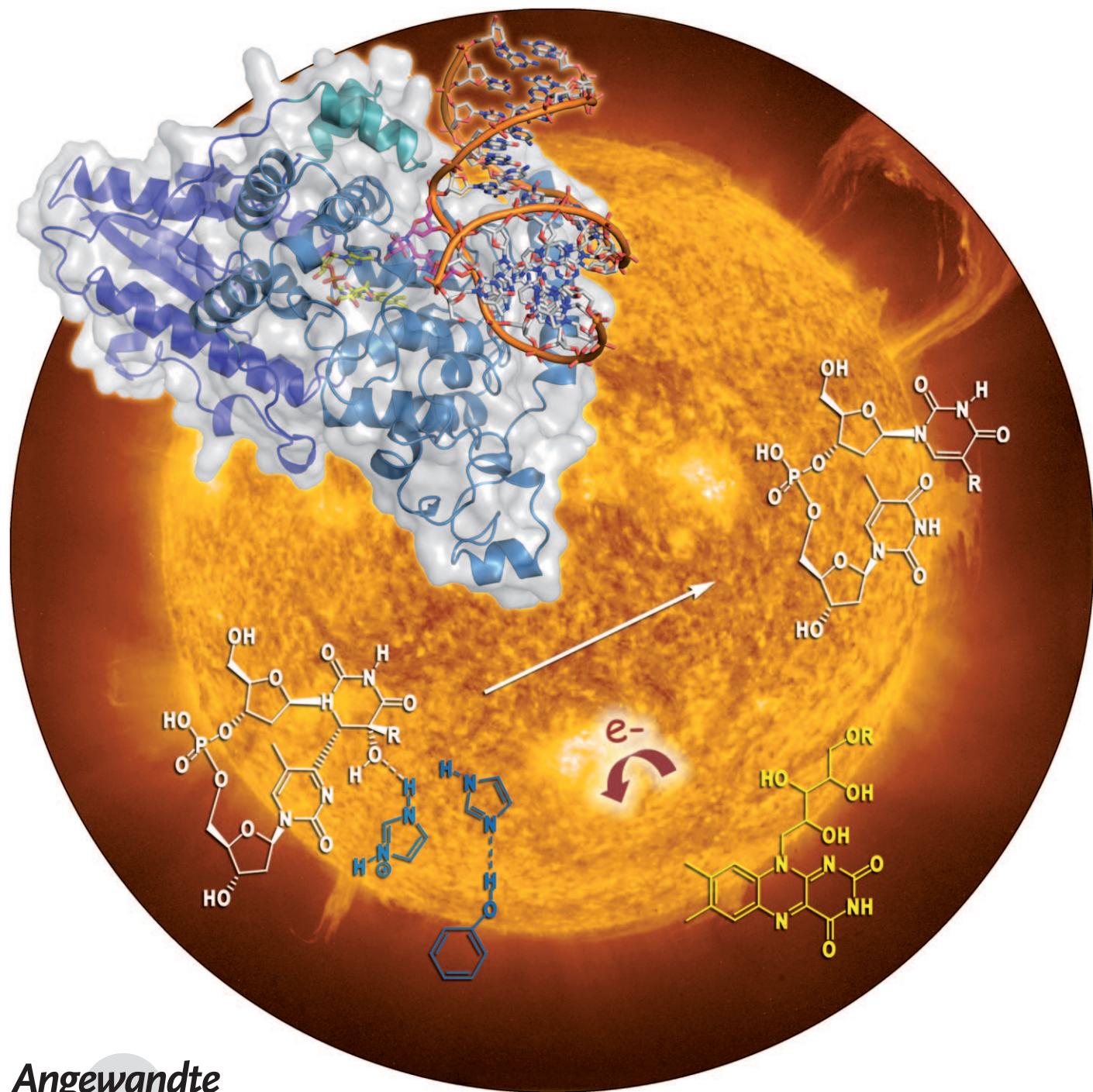


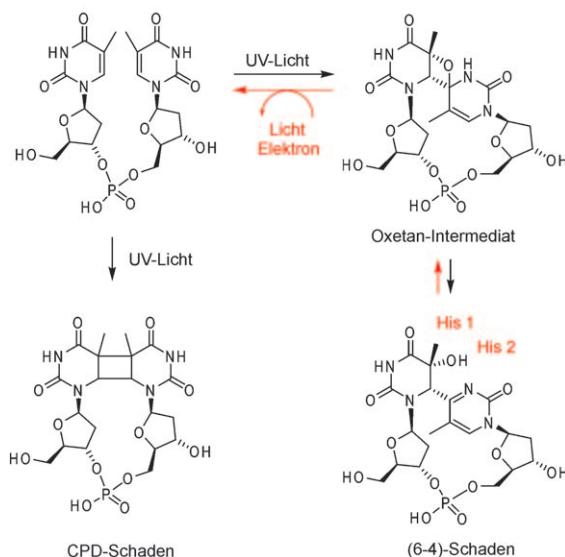
Röntgenkristallstruktur und Mechanismus der DNA-(6-4)-Photolyase**

Melanie J. Maul, Thomas R. M. Barends, Andreas F. Glas, Max J. Cryle,
Tatiana Domratcheva, Sabine Schneider, Ilme Schlichting* und Thomas Carell*



Die Bestrahlung von Zellen mit UV-Licht führt zur Bildung von Cyclobutanpyrimidin-Dimeren (CPDs) und den so genannten (6-4)-DNA-Photoschäden (Schema 1). Die beiden Schäden sind die am häufigsten auftretenden Photoproducte und werden in Dipyrimidinsequenzen in doppelsträngiger DNA gebildet.^[1,2] Die Reparatur der beiden Schäden ist wegen ihrer hohen Mutagenität unerlässlich. Von besonderer Bedeutung ist die durch Photolyasen vermittelte Reparatur dieser Schäden. Photolyasen sind in der Lage, die am CPD- oder (6-4)-Schaden beteiligten Einheiten direkt in die entsprechenden Monomere zu spalten (reparieren).^[1,2] Während Bildung und Reparaturmechanismus des CPD-Schadens gut untersucht sind, war bisher wenig über den (6-4)-Schaden bekannt. Insbesondere der Mechanismus der Reparatur durch (6-4)-Photolyasen war lange ungeklärt. Derzeit geht man davon aus, dass das Enzym die Schadstelle mithilfe zweier konservierter Histidinreste im aktiven Zentrum in ein Oxetan-Intermediat überführt (Schema 1), das anschließend, nach erfolgtem Elektronentransfer von einem lichtaktivierten FADH⁻, gespalten wird.