOR-Spektroskopie an DNA-Photolyase in der Radikal-Form mit einzelsträngiger 18T-DNA.  
 schwarzes Spektrum: DNA-Photolyase mit einzelsträngiger 18T-DNA.  
 rotes Spektrum: DNA Photolyase mit einzelsträngiger, photogeschädigter 18T-DNA.  
 Spektren **B** und **C** sind Ausschnitte des Gesamtspektrums **A**.

Qualitativ unterscheiden sich das blaue und das schwarze Spektrum nicht. Es sind keinerlei neue Banden sichtbar. Bei genauerer Betrachtung der beiden Spektren ergeben sich aber kleine Unterschiede. Zum einen ist das Matrix-ENDOR Signal mit Substrat gegenüber dem ohne Substrat um  $2,4\% \pm 0,2\%$  verringert. Zum zweiten können Verschiebungen der Resonanzfrequenzen bei den Protonen C8 $\alpha$ , C6 und C1 detektiert werden, die in Tabelle 3.3 zusammengefasst sind. Es wurden aber keine Verbreiterungen oder sonstige Veränderungen der Banden festgestellt. Besonders deutliche Verschiebungen werden bei den Protonen C8 $\alpha$  und C1' detektiert. Das Proton am C6 zeigt im Literaturvergleich (Çinkaya et al. 1997, Kurreck et al. 1984, Medina et al. 1994 und Medina et al. 1995) oft eine nur schwache Änderung der Hyperfeinwechselwirkungskonstanten bei Substratbindung und ist damit als Substratmarker ungeeignet. Auf der anderen Seite sind in diesem Literaturvergleich die Hyperfeinwechselwirkungskonstanten der Protonen am C8 $\alpha$  und C1' die geringsten jemals gemessenen.

Atom-Position	Hyperfeinkopplungs-konstanten	
	der DNA-Photolyase ohne Substrat [MHz]	der DNA-Photolyase mit Substrat [MHz]
CH <sub>3</sub> (8 $\alpha$ )	A <sub>  </sub>	8,46
	A <sub>⊥</sub>	6,00
	A <sub>iso</sub>	7,48
H(6)	A <sub>iso</sub>	-4,80
H(5)	A <sub>iso</sub>	-23
H(1') (pro-S)	A <sub>  </sub>	11,33
H(1') (pro-R)	A <sub>  </sub>	2,96
	A <sub>⊥</sub>	2,39
	A <sub>iso</sub>	2,58

Tabelle 3.3: Hyperfeinkopplungskonstanten der Flavin-Protonen. Die Zuordnung erfolgte aus den EPR bzw. ENDOR Spektren. Alle Hyperfeinkopplungskonstanten haben einen experimentellen Fehler von  $\pm 0,1$  MHz (außer H5, das einen Fehler von  $\pm 1$  MHz hat). A<sub>iso</sub> wurde über die Formel  $A_{iso} = (A_{||} + 2A_{\perp})/3$  aus den beiden aus den Spektren ablesbaren Hauptwerten berechnet.

Das X-Band ENDOR-Spektrum mit doppelsträngiger DNA mit einem CPD in der Mitte ist in Abb. 3.29. gezeigt. Qualitativ und quantitativ sind gegenüber der Abb. 3.28. (einzelsträngiger 18T-DNA) keine Unterschiede zu erkennen. Dies bedeutet, dass sich die elektronische Struktur des Isoalloxazinringes nicht ändert, wenn andere Substrate verwendet werden.

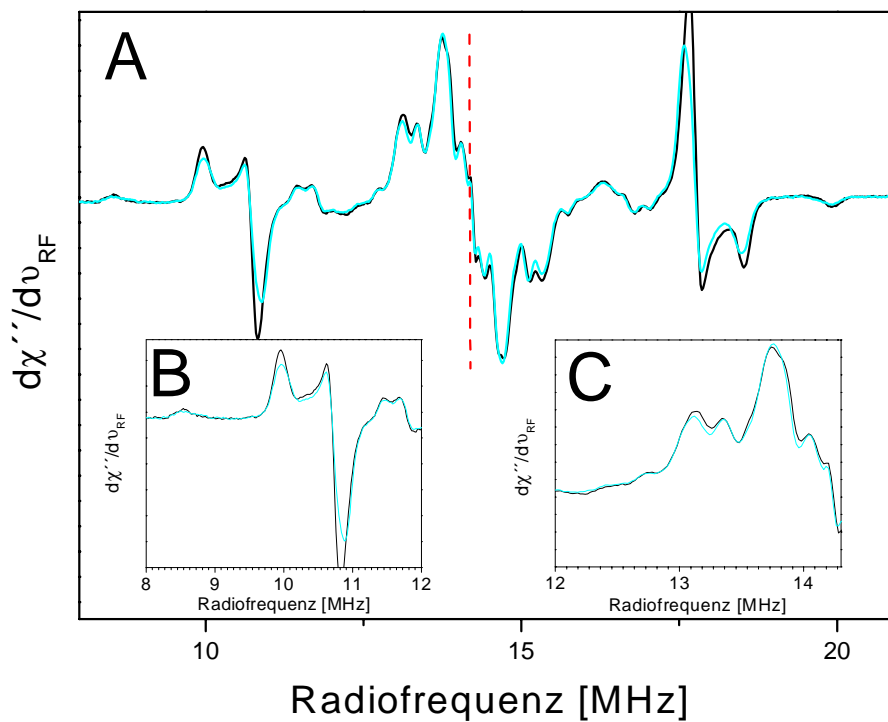


Abb. 3.29.: ENDOR-Spektroskopie an DNA-Photolyase in der Radikal-Form mit doppelsträngiger 12mer DNA.

schwarzes Spektrum: DNA-Photolyase mit doppelsträngiger 12mer DNA.

hellblaues Spektrum: DNA Photolyase mit doppelsträngiger, photogeschädigter 12mer DNA.

Spektren **B** und **C** sind Ausschnitte des Gesamtspektrums **A**.

## 4. Diskussion

### 4.1. Arbeiten mit Substrat

Für die Etablierung eines stabilen und reproduzierbaren Enzym/Substrat-Systems ist eine genaue Konzentrationsbestimmung des Substrats unerlässlich. Um bei verschiedenen Versuchen ein gutes Signal zu Rausch Verhältnis zu erhalten, wurden einzelsträngige 18T bzw. 18FU DNA Oligonukleotide verwendet. Die Oligonukleotide bieten ein Maximum an möglichen Dimeren bezogen auf die eingesetzte Stoffmenge. Der Einsatz von UV-geschädigten Thymidin Dinukleotiden ist nicht möglich, da die Bindungskonstante von DNA-Photolyase und Substrat stark mit der Substratlänge variiert. So besitzt ein T<>T Dinukleotid eine Bindungskonstante von  $1,8 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ , ein geschädigtes 18T Oligonukleotid dagegen eine Bindungskonstante von  $5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$  (Kim und Sancar 1993). Die Titration mit Kaliumpermanganat wurde entwickelt, um schnell eine Aussage über den Schädigungsgrad zu erhalten. Dieses Ziel wurde erreicht: Der Gesamtaufwand beträgt etwa 10 min pro Messreihe. Allerdings lässt sich die Genauigkeit der Meßmethode nur schwer beurteilen. Wie in Abb.3.1. dargestellt, kann man zwar die Konzentration von unbestrahlter DNA relativ genau bestimmen (die Messung mit zwei verschiedenen Methoden stimmt bei höheren Konzentrationen gut überein). Es ist aber nicht möglich, diesen Vergleich mit geschädigter DNA durchzuführen, da der Extinktionskoeffizient eines T<>T Dimers nicht bekannt ist. Er kann auch nicht bestimmt werden, da die Bestrahlung eines 18-mer Oligonukleotids immer zu einer Schädigungsverteilung führt, die chromatographisch nicht zu trennen ist. Auch eine Fehlerabschätzung der Titration mit  $\text{KMnO}_4$  ist schwer möglich, da auch die photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA bei 260 nm eine methodische Fehlerquote von etwa 10 % (Cantor et al. 1970) aufweist. Außerdem werden andere Schädigungen wie Strangbrüche oder (6-4) Dimerisierungen gar nicht berücksichtigt, obwohl sie das Ergebnis deutlich beeinflussen können. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Methode der Titration mit Kaliumpermanganat für eine qualitative und schnelle Bestimmung des Schädigungsgrads geeignet, für quantitative genaue Aussagen jedoch ungeeignet ist.

Sehr viel besser sind die Voraussetzungen für die Bestimmung der Schädigung von DNA Oligonukleotiden, die nur ein Thymidin Dimer enthalten. Durch Bestimmung der Absorption bei 260 nm ist hier der Schädigungsgrad mit Hilfe der HPLC relativ genau zu bestimmen, da

die geschädigte DNA nur ein definiertes T<>T Dimer enthält. Die DNA Schädigung konnte bis zu einem Schädigungsgrad von 75% erfolgreich durchgeführt werden.

## 4.2. Biochemisches Arbeiten mit rekombinanter DNA-Photolyase

### Rekombinante DNA-Photolyase aus *E. coli*

Es konnte ein stabiles Expressionssystem der DNA-Photolyase aus *E. coli* aufgebaut werden; Das Enzym konnte bis zur Homogenität gereinigt werden, wobei der Flavin-Cofaktor zu 100 % in der radikalischen Form vorliegt. Wichtig in diesem Zusammenhang ist auch die wegen der Instabilität des Enzyms schnelle Durchführung der Proteinreinigung. Beide Chromatographie-Schritte und die Ultrafiltration des Proteins auf die gewünschte Konzentration konnten innerhalb eines Tages durchgeführt werden. Dies führt dazu, dass die Chargenqualität der DNA-Photolyase gleichbleibend ist.