^[3,4] Wir präsentieren hier die ersten Raumstrukturen einer (6-4)-Photolyase und stellen auf der Grundlage biochemischer Daten und der Strukturen des mit geschädigter und reparierter DNA komplexierten Enzyms einen neuen Mechanismus vor, der das gespannte Oxetan-Intermediat umgeht.

Für die Strukturstudien wurde Einzelstrang-DNA, die eine einzige TT-Sequenz, flankiert von Guaninbasen, enthält, im Handschuhkasten mit UV-Licht (254 nm) bestrahlt. In derartigen Sequenzen findet die photochemische Reaktion am TpT-Dinucleotid statt.^[5] Die DNA mit dem (6-4)-Schaden wurde durch HPLC isoliert (10 % Ausbeute; siehe Tabelle S1 in den Hintergrundinformationen). Das Auftreten des (6-4)-Schadens wurde durch Totalverdau und anschließende HPLC-MS/MS-Messung der bestrahlten Stränge überprüft (Abbildungen S1 und S2 in den Hintergrundinformationen). Das DNA-Einzelstrang mit dem (6-4)-Schaden wurde mit



Schema 1. Bildung des CPD- und (6-4)-Schadens sowie Reparatur des (6-4)-Photoprodukts (rote Pfeile) über ein mögliches Oxetan-Intermediat mithilfe zweier konservierter Histidinreste und anschließende Spaltung durch lichtinduzierten Elektronentransfer.

dem zugehörigen Gegenstrang hybridisiert, wobei für die Kristallisationsstudien DNA-Doppelstränge mit einem Nucleotid-Überhang verwendet wurden. Die (6-4)-Photolyase aus *D. melanogaster* mit N-terminalem *Strep-Tag II* wurde in *E. coli* überexprimiert. Das Protein wurde zunächst mit DNase I behandelt, um genomische DNA zu entfernen, und nachfolgend