Die Ausbeuten konnten gegenüber der homologen Expression in *E. coli* (Kay et al. 1999) um den Faktor zwei gesteigert werden. Trotzdem ist das Hauptproblem des Expressionssystems noch nicht unter Kontrolle: Die Hauptmenge des exprimierten Proteins liegt als Einschlusskörper vor. Gerade bei Stabilisotopenmarkierung, wo die eingesetzten Nahrungsquellen teuer und limitiert sind, ist eine große Löslichkeitsrate des Proteins im Rohextrakt von Vorteil. Hinzu kommt, dass bei Anzuchten in Mineral-Medien die Expressionsrate gegenüber Anzuchten in Vollmedium abnimmt. Eine mögliche Lösung dieses Problems ist die Fermentation: Durch Fermentation kann eine deutlich bessere Zellausbeute pro Anzuchtvolumen erreicht werden. Es wurden mehrere Versuche mit dem Stamm BR151 [p602E109A] [pB11] unternommen. Die Zellausbeute konnte deutlich gesteigert werden; leider konnte aber in keinem Versuch eine nennenswerte Expression festgestellt werden. Der Grund dafür ist vermutlich die schlechte Wachstumsrate auf dem benötigten Mineral-Medium. In der Literatur (Coleman und Elliott 1962) wurde *B. Subtilis* nur auf Voll-Medium fermentiert, Proteine wurden in der stationären Phase exprimiert. Diese Art der Fermentation erfordert große Fermentationsvolumen (> 10 L) und ist daher nicht durchführbar.

Ein Grund für die große Menge an Einschlusskörpern kann außerdem sein, dass bei starker Expression der Wirtsstamm nicht in der Lage ist, schnell genug den Cofaktor FAD in ausreichender Menge zu synthetisieren. Somit wird viel Protein ohne Cofaktor exprimiert,

welches anfälliger für falsche Faltung und damit die Bildung von Einschlusskörpern ist. *B. Subtilis* besitzt ein aktives Riboflavin-Importersystem (Cecchini et al. 1979), somit sollte der Mangel an Cofaktor auch durch Supplementierung des Mediums mit Riboflavin ausgeglichen werden. In Versuchen mit Riboflavin (5 mg/L) im Medium konnte aber keine erhöhte Löslichkeit festgestellt werden. Eine Möglichkeit zur Lösung des Problems wäre die Coexpression von rekombinanten Proteinen der Riboflavinbiosynthese.

Durch die Einführung der E109A Mutation konnte ein rekombinantes Protein exprimiert und gereinigt werden, das keinerlei Affinität an dem zweiten Chromophor MTHF mehr besitzt. Dadurch konnte eine weitere Erhöhung der Chargenqualität erreicht werden.

Verschiedene Stabilisotopenmarkierungen konnten erfolgreich durchgeführt werden. *B. Subtilis* ist aus zwei Gründen dafür gut geeignet: Erstens verfügt *B. Subtilis* über ein effizientes Riboflavin-Importersystems, welches im Medium zugegebenes Riboflavin in die Zelle schleust. Zweitens kann die Riboflavinbiosynthese durch Zugabe von Riboflavin im Medium deutlich reduziert werden (Mironov et al. 1990).

#### Rekombinante DNA-Photolyase aus *A. nidulans*

Die heterologe Überexpression der DNA-Photolyase aus *A. nidulans* in *E. coli* hatte drei Gründe: Erstens sollte eine weitere prokariotische Photolyase kloniert werden, damit nach den Untersuchungen Vergleiche zwischen den beiden Photolyasen (*E. coli* und *A. nidulans*) gemacht werden können. Zweitens ist von der DNA-Photolyase aus *A. nidulans* eine Kristallstruktur veröffentlicht (Tamada et al. 1997). Drittens besitzt *A. nidulans* als 2.Chromophor 8-HDF; dieser kann von *E. coli* nicht synthetisiert werden. Somit liegt heterolog exprimierte DNA-Photolyase aus *A. nidulans* ohne 2.Cofaktor vor und eine gleichbleibende Chargenqualität ist garantiert.

Es konnte ein stabiles heterologes Expressionssystem der DNA-Photolyase aus *A. nidulans* aufgebaut werden; Das Enzym konnte bis zur Homogenität gereinigt werden, wobei kaum Flavin-Cofaktor im gereinigten Enzym mehr vorliegt. Ein Grund dafür könnte die im Gegensatz zur Literatur veränderten Reinigungsprotokoll liegen (Malhotra et al. 1992, Eker et al. 1990). Hier wurde als zweite Säulenchromatographie eine DNA-Agarose (Pharmacia, Freiburg) verwendet. Bei Testläufen mit diesem Säulenmaterial (Säulenvolumen 5 mL) ergaben sich folgende Probleme: Das Material besteht aus nicht kovalent gebundener DNA mit Agarose und besitzt eine extrem schlechte Druckstabilität (die maximale Flussrate für diese Säule lag bei 0,15 mL/min). Somit dauerte ein Testlauf mit < 1mg Proteinmix über 16 h bei 4 °C. Der Reinigungseffekt der Säulenchromatographie war sehr gut, aber eine neue

Bande bei ca. 39 kDa entstand (siehe Abb.4.1.). Diese ist vermutlich ein Fragment der DNA-Photolyase und entsteht durch die lange Dauer der Säulenchromatographie. Aus diesem Grund wurde auf diese Säule verzichtet.

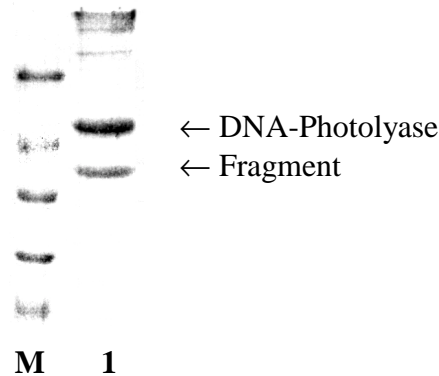


Abb. 4.1.: 12 % SDS-PAGE Gelelektrophorese nach Säulenchromatographie mit DNA-Agarose.  
 Spur M: Molekularmarker: 66 kDa, 44 kDa, 36 kDa, 28 kDa und 24 kDa  
 Spur 1: Vereinigte Fraktionen nach DNA Agarose

Ein weiterer Grund für die geringe Menge an Protein ohne FAD kann außerdem sein, dass bei starker Expression der Wirtstamm nicht in der Lage ist, schnell genug FAD in ausreichender Menge zu synthetisieren. Somit wird viel Protein schon ohne Cofaktor exprimiert. *E. coli* besitzt kein aktives Riboflavin-Importersystem, somit kann der Mangel an Cofaktor auch nicht durch Supplementierung des Mediums mit Riboflavin ausgeglichen werden. Eine Möglichkeit zur Lösung des Problems wäre die Coexpression von rekombinanten Proteinen der Riboflavinbiosynthese, um die Konzentration von Riboflavin in der Zelle zu erhöhen.

#### Rekombinante DNA-Photolyase aus *T. thermophilus*

Es konnte ein stabiles Expressionssystem der DNA-Photolyase aus *T. thermophilus* in *E. coli* aufgebaut werden; Das Enzym konnte bis zur Homogenität gereinigt werden. Die Etablierung dieses Systems hat zwei Gründe: Erstens ist hier kürzlich eine Kristallstruktur veröffentlicht worden (Komori et al. 2001) und zweitens sollte ein Enzym aus einem thermophilen Organismus deutlich stabiler gegenüber Temperatur sein. Somit könnte das Problem der Handhabung der DNA-Photolyasen in den Griff zu bekommen sein.



### 4.3. FT-IR Spektroskopie

#### Photoreduktion der DNA-Photolyase

Die ausführlichen Messungen der Photoreduktion von DNA-Photolyase haben zwei Gründe: Einerseits sollte die Photoreaktivierung des Enzyms wichtige Differenzbanden der einzelnen Oxidationsstufen des Enzyms ergeben; andererseits ist die radikalische Enzym-Form ein Zustand während der Photoreparatur der DNA-Photolyase. Somit kann die radikalische Form als Übergangszustand-Analogon gesehen werden.

Die Photoreduktion ergibt eine Reihe reproduzierbarer Differenz-Banden, von denen die negative Bande bei  $1532\text{ cm}^{-1}$  und die Banden im Amidbereich zwischen  $1600$  und  $1700\text{ cm}^{-1}$  besonders auffällig waren. Die hervorragende Reproduzierbarkeit der Messungen wurde durch die sehr geringe Differenz zweier Enzymchargen, die im Abstand von einem Jahr vermessen wurden, gezeigt (Abb. 3.20. Spektrum 6). Somit können auch kleine Differenzen verschiedener Spektren als signifikant betrachtet werden. Wird dem Enzym ungeschädigtes einzelsträngiges 18T DNA Oligonukleotid zugegeben und die Photoreduktion durchgeführt, zeigt die Differenz beider Spektren nur minimale Änderungen im Bereich der Amidbanden. Daraus lässt sich schließen, dass sich die Bindung des Produkts während der Photoreduktion nur minimal ändert. Ein weiterer Aspekt ist, dass Produkt (ungeschädigte poly-T DNA) und Enzym eine kleine Affinitätskonstante von  $10^3\text{ M}^{-1}$  hat (Sancar 1990) und deshalb nicht von einer vollständigen Absättigung ausgegangen werden muss. Wird andererseits geschädigtes einzelsträngiges 18T DNA Oligonukleotid zugegeben und die Photoreduktion durchgeführt, zeigt die Differenz beider Spektren eine deutliche negative Bande im Bereich der Amidbanden und weitere kleinere Doppeldifferenzen, die über den Spektralbereich verteilt sind. Diese Unterschiede zeigen, dass sich, im Gegensatz zu Berichten in der Literatur (Payne et al. 1990), der Enzym-Substrat-Komplex deutlich mit Änderung der Oxidationsstufe ändert. Ob sich während der Photoreduktion die Bindungstasche und damit die Bindungseigenschaften ändern, oder ob sich nur die Konformation des Enzyms ändert, lässt sich zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht genauer feststellen.

Aussagekräftig sind auch die beiden Photoreduktionen mit Stabilisotopenmarkierung: Die  $^{15}\text{N}$ -Markierung zeigt deutliche Veränderungen fast aller Differenz-Banden; bei Subtraktion der Spektren entstehen bei  $1630$ ,  $1530$  und  $1390\text{ cm}^{-1}$  deutlich sichtbare Doppeldifferenzbanden. Es ist also möglich, eine Bandenzuordnung über  $^{15}\text{N}$  Stabilisotopenmarkierung durchzuführen; die Anzahl der markierten  $^{15}\text{N}$ -Positionen müssen jedoch stark verringert werden, um eine genaue Zuordnung vornehmen zu können. Ein

ähnliches Bild zeigt sich beim Deuterium-Austausch aller aciden Protonen: Alle Banden sind aufgrund der Massenänderung verschoben. Besonders im Amidbereich ( $1700\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$ ) sind deutliche Differenzbanden zu erkennen. Im Gegensatz zur  $^{15}\text{N}$  Stabilisotopenmarkierung ergeben sich keine Doppeldifferenzbanden im Bereich von  $1500\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$ . Diese geringe Änderung lässt sich durch die minimalen Veränderungen, die der Deuterium-Austausch erzeugt ( $1532$  gegenüber  $1530\text{ cm}^{-1}$ ), erklären.

#### Vergleich FT-IR Spektroskopie mit RAMAN-Spektroskopie

Für die Zuordnung der Differenzbanden kann man die RAMAN-Spektroskopie heranziehen. Die RAMAN-Spektroskopie bietet ebenso wie IR-Spektroskopie die Möglichkeit, Informationen über die Schwingungen eines Moleküls zu erhalten. Die in den IR- und RAMAN-Spektren über die Schwingungen enthaltenen Informationen sind nicht alternativ, sondern komplementär, da IR- und RAMAN-Banden durch unterschiedliche Mechanismen mit unterschiedlichen Anregungsbedingungen entstehen. Abhängig davon, ob sich bei der Anregung einer Schwingung das Dipolmoment (IR), die Polarisierbarkeit (RAMAN) oder beide Eigenschaften (IR und RAMAN) ändern, sind die Schwingungen IR und/oder RAMAN aktiv. DNA-Photolyase (E109A-Mutante) wurde mit der Technik der Resonanz-RAMAN-Spektroskopie in der blauen Radikal-Form gemessen (Murgida et al. 2001). Bei dieser Technik wird Licht, das die Frequenz eines Absorptionsmaximums des Systems hat, eingestrahlt. Selektiv werden die Schwingungen derjenigen Atome angeregt, die an der Absorption beteiligt sind. Somit werden hochselektive Informationen über die absorbierenden Gruppen erhalten, wogegen andere Molekülteile kaum angeregt werden und damit auch nicht im Spektrum vertreten sind (Warshel 1977). Abb. 4.2. zeigt den Vergleich des FT-IR Spektrums (schwarz) mit dem Resonanz-RAMAN-Spektrum (rot) nach Photoreduktion von DNA-Photolyase.

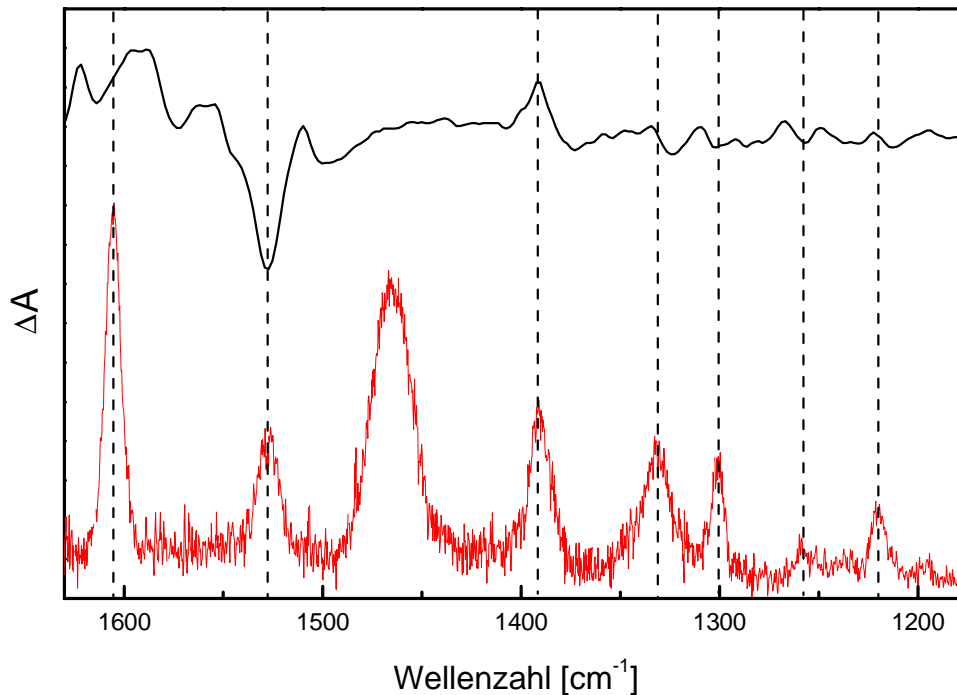


Abb. 4.2.: Photoreduktion von DNA-Photolyase in der radikalischen Form.  
 Schwarzes Spektrum: Photoreduktion von DNA-Photolyase gemessen mit FT-IR-Spektroskopie (Identisch mit Abb. 3.20. Spektrum 1)  
 Rotes Spektrum: Photoreduktion von DNA-Photolyase gemessen mit RAMAN-Spektroskopie (die intensive Bande bei  $1460\text{ cm}^{-1}$  ist eine Absorptionsbande des im Puffer enthaltenen Glycerins).

Das RAMAN Spektrum zeigt charakteristische Banden bei  $1605, 1528, 1392, 1331, 1300, 1259$  und  $1220\text{ cm}^{-1}$ , das Spektrum ist aber im Gegensatz zum FT-IR Spektrum weniger gut aufgelöst. Auffällig ist jedoch, dass einige RAMAN-Banden mit den FT-IR Banden übereinstimmen, andere jedoch nicht. Besonders die beiden Banden bei  $1532$  und  $1396\text{ cm}^{-1}$  stimmen hervorragend überein. (Die Verschiebung der beiden Spektren um ca.  $4\text{ cm}^{-1}$  zueinander resultiert vermutlich aus einer unterschiedlichen Kalibrierung des Spektralbereichs). Somit können diese beiden Banden auch über Resonanz-RAMAN-Spektroskopie zugeordnet werden. Zur weiteren Bestätigung wurden die Photoreduktionen auch mit  $^{15}\text{N}$ -markierter DNA-Photolyase und mit deuterierter Photolyase durchgeführt. Wie in dem in der Abb. 4.3. gezeigten Ausschnitt zwischen  $1500$  und  $1550\text{ cm}^{-1}$  gut zu erkennen ist, ist die Verschiebung dieser Absorptionsbande aufgrund der Isotopeneffekte in beiden Spektren gleich. Somit kann davon ausgegangen werden, dass beide Banden durch dieselbe Schwingung entstehen.

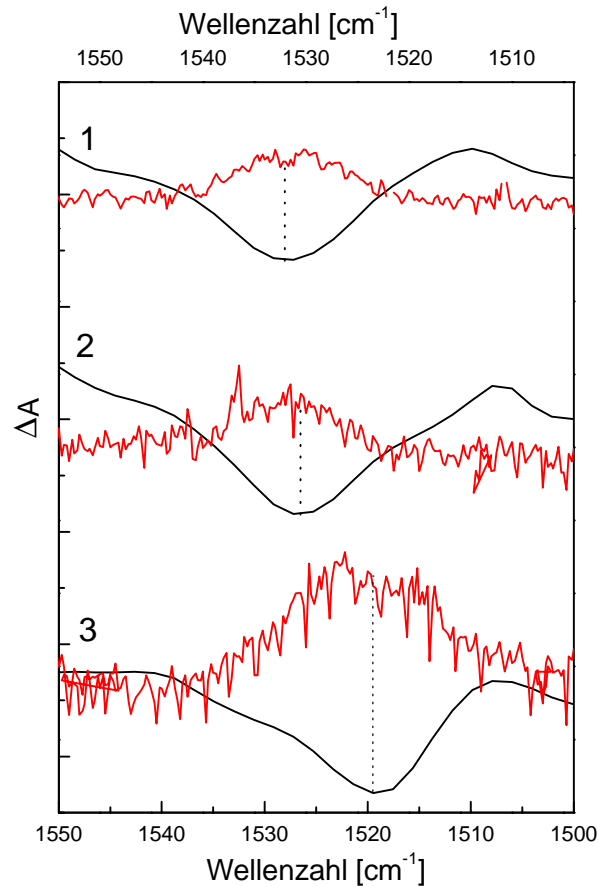


Abb. 4.3.: Vergleich der Photoreduktion von DNA-Photolyase zwischen FT-IR-Spektroskopie und RAMAN-Spektroskopie.

Rote Spektren: Mittels RAMAN gemessen

Schwarzes Spektren: Mittels FT-IR gemessen.

1: Photoreduktion von DNA-Photolyase in Wasser

2: Photoreduktion von DNA-Photolyase in deuteriertem Puffer

3: Photoreduktion von  $^{15}\text{N}$ -DNA-Photolyase in Wasser.

Eine erste Bandenzuordnung der Resonanz-RAMAN Spektren konnte aufgrund des Vergleichs mit fünf bereits gemessenen, Flavin-Radikal enthaltenden Enzyme, durchgeführt werden. Die Bande bei  $1530\text{ cm}^{-1}$  resultiert aus einer Normal-Mode der C(4a)-N(5) oder C(5a)-N(5) Bindung. Die Bande bei  $1394\text{ cm}^{-1}$  ist charakteristisch für eine C-N Einzelbindungs-Streckschwingung, die entweder aus der C(9a)-N(10) oder C(10a)-N(10) Bindung resultiert. Mit Hilfe der Resonanz-RAMAN-Spektroskopie ist es durch Literatur-Vergleich leicht möglich, gleiche RAMAN/FT-IR Schwingungsmoden zuzuordnen.

### DNA-Schädigung

Mit Hilfe der Dichtefunktionaltheorie durchgeführten Berechnungen von Schmitz et al. (Schmitz et al. 2001) zur Spaltung von CPD's konnte ein relativ genaues Bandenmuster bei der Spaltung der Thymin berechnete werden. Diese Berechnungen lassen relativ genaue Rückschlüsse auf die Energie, nicht aber auf die Intensität der Infrarot-Mode zu. Besondere Beachtung verdienen die Carbonylschwingungen, die im Bereich von  $1710\text{-}1730\text{ cm}^{-1}$  für das Dimer und bei  $1701\text{ cm}^{-1}$  und  $1736\text{ cm}^{-1}$  für beide ungeschädigten Thymin liegen. Leider ist dieser Bereich in dem gemessenen Spektrum 1 in Abb. 3.21 wegen der starken Wasserabsorption intransparent und daher nicht auswertbar. Nur eine schwache Bande bei  $1728\text{ cm}^{-1}$  ist reproduzierbar der Schädigung zuzuordnen.

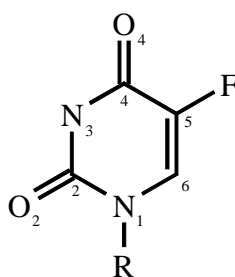


Abb. 4.4: Schematische Darstellung und IUPAC-Nomenklatur von Fluoruracil

Für das berechnete Spektrum von 5-Fluoruracil-Dimeren (Abb. 4.4.) sind alle Carbonylschwingungsmoden in Richtung höherer Energie verschoben:  $1725$  bzw.  $1738\text{ cm}^{-1}$  für  $\text{C}_2=\text{O}_2$  und  $1753$  bzw.  $1732\text{ cm}^{-1}$  für  $\text{C}_4=\text{O}_4$  (aufgrund der Asymmetrie eines Dimers ergeben 5'-Nukleotid und 3'-Nukleotid unterschiedliche Schwingungsmoden). In Fluoruracil-Monomeren sind die Carbonylschwingungen bei  $1736\text{ cm}^{-1}$  für  $\text{C}_2=\text{O}_2$  und  $1726\text{ cm}^{-1}$  für  $\text{C}_4=\text{O}_4$  zu finden. Im gemessenen FT-IR-Spektrum (Abb 3.21. Spektrum 2) ist eine starke Differenzbande bei  $1740/1718\text{ cm}^{-1}$  zu erkennen. Aufgrund der Differenzbildung sind negative Banden dem Monomer, positive Banden dem Dimer zuzuordnen. Somit kann die bei  $1740\text{ cm}^{-1}$  gemessene Bande den beiden Carbonylmoden  $\text{C}_2=\text{O}_2$  und  $\text{C}_4=\text{O}_4$  zugeordnet werden. Die Monomerbande bei  $1718\text{ cm}^{-1}$  zeigt eine gute Übereinstimmung mit der berechneten Mode bei  $1726\text{ cm}^{-1}$ . Somit kann eine relativ einfache Bandenzuordnung vorgenommen werden. Um den gesamten Spektralbereich interpretieren zu können, muss der für alle Carbonylschwingungen wichtige Bereich zwischen  $1700$  und  $1600\text{ cm}^{-1}$  interpretierbar gemacht werden. Dies kann durch Messung der Schädigung als auch der Reparatur in deuteriertem Puffer geschehen. Im Gegensatz zu Wasser besitzt schweres Wasser keine Absorption im Bereich der Carbonylschwingungen, da diese in den Bereich

2800  $\text{cm}^{-1}$  verschoben sind (Der Bereich zwischen 1000 und 1400  $\text{cm}^{-1}$  ist dann durch Absorptionen intransparent). Somit kann aus den Messungen in beiden Puffern ein reproduzierbares Gesamtspektrum zusammengesetzt werden.

#### Reparatur von DNA mittels DNA-Photolyase

Die Reparatur der DNA durch DNA-Photolyase kann mittels FT-IR in Echtzeit verfolgt werden. Im charakteristischen Bandenmuster können zwei Arten von Schwingungsmoden zugeordnet werden: Einerseits können die Banden, die nach DNA Schädigung invertiert sind (Abb. 3.21. Spektrum 3 und 5), der DNA zugeordnet werden (1464, 1396 und 1302, 1483 und 1289  $\text{cm}^{-1}$ ); andererseits sind die Banden, die nach DNA Schädigung nicht verändert sind, nicht Schwingungen der DNA (1539, 1527, 1517  $\text{cm}^{-1}$ , 1244  $\text{cm}^{-1}$  und 1224  $\text{cm}^{-1}$ ). Da sich diese Banden nicht mit der Konzentration an reparierter DNA ändern, wie die Konzentrationsreihe in Abb. 3.23 zeigt, sind sie dem Enzym zuzuordnen. Der Enzym-Substrat-Komplex kann nicht Ursache dieser Schwingungen sein, da er schon vor dem Start der Reparatur gebildet wird. Vermutlich entstehen diese Differenzbanden durch das „Ablösen“ der reparierten DNA vom Enzym oder durch Bindung des entstandenen Produkts an das Enzym (mit Fortdauer der Reparatur ist der Anteil an Substrat erheblich geringer geworden). Um genauere Aussagen über diese Banden machen zu können, sind weitere Reparaturuntersuchungen mit differentiell markiertem Substrat und Enzym nötig.

Die Messung des gesamten Schädigungs/Reparatur-Zyklus wurde durchgeführt, um die vorhergehenden Messungen, die jeweils Teilaspekte der Gesamtreaktion darstellen, zu bestätigen. Bei diesen Experimenten ist das Signal zu Rausch Verhältnis deutlich schlechter als in den vorhergehenden Einzelmessungen, da die DNA-Photolyase durch lange Bestrahlung mit UV-Licht teilweise zerstört wird und sich somit die Zusammensetzung in der Küvette ändert. Auch sorgen die langen Bestrahlungszeiten für einen deutlichen Drift der Basislinie. Trotzdem konnten alle theoretisch erwarteten Reaktionen beobachtet werden: Erwartungsgemäß zeigt das Spektrum nach UV-Bestrahlung in Anwesenheit von DNA nur die durch Photoreduktion von DNA-Photolyase ausgelösten Veränderungen, da der Extinktionskoeffizient von DNA-Photolyase bei 308 nm deutlich größer als der von DNA ist. Die Schädigung der DNA kann bewiesen werden, da das Spektrum 1 (schwarz) in Abb. 3.24 (Photoschädigung nach 100 Laser Pulsen) ein identisches Bandenmuster mit dem Spektrum 3 in Abb. 3.20 (Photoreduktion mit Substrat), nicht aber mit Spektrum 2 in Abb. 3.20 (Photoreduktion mit Produkt) zeigt. Das heißt, dass in der Küvette schon Substrat gebildet worden sein muss. Da das Substrat eine ca. 1000-fach höhere Affinität zu DNA-Photolyase

besitzt als das Produkt, wird auch wenig gebildetes Substrat an DNA-Photolyase gebunden (Sancar 1990), Da keine Reparaturbanden im Spektrum auftauchen, kann man davon ausgehen, dass keine nennenswerte Reparatur stattfindet. Das Reparaturspektrum 2 in Abb.3.24 ermöglicht nur einen kleinen auswertbaren Teil des gemessenen Bereichs. Grund dafür ist die Inkonstanz der Temperatur über einen so langen Zeitraum (das ganze Experiment dauerte über eine Stunde) und der lange Zeitraum zwischen der Messung des Nullspektrums und der Differenzspektren. Im auswertbaren Teil des Spektrums (1550-1150  $\text{cm}^{-1}$ ) sind dieselben Differenzbanden wie bei der Photoreparatur von Enzym und Substrat zu erkennen (Spektrum 3 in Abb.18). Wir sind somit in der Lage, sowohl Photo-Schädigung als auch Photo-Reparatur in einer Küvette nacheinander zu vermessen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass alle in Abb. 3.19. beschriebenen Reaktionen von DNA-Photolyase im FT-IR Spektrometer durchgeführt werden konnten.

#### 4.4. EPR/ENDOR Spektroskopie

##### EPR-Spektroskopie

DNA-Photolyase in der blauen Radikal-Form zeigt ein stabiles X-Band Radikal-Spektrum mit einer peak-to-peak Breite von 1,87 mT und einer teils aufgelösten Hyperfeinstruktur mit einer Breite von 0,85 mT (Abb. 3.25.). Die Hyperfeinwechselwirkung kann aufgrund von Vergleichsspektren dem Proton am N5 zugeordnet werden und der Wert  $A_{\text{iso}}$  bestimmt werden. Wenn der Isoalloxazinring in der neutralen Form vorliegt sollte sich die Linienbreite durch Deuteriumaustausch aller aciden Protonen deutlich verringern, da das acide N5 Proton austauscht (Çinkaya et al. 1997). Da eine Verringerung der Bandenbreite um über 30 % gemessen werden konnte, kann davon ausgegangen werden, dass das Flavin-Radikal in der neutralen Form am N5 protoniert ist.

In EPR-Spektren von DNA-Photolyase in der blauen Radikal-Form unter Zugabe von einzelsträngiger 18T-DNA oder von doppelsträngiger DNA mit einem CPD in der Mitte sollten sich Änderungen ergeben, wenn sich die elektronische Struktur am Isoalloxazinring ändert. Da in Anwesenheit von Substrat keine Änderungen im EPR-Spektrum beobachtet werden konnte, kann man davon ausgehen, dass die elektronische Struktur im Isoalloxazinring ungestört bleibt. Dies steht im Widerspruch zu bereits in der Literatur beschriebenen Spektren (Rustandi und Jorns 1995), die eine asymmetrische Verbreiterung um 0,17 mT beobachten konnten. Vermutlich entstehen diese Verzerrungen des EPR-Signals

durch partielle Sättigung des detektierten EPR-Signals. Dies ist bei Flavin-EPR-Spektren bei tiefen Temperaturen und hoher Mikrowellenleistung möglich. Ähnliche Effekte wie die von Rustandi und Jorns beschrieben konnten bei optimaler Wahl der Messparameter nicht reproduziert werden.

#### ENDOR-Spektroskopie ohne Substrat

Durch Protonen ENDOR-Spektroskopie an der DNA-Photolyase (Abb. 3.27) konnten eine Reihe von Hyperfeinkopplungskonstanten bestimmt werden (siehe Tabelle 3.3), die Rückschlüsse auf die elektronische und geometrische Struktur des Isoalloxazinringes zulassen. Durch die Bestimmung und Zuordnung der Hyperfeinwechselwirkungskonstanten ist es einerseits bei einigen Protonen möglich, Aussagen über deren räumliche Anordnung zu machen: Es konnte die räumliche Anordnung der beiden magnetisch inequivalenten Protonen am C1' berechnet werden (Kay et al. 1999). Zum anderen kann aus den Hyperfeinwechselwirkungskonstanten direkt auf die elektronische Struktur des Radikals am Isoalloxazinring geschlossen werden (Weber et al. 2001). Hierbei zeigt sich, dass die Spindichte insbesondere an den Atomen N5, N10 und C4a lokalisiert ist. Auffällig ist auch, dass die isotropen Hyperfeinwechselwirkungskonstanten der C8 $\alpha$  und C6-Protonen im Vergleich mit denen anderer Flavo-Proteine sehr gering sind (Çinkaya et al. 1997, Kurreck et al. 1984, Medina et al. 1994 und Medina et al. 1995). Dies deutet auf eine unpolare Bindungsregion hin. Diese Vermutung wird durch das ENDOR-Spektrum mit Deuterium ausgetauschtem Puffer noch verdeutlicht: Nachdem sich die Intensität des Matrix-ENDOR Signals nur um ca. 15% verringert, werden 85 % der Protonen nicht durch Deuterium ausgetauscht. Diese Protonen sind dementsprechend nicht acide, sondern sind an unpolaren Aminosäuren lokalisiert.

Ein weiterer, für den Reaktionsverlauf des Enzyms wichtiger Grund ist die einmalige Form des enzymgebundenen FADH<sup>-</sup>. Es liegt in einer U-Form vor, wo der Adenin-Rest des FADH<sup>-</sup> über dem 7,8-Dimethylisoalloxazin-Heterocyclus angeordnet ist (Park et al. 1995). Dies bringt den Adenin-Rest in große Nähe zum N5, N10 und C4a. Aus diesem Grund wird die Elektronendichte des Benzol-Ringes erniedrigt, was in den kleinen isotropen Hyperfeinwechselwirkungskonstanten der Protonen am Benzol-Ring (C8 $\alpha$  und C6) sichtbar wird. Die erhöhte Elektronendichte am Adenin-Rest lässt einen Elektronenübertragungsweg vom Isoalloxazinring über den Adenin-Rest auf das Substrat zu (Weber et al. 2001a).



### ENDOR-Spektroskopie mit Substrat

Durch ENDOR-Messungen mit DNA-Photolyase und Substrat (sowohl mit einzelsträngiger als auch mit doppelsträngiger DNA) (Abb. 3.28 und Abb. 3.29) und Vergleich mit ENDOR-Messungen ohne Substrat kann man den Einfluss des Substrats auf die elektronische Struktur des Isoalloxazinringes und damit auch indirekt den Abstand der beiden messen. Nachdem nur kleine Bandenverschiebungen messbar sind, kann daraus geschlossen werden, dass die Zugabe von Substrat nur wenig Einfluss auf die elektronische Struktur des Isoalloxazinringes hat. Außerdem deutet die kleine Verringerung des Matrix-ENDOR-Signals um 2,4 % auf keinen direkten „Kontakt“ zwischen CPD und Flavin hin. Wahrscheinlich kommt die Verringerung des Signals durch Verdrängung von Wasser aus der Bindungstasche durch das Substrat zustande. Die Verschiebungen der Hyperfeinwechselwirkungskonstanten der Protonen C8 $\alpha$ , C6 und C1 bei Zugabe von Substrat hin zu kleineren Konstanten ist ein weiteres Indiz für eine Erniedrigung der Polarität in der Bindungstasche.

Zusammenfassend bedeutet das, dass der Abstand zwischen Substrat und Isoalloxazinring größer als 0,6 nm sein muss, da mit ENDOR-Spektroskopie nur Änderungen der Hyperfeinwechselwirkungskonstanten bis zu einem Abstand von ca. 0,6 nm gemessen werden können.

Bis heute liegt keine Kristallstruktur der DNA-Photolyase mit gebundenem Substrat vor. Einige Modellrechnungen haben den Abstand von Isoalloxazinring und Substrat simuliert (Sanders und Wiest 1999, Hahn et al. 1999 und Antony et al. 2000). Während die beiden Simulationen (Sanders und Wiest 1999 und Hahn et al. 1999) von einem Abstand von  $> 0,6$  nm bzw. 1,7 nm ausgehen, resultiert aus einer Rechnung von Antony und Mitarbeitern (Antony et al. 2000) ein sehr kleiner Abstand von  $\approx 0,3$  nm. Unsere durchgeführten ENDOR-Messungen unterstützen eindeutig die beiden Simulationen, die einen relativ großen Abstand vorhersagen (Weber et al. 2001b).

Ein weiterer Aspekt ist der Vergleich der ENDOR-Spektren mit einzelsträngiger 18T DNA und mit doppelsträngiger DNA mit einem CPD in der Mitte, bei denen keine Unterschiede in den beiden ENDOR-Spektren festgestellt werden konnten. Dies bedeutet, dass sich die Enzymbindung von einzel- und doppelsträngiger DNA nicht unterscheidet.

Dies bedeutet weiterhin, dass Messungen mit dem „synthetischen-Substrat“ (einzelsträngiger 18T DNA) den Messungen mit „natürlichem Substrat“ (doppelsträngiger DNA mit einem CPD) entsprechen.

## 5. Zusammenfassung

Wird DNA UV-C Strahlung ausgesetzt, können eine Reihe von zyklischen Elektronenübertragungsreaktionen stattfinden. Als Hauptreaktion tritt eine [2+2]-Cycloaddition benachbarter Pyrimidine auf. Als Produkt entsteht ein Cyclobutan-Pyrimidin-Dimer. Diese Reaktion ruft durch die chemische Veränderung der DNA Mutationen bei der Replikation hervor und kann damit dem betroffenen Organismus schweren Schaden zufügen. Das Enzym DNA-Photolyase katalysiert die blaulichtinduzierte Spaltung dieser Dimere. Das Enzym besitzt zwei Cofaktoren: Katalytisch aktives Flavin-Adenin-Dinukleotid (FADH<sup>-</sup>) und Methenyltetrahydrofolat (MTHF) als 2. Chromophor zur Erhöhung der Quantenausbeute.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung des molekularen Mechanismus der Reparatur von UV-geschädigter DNA durch DNA-Photolyase.

Bei Beginn der Arbeit stand ein Expressionsklon der *E. coli* DNA-Photolyase zu Verfügung. Eine schnelle und in guten Ausbeuten verlaufende Reinigung dieser DNA-Photolyase mit zwei Chromatographieschritten konnte etabliert werden (Frühere Reinigungsprotokolle benötigten sieben bis acht Säulenchromatographie-Schritte). Das Enzym liegt nach der Reinigung vollständig in einer inaktiven Form mit dem Cofaktor in der blauen Radikalform FADH<sup>0</sup> vor. Es zeigte sich, dass die Konzentration an 2. Chromophor chargenabhängig variierte, da die Affinität zum Apoenzym relativ gering ist. Durch PCR-vermittelte Mutation der Aminosäure Glutamin 109 zu Alanin konnte die Bindungstasche für MTHF so verändert werden, dass keine Wasserstoffbrücken zwischen Cofaktor und Apoenzym mehr ausgebildet werden können und das Enzym daher kein MTHF mehr binden kann. Das veränderte Protein war weiterhin aktiv. Somit konnte eine gleichbleibende Chargenqualität gesichert werden.

Das mutierte Gen wurde in *B. subtilis* transformiert, da dieses Bakterium ein effizientes Riboflavin-Aufnahmesystem besitzt und somit ein Einbau von markierten Flavinen möglich ist.

Die Markierung von Riboflavin kann durch die Anzucht eines Riboflavin überexprimierenden *B. subtilis*-Stamms in Medium mit stabilisotopenmarkierten Vorstufen durchgeführt werden. Differenzielle Stabilisotopenmarkierung von Riboflavin kann durch eine gekoppelte enzymatische/chemische Synthese erreicht werden.

Es konnten folgende Isotopenmarkierungen durchgeführt werden: <sup>15</sup>N-Markierung von Apoenzym und FAD ohne die Aminosäuren Lysin, Histidin, Threonin und Tryptophan, eine Probe mit jeweils <sup>15</sup>N- und eine <sup>13</sup>C Totalmarkierung des Riboflavin-Teils von FAD und eine

Probe mit 5-<sup>15</sup>N-Markierung des Cofaktors. Ein Deuterium-Austausch aller aciden Protonen konnte durch mehrmalige Ultrafiltration mit Deuteriumoxid im Puffer erreicht werden.

Es wurden zwei Substrate hergestellt, ein synthetisches, einzelsträngiges 18T-DNA Oligonukleotid und ein doppelsträngiges 12-mer DNA Oligonukleotid mit zwei Thyminen in der Mitte eines Strangs. Beide Substrate wurden photochemisch bestrahlt und der Schädigungsgrad bestimmt.

Um mehr über den molekularen Mechanismus der DNA-Photolyase zu erfahren, wurden Fourier-Transform-Infrarot-Spektroskopie und paramagnetische Elektronenspin-Resonanz-Spektroskopie-Messungen durchgeführt.

Mittels Fourier-Transform-Infrarot-Spektroskopie können Schwingungsänderungen zwischen zwei Reaktions-Zuständen verfolgt werden. Es konnten folgende Reaktionen durchgeführt werden: Photoreduktion des enzymgebundenen FAD von der radikalischen Form in die aktive, reduzierte Form. Diese Reaktion kann mit Rotlicht gesteuert werden und wurde in Gegenwart von Substrat, Produkt, mit <sup>15</sup>N-markiertem Enzym, mit Deuterium ausgetauschtem Enzym und mit Enzym ohne Substrat durchgeführt. Es wurden reproduzierbare und charakteristische Bandenmuster beobachtet. Diese konnten der Radikal-Form des Enzyms und der vollreduzierten Form des Enzyms zugeordnet werden. Durch Vergleich mit Resonanz-RAMAN-Spektren konnten einzelne Schwingungsmoden dem Cofaktor FAD zugeordnet werden.

Die Photoschädigung von DNA konnte durch UV-Licht bei 308 nm erreicht werden. Durch Vergleich mit theoretisch berechneten Infrarot-Differenzspektren konnten z.B. einzelne Carbonylschwingungen zugeordnet werden.

Die Photoreparatur wurde durch Bestrahlung mit Blaulicht einer Enzym-Substrat-Mischung verfolgt. Auch hier ergab sich ein charakteristisches Bandenmuster, wobei Bandenmuster dem Enzym und dem Substrat zugeordnet werden können.

Mittels paramagnetischer Elektronenspin-Resonanz-Spektroskopie können paramagnetische Zentren in Proteinen beobachtet werden. Es wurden sowohl X-Band- als auch W-Band-Spektren des protonierten und Deuterium ausgetauschten Enzyms gemessen. Der g-Faktor und die Linienbreite der einzelnen Signale konnten bestimmt werden. Außerdem wurden Elektron-Kern-Doppelresonanz-Spektren (ENDOR-Spektroskopie) mit protoniertem und deuteriertem Enzym gemessen. Hier konnten sowohl die isotropen als auch die anisotropen Anteile verschiedener Hyperfeinkopplungskonstanten bestimmt und einzelnen Protonen zugeordnet werden. ENDOR-Spektren mit Enzym und Substrat zeigten nur kleine

Änderungen in den Spektren. Daraus konnte ein Mindestabstand des Substrats vom Cofaktor FAD bestimmt werden. Er beträgt mindestens 0,6 nm.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten weiterhin Expressionsklone der beiden DNA-Photolyasen aus *A. nidulans* und *T. thermophilus* konstruiert werden. Beide Proteine konnten exprimiert und bis zur Homogenität gereinigt werden.

## 6. Literaturverzeichnis

Ahmad, M. und Cashmore, A. R. (1993) HY4 gene of *A. thaliana* encodes a protein with characteristics of a blue-light photoreceptor. *Nature* **366**, 162–166

Antony, J., Medvedev, M., und Stuchebrukhov, A. A. (2000) Theoretical study of electron transfer between the photolyase catalytic cofactor FADH<sup>-</sup> and DNA thymine dimer *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 1057-1065.

Atherton, N. M. (1993), Principles of Electron Spin Resonance, Ellis Horwood LTD., Chichester

Aubert, C., Vos, M. H., Mathis, P., Eker, A. P. M. und Brettel, K. (2000) Intraprotein radical transfer during photoactivation of DNA photolyase. *Nature* **405**, 586-590

Banerjee, S. K., Borden, A., Christensen, R.B., LeClerc, J. E. und Lawrence, C. W. (1990) SOS-dependent replication past a single trans-syn T-T cyclobutane dimer gives a different mutation spectrum and increased error rate compared with replication past this lesion in uninduced cells. *J. Bacteriol.* **172**, 2105-2112

Bernard, P., Kezdy, K. E., Van Melderen, L., Steyaert, J., Wyns, L., Pato, M. L., Higgins, P. N., Couturier, M. (1993) The F plasmid CcdB protein induces efficient ATP-dependent DNA cleavage by gyrase. *J. Mol. Biol.* **234**, 534-541

Brainman, M. S. und Rothschild, K. J. (1988), Fourier transform infrared techniques for probing membrane protein structure. *Annu. Rev. Biophys. Chem.* **17**, 541-570

Brigidi, P., De Rossi, E., Bertarini, M. L., Riccardi, G. und Matteuzzi, D. (1990) Genetic transformation of intact cells of *Bacillus subtilis* by electroporation. *FEMS Microbiol. Lett.* **55**, 135-138

Bullock, W. O., Fernandez, J. M. und Short, J. M. (1987) XL1-Blue: A high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* with beta galactosidase selection. *Bio Techniques* **5**, 376-380

Burghaus, O., Rohrer, M., Gotzinger, T., Plato, M. und Möbius, K. (1992) A novel high-field/high-frequency EPR and ENDOR spectrometer operating at 3 mm wavelength. *Meas. Sci. Technol.* **3**, 765-774.

Butlin, H. T. (1892) Cancer of the scrotum in chimney-sweeps and others. II. Why foreign sweeps do not suffer from scrotal cancer. *Br. Med. J.* **1**, 1341-1346

Cantor, C. R., Warshaw, M. M., Shapiro, H. (1970) Oligonucleotide interactions. 3. Circular dichroism studies of the conformation of deoxyoligonucleotides. *Biopolymers* **9**, 1059-1077

Carrington, A. und McLachlan, A. D. (1969) Introduction to Magnetic Resonance, Harper International Edition, New York

Casaregola, S., D'Ari, R., Huisman, O. (1982) Role of DNA replication in the induction and turn-off of the SOS response in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* **185**, 440-4

Cecchini, G., Perl, M., Lipsick, J., Singer, T. P. und Kearney, E. B. (1979) Transport and binding of riboflavin by *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* **254**, 7295-7301.

Cheung, M. S., Daizadeh, I., Stuchebrukhov, A. A. und Heelis, P. F. (1999) Pathways of electron transfer in *Escherichia coli* DNA photolyase: Trp306 to FADH. *Biophys. J.* **76**, 1241-1249

Chu, G. (1994) Cellular responses to cisplatin. *J. Biol. Chem.* **269**, 787-790

Çinkaya, I., Buckel, W., Medina, M., Gomez-Moreno, C. und Cammack, R. (1997) Electron-nuclear double resonance spectroscopy investigation of 4-hydroxybutyryl-CoA dehydratase from *Clostridium aminobutyricum*: comparison with other flavin radical enzymes. *Biol. Chem.* **378**, 843-849.

Coleman, G. und Elliott, W. H. (1962) Studies on  $\alpha$ -amylase formation by *Bacillus subtilis*. *Biochem. J.* **83**, 256-263

Crick, F. H. C., Leslie Barnett, F. R. S., Brenner, S. und Watts-Tobin, R. J. (1961) General nature of the genetic code for proteins. *Nature* **192**, 1227-1232

Demple, B. und Linn, S. (1982) 5,6-Saturated thymine lesions in DNA: production by ultraviolet light or hydrogen peroxide. *Nucleic Acids Res.* **10**, 3781-3789

Dower, W. J., Miller, J. F. und Ragsdale, C. W. (1988) High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.* **16**, 6127-16145

Eker, A. P. M., Kooiman, P., Hessels, J. K. C. und Yasui, A. (1990) DNA photoreactivating enzyme from the cyanobacterium *Anacystis nidulans*. *J. Biol. Chem.* **265**, 8009–8015.

Enderle, P. J. und Farwell, M. A. (1998) Electroporation of freshly plated *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* cells. *Biotechniques* **25**, 954-956

Fajardo-Cavazos, P., Salazar, C. und Nicholson, W. (1993) Molecular cloning and characterization of the *Bacillus subtilis* spore photoproduct (*spl*) gene, which is involved in repair of UV radiation-induced DNA damage during spore germination. *J. Bacteriol.* **175**, 1735-1744

Fisher, G.J. und Johns, H. E. Pyrimidine hydrates., 1976 p. 169-294. In S. Y. Wang (ed.), *Photochemistry and Photobiology of Nucleic Acids*, vol 1. Academic press, Inc., New York

Frankenberg-Schwager, M. (1990) Induction, repair and biological relevance of radiation-induced DNA lesions in eucariotic cells. *Radiat. Environ. Biophys.* **29**, 273-292

Friedberg, E. C., Walker G. C., Siede, W., DNA repair und mutagenesis, ASM Press, Washington, D. C, 1995

Gerwert, K. (1988) Intramolekulare Proteindynamik untersucht mit zeitaufgelöster Fourier Transform Infrarot-Differenzspektroskopie. *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* **92**, 978-982

- Gerwert, K. (1999) Molecular reaction mechanisms of proteins monitored by time-resolved FTIR-spectroscopy. *Biol Chem.* **380**, 931-935
- Gindt, Y. M., Vollenbroek, E., Westphal, K., Sackett, H., Sancar, A. und Babcock, G. T. (1999) Origin of the transient electron paramagnetic resonance signals in DNA photolyase. *Biochemistry* **38**, 3857-3866
- Grossman, L. und Thiagalingam, S. (1993) Nucleotide excision repair, a tracking mechanism in search of damage. *J. Biol. Chem.* **268**, 16871-16874
- Hahn, J., Michel-Beyerle, M.-E. und Rösch, N. (1999) Binding of pyrimidine model dimers to the photolyase enzyme: A molekular dynamics study. *J. Phys. Chem. B.* **103**, 2001-2007.
- Hamm-Alvarez, S., Sancar, A. und Rajagopalan, K. V. (1990) The folate cofactor of Escherichia coli DNA photolyase acts catalytically. *J. Biol. Chem.* **265**, 18656-18662
- Heelis, P. F., Kim, S. T., Okamura, T., Sancar, A. (1993) The photo repair of pyrimidine dimers by DNA photolyase and model systems. *J. Photochem. Photobiol.* **17**, 219-228
- Henner, D. J. (1990) Inducible expression of regulatory genes in Bacillus subtilis. *Methods Enzymol.* **185**, 223-228
- Hitomi, K., Kim, S. T., Iwai, S., Harima, N., Otsoshi, E., Ikenaga, M., Todo, T. (1997) Binding and catalytic properties of Xenopus (6-4) photolyase. *J. Biol. Chem.* **272**, 32591-32598
- Hitomi, K., Okamoto, K., Daiyasu, H., Miyashita, H., Iwai, S., Toh, H., Ishiura, M. und Todo, T. (2000) Bacterial cryptochrome and photolyase: Characterisation of two photolyase-like genes of Synechocystis sp. PCC 6803. *Nucleic Acids Res.* **28**, 2353-2362
- Hitomi, K., Nakamura, H., Kim, S. T., Mizukoshi, T., Ishikawa, T., Iwai, S., Todo, T. (2001) Role of two histidines in the (6-4) photolyase reaction. *J Biol Chem.* **276**, 10103-10109



Holmes, D. S. und Quigley, M. (1981) A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal. Biochem.* **114**, 193-197

Holtzhauer, M. (1996) Methoden der Proteinanalytik, Springer-Verlag, Berlin

Hsu, D. S., Zhao, X. D., Zhao, S. Y., Kazantsev, A., Wang, R. P., Todo, T., Wei, Y. F. und Sancar, A. (1996) Putative human blue-light photoreceptors hCRY1 and hCRY2 are flavoproteins. *Biochemistry* **35**, 13871–13877

Hümbelin, M., Griesser, V., Keller, T., Schurter, W., Haiker, M., Hohmann, H.-P., Ritz, H., Richter, G., Bacher, A. und van Loon, A. P. G. M. (1999) GTP cyclohydrolase II and 3,4-dihydroxy-2-butanone 4-phosphate synthase are rate-limiting enzymes in riboflavin synthesis of an industrial *Bacillus subtilis* strain used for riboflavin production *J. of Ind. Microbiol. Biotech.* **22**, 1-7

Humayun, M. Z., (1981) SOS and Mayday: multiple inducible mutagenic pathways in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **30**, 905-910

Jorns, M. S., Baldwin, E. T., Sancar, G. B. and Sancar, A. (1987a) Action mechanism of *Escherichia coli* DNA photolyase. II. Role of the chromophores in catalysis. *J Biol. Chem.* **262**, 486–491

Jorns, M. S., Wang, B. und Jordan, S. P (1987b) DNA repair catalyzed by *Escherichia coli* DNA photolyase containing only reduced flavin: elimination of the enzyme's second chromophore by reduction with sodium borohydride. *Biochemistry* **26**, 6810-6816

Jorns, M. S., Wang, B. Y., Jordan, S. P., Chanderkar, L. P. (1990) Chromophore function and interaction in *Escherichia coli* DNA photolyase: reconstitution of the apoenzyme with pterin and/or flavin derivatives. *Biochemistry.* **29**, 552-561

Kao, J. L., Nadji, S., Taylor, J. S., (1993) Identification and structure determination of a third cyclobutane photodimer of thymidylyl-(3'-->5')-thymidine: the trans-syn-II product. *Chem. Res. Toxicol.* **6**, 561-567

- Kato, T., Jr, Todo, T., Ayaki, H., Ishizaki, K., Morita, T., Mitra, S. und Ikenaga, M. (1994) Cloning of a marsupial DNA photolyase gene and the lack of related nucleotide sequences in placental mammals. *Nucleic Acids Res.* **22**, 4119–4124
- Kanai, S., Kikuno, R., Toh, H., Ryo, H. and Todo, T. (1997), Molecular evolution of the photolyase-blue-light photoreceptor family. *J. Mol. Evol.* **45**, 535–548
- Kay, C. W. M., Feicht, R., Schulz, K., Sadewater, P., Sancar, A., Bacher, A., Möbius, K., Richter, G. und Weber, S. (1999) EPR, ENDOR, and TRIPLE resonance spectroscopy on the neutral flavin radical in Escherichia coli DNA photolyase. *Biochemistry* **38**, 16740–16748
- Kelner, A. (1949) Effect of visible light on the recovery of *Streptomyces griseus* conidia from ultraviolet radiation injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **35**, 73-79
- Kim, S. T., Li, Y. F. und Sancar, A. (1992) The third chromophore of DNA photolyase: Trp-277 of Escherichia coli DNA photolyase repairs thymine dimers by direct electron transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **89**, 900-904.
- Kim, S. T. und Sancar, A. (1993) Photochemistry, photophysics, and mechanism of pyrimidine dimer repair by DNA photolyase. *Photochem. Photobiol.* **57**, 895-904
- Kim, S.-T., Sancar, A., Essenbacher, C. und Babcock, G. T. (1993) Time-resolved EPR studies with DNA photolyase: excited-state FADH<sub>0</sub> abstracts an electron from Trp-306 to generate FADH<sup>-</sup>, the catalytically active form of the cofactor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **90**, 8023–8027
- Kobayashi, Y., Ishikawa, T., Hirayama, J., Daiyasu, H., Kanai, S., Toh, H., Fukuda, I., Tsujimura, T., Terada, N., Kamei, Y., Yuba, S., Iwai, S., Todo, T. (2000) Molecular analysis of zebrafish photolyase/cryptochrome family: two types of cryptochromes present in zebrafish. *Genes Cells.* **5**, 725-738
- Komori, H., Masui, R., Kuramitsu, S., Yokoyama, S., Shibata, T., Inoue, Y. und Miki, K. (2001) Crystal structure of thermostable DNA photolyase: Pyrimidine-dimer recognition mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **98**, 13560-13565

Koning, M. T., Soest, J. G. und Kaptein, R. (1991) NMR studies of bipyridine cyclobutane photodimers. *Eur. J. Biochem.* **195**, 29-40

Kurreck, H., Bock, M., Bretz, N., Elser, M., Kraus, H., Lubitz, W., Müller, F., Geissler, J. und Kroneck, P. M. H. (1984) Fluid solution and solid state electron nuclear double resonance studies of flavin model compounds and flavoenzymes. *J. Am. Chem. Soc.* **106**, 737-746

Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685

LeClerc, J. E., Borden, A. und Lawrence, C. W. (1991) The thymine-thymine pyrimidine-pyrimidone(6-4) ultraviolet light photoproduct is highly mutagenic and specifically induces 3' thymine-to-cytosine transitions in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **88**, 9685-9659

Lee, J. H., Hwang, G. S., Choi, B. S. (1999) Solution structure of a DNA decamer duplex containing the stable 3' T.G base pair of the pyrimidine(6-4)pyrimidone photoproduct [(6-4) adduct]: implications for the highly specific 3' T --> C transition of the (6-4) adduct. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**, 6632-6636

Lewine, B. (1991), Gene-Lehrbuch der molekularen Genetik, 2. Aufl., VCH-Verlagsgesellschaft, Weinheim

Li, Y. F. und Sancar, A. (1990) Active site of *Escherichia coli* DNA photolyase: mutations at Trp277 alter the selectivity of the enzyme without affecting the quantum yield of photorepair. *Biochemistry* **29**, 698-706

Li, Y.-F., Heelis, P.F. und 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**, 6322-6329

Lin, C., Robertson, D. E., Ahmad, M., Raibekas, A. A., Jorns, M. S., Dutton, P. L. und Cashmore, A. R. (1995) Association of flavin adenine dinucleotide with the *Arabidopsis* blue light receptor CRY1. *Science* **18**, 968-70

- Lin, C. (2000) Plant blue-light receptors. *Trends Plant Sci.* **5**, 337-342.
- Lindahl, T. (1993) Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* **362**, 709-715
- Loeb, L. A. and Kunkel, T. A. (1981) Fidelity of DNA synthesis. *Annu. Rev. Biochem.* **52**, 429-457
- Ludlam, C. F., Sonar, S., Lee, C. P., Coleman, M., Herzfeld, J., RajBhandary, U. L. und Rothschild, K. J. (1995) Site-directed isotope labelling and ATR-FTIR difference spectroscopy of bacteriorhodopsin: the peptide carbonyl group of Tyr 185 is structurally active during the bR $\rightarrow$ N transition. *Biochemistry* **34**, 2-6
- Malhotra, K., Kim, S. T., Walsh, C. und Sancar, A. (1992) Roles of FAD and 8-hydroxy-5-deazaflavin chromophores in photoreactivation by *Anacystis nidulans* DNA photolyase. *J Biol Chem.* **267**, 15406-15411.
- Malhotra, K., Kim, S.-T., Batschauer, A., Dawut, L. und Sancar, A. (1995) Putative blue-light photoreceptors from *Arabidopsis thaliana* and *Sinapis alba* with a high degree of sequence homology to DNA photolyase contain the two photolyase cofactors but lack DNA repair activity. *Biochemistry* **34**, 6892–6899
- Marini, F. III., Naeem, A. und Lapeyre, J.-N. (1993) An efficient 1-tube PCR method for internal site directed mutagenesis of large amplified molecules. *Nucl. Acids Res.* **21**, 2277-2278
- McAteer, K., Jing, Y., Kao, J., Taylor, J. S., Kennedy, M. A. (1998) Solution-state structure of a DNA dodecamer duplex containing a Cis-syn thymine cyclobutane dimer, the major UV photoproduct of DNA.. *J. Mol. Biol.* **282**, 1013-32
- Medina, M., Vrieling, A. und Cammack, R. (1994) ESR and electron nuclear double resonance characterization of the cholesterol oxidase from *Brevibacterium sterolicum* in its semiquinone state. *Eur. J. Biochem.* **222**, 941-947

- Medina, M., Gomez-Moreno, C., und Cammack, R. (1995) Electron spin resonance and electron nuclear double resonance studies of flavoproteins involved in the photosynthetic electron transport in the cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7119. *Eur. J. Biochem.* **227**, 529-536.
- Mironov, V. N., Chikindas, M. L., Kraev, A. S., Stepanov, A. I. und Skriabin, K. G. (1990) The operon organization of genes for riboflavin biosynthesis in *Bacillus subtilis*. *Dokl. Akad. Nauk. SSSR.* **312**, 237-240
- Molina, M. J. und Rowland, F. S. (1974) Stratospheric sink for chlorofluoromethanes: Chlorine atom catalysed destruction of ozone. *Nature* **249**, 810-812
- Murgida, D. H., Schleicher, E., Bacher, A., Richter, G. und Hildebrandt, P. (2001) Resonance Raman spectroscopic study of the neutral flavin radical complex of DNA photolyase from *Escherichia coli*. *J. Raman Spectrosc.* **32**, 551-556
- Nakajima, S., Sugiyama, M., Iwai, S., Hitomi, K., Otsoshi, E., Kim, S. T., Jiang, C. Z., Todo, T., Britt, A. B. und Yamamoto, K. (1998) Cloning and characterization of a gene (UVR3) required for photorepair of 6-4 photoproducts in *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Res.* **26**, 638-644
- Ostanin, K., Harms, E. H., Stevis, P. E., Kuciel, R., Zhou, M. M., Van Etten, R. L. (1992) Overexpression, site-directed mutagenesis, and mechanism of *Escherichia coli* acid phosphatase. *J. Biol. Chem.* **267**, 22830-22836
- Park, H. W., Kim, S. T., Sancar, A., Deisenhofer, J. (1995) Crystal structure of DNA photolyase from *Escherichia coli*. *Science* **268**, 1858-1869
- Payne, G., Heelis, P. F., Rohrs, B. R. und Sancar, A. (1987) The active form of *Escherichia coli* DNA photolyase contains a fully reduced flavin and not a flavin radical, both in vivo and in vitro. *Biochemistry* **26**, 7121-7127

- Payne, G. und Sancar, A. (1990) Absolute action spectra of E-FADH<sub>2</sub> und E-FADH<sub>2</sub>-MTHF forms of *Escherichia coli* DNA photolyase. *Biochemistry* **29**, 7715-7727
- Payne, G., Wills, M., Walsh, C. und Sancar, A. (1990) Reconstitution of *Escherichia coli* photolyase with flavins and flavin analogues. *Biochemistry*. **29**, 5706-57011.
- Peng, W. und Shaw, B. R. (1996) Accelerated deamination of cytosine residues in UV-induced cyclobutane pyrimidine dimers leads to CC-->TT transitions. *Biochemistry* **35**, 10172-10181
- Perkins, J. B., Sloma, A., Hermann, T., Theriault, K., Zachgo, E., Erdenberger, T., Hannett, N., Chatterjee, N. P., Williams, V. Jr. G. R., Hatch, R. und Pero, J. (1998) Genetic engineering of *Bacillus subtilis* for the commercial production of riboflavin. *J. of Ind. Microbiol. Biotech.* **22**, 8-18
- Rahn, R. O. und Landry, L. C. (1971) Pyrimidine dimer formation in poly (d-dT) and apurinic acid. *Biochim Biophys Acta.* **247**, 197-206
- Ramaiah, D., Koch, T., Ørum H. and Schuster, G. B. (1998) Detection of thymine [2+2] photodimer repair in DNA: selective reaction of KMnO<sub>4</sub>. *Nucl. Acids Res.* **26**, 3940-3943.
- Rammelsberg, R., Heßling, B., Chorongiewski, H. und Gerwert, K. (1997) Molecular reactions mechanisms of proteins monitored by nanosecond step-scan FT-IR difference spectroscopy. *Applied Spectroscopy* **51**, 558-563
- Rippka, R. (1988) Isolation and purification of cyanobacteria. *Methods. Enzymol.* **167**, 3-27
- Rustandi, R. R. und Jorns, M. S. (1995) Photoinduced spin-polarized radical pair formation in a DNA photolyase.substrate complex at low temperature. *Biochemistry.* **34**, 2284-2288
- Sancar, A. (1994) Structure and function of DNA photolyase. *Biochemistry* **33**, 2-9
- Sancar, A., (2000) Cryptochrome: the second photoactive pigment in the eye and its role in circadian photoreception. *Annu. Rev. Biochem.* **69**, 31-67

- Sancar, G. B., Smith F. W. und Sancar A. (1985) Binding of Escherichia coli DNA photolyase to UV-irradiated DNA. *Biochemistry* **24**, 1849–1855
- Sancar, G. B., Smith, P. F. und Heelis, P. F. (1987) Purification of the yeast PHR1 photolyase from an Escherichia coli overproducing strain and characterization of the intrinsic chromophores of the enzyme. *J. Biol. Chem.* **262**, 15457-15465
- Sancar, G. B. (1990) DNA photolyases: physical properties, action mechanism, and roles in dark repair. *Mutat Res.* **236**, 147-160
- Sanders, D. B. und Wiest, O. (1999) A Model for the Enzyme-Substrate Complex of DNA Photolyase and Photodamaged DNA. *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 5127-5134
- Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A. R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 5463-5467
- Schmitz, M., Tavan, P. und Nonella, M. (2001) Vibrational analysis of carbonyl modes in different stages of light-induced cyclopuridine dimer repair reactions. in Preparation
- Setlow, R. B. und Carrier, W. L. (1966) Pyrimidine dimers in ultraviolet-irradiated DNA's. *J. Mol. Biol* **17**, 237-254
- Siebert, F., Mäntele, W. und Gerwert, K. (1983) Fourier-transform infrared spectroscopy applied to rhodopsin. The problem of the protonation state of the retinylidene Schiff base re-investigated. *Eur J Biochem.* **136**, 119-27
- Smith, C. A., Wang, M., Jiang, N., Che, L., Zhao, X. und Taylor, J.-S. (1996) Mutation Spectra of M13 Vectors Containing Site-Specific Cis-Syn, Trans-Syn-I, (6-4), and Dewar Pyrimidone Photoproducts of Thymidylyl-(3'-5')-Thymidine in *Escherichia coli* under SOS Conditions *Biochemistry* **35**, 4146-4154
- Stüber, D., Matile, H. und Garotta, G. (1990) System for high-level production in Escherichia coli and rapid purification of recombinant proteins: application to epitope mapping,

preparation of antibodies, and structure-function analysis. In *Immunological methods IV* (Lefkovits, I. und Pernis, P. eds.) pp. 121-152, Academic Press, Orlando, Florida

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*. *Nat. Struct. Biol.* **4**, 887-891

Todo, T., Takemori, H., Ryo, H., Ihara, M., Matsunaga, T., Nikaido, O., Sato, K. und Nomura, T. (1993) A new photoreactivating enzyme that specifically repairs ultraviolet light-induced (6-4) photoproducts. *Nature* **361**, 371-374

Todo, T., Ryo, H., Yamamoto, K., Toh, H., Inui, T., Ayaki, H., Nomura, T., Ikenaga, M. (1996) Similarity among the *Drosophila* (6-4) photolyase, a human photolyase homolog, and the DNA photolyase-blue-light photoreceptor family. *Science* **272**, 109-121

Todo, T., Kim, S. T., Hitomi, K., Otoshi, E., Inui, T., Morioka, H., Kobayashi, H., Ohtsuka, E., Toh, H., Ikenaga, M. (1997) Flavin adenine dinucleotide as a chromophore of the *Xenopus* (6-4) photolyase. *Nucleic Acids Res.* **25**, 764-768

Uhmann, W., Becker, A., Taran, C. und Siebert, F. (1991) Time-resolved FT-IR absorption spectroscopy using a step-scan interferometer. *Appl. Spectrosc.* **45**, 390-395

Vande Berg, B. J. und Sancar, G. B., (1998) Evidence for Dinucleotide Flipping by DNA Photolyase. *J. Biol. Chem.* **273**, 20276-20284

Varghese, A.J. (1970) 5-Tymidyl-5,6-dihydrothymine from DNA irradiated with ultraviolet light. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **38**, 484-490

Wang, C.-I. und Taylor, J.-S. (1992) In vitro evidence that UV-induced frameshift and substitution mutations at T tracts are the result of misalignment-mediated replication past a specific thymine dimer. *Biochemistry* **31**, 3671-3681

Warshel, A. (1977) Interpretation of resonance Raman spectra of biological molecules. *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* **6**, 273-300.



Weber, S., Mobius, K., Richter, G. und Kay, C. W. (2001a) The electronic structure of the flavin cofactor in DNA photolyase. *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 3790-3798.

Weber, S., Richter, G., Schleicher, E., Bacher, A., Mobius, K., Kay, C. W. (2001b) Substrate binding to DNA photolyase studied by electron paramagnetic resonance spectroscopy. *Biophys. J.* **81**, 1195-1204

Williams, D. M., Duvall, E. J. und Lovett, P. S. (1981) Cloning restriction fragments that promote expression of a gene in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **146**, 1162–1165.

Williams, R. A., Smith, K. E., Welch, S. G., Micallef, J. und Sharp RJ. (1995) DNA relatedness of *Thermus* strains, description of *Thermus brockianus* sp. nov., and proposal to reestablish *Thermus thermophilus* (Oshima and Imahori). *Int. J. Syst. Bacteriol.* **45**, 495-499.

Wulff, D. L. und Rupert, C. S. (1962) Disappearance of thymidine photodimer in ultraviolet irradiated DNA upon treatment with a photoreactivating enzyme from baker's yeast. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **7**, 237-240

Zamenhof, P. J. und Villarejo, M. (1972) Construction and properties of *Escherichia coli* strains exhibiting  $\lambda$ -complementation of  $\lambda$ -galactosidase fragments in vivo. *J. Bacteriol.* **110**, 171-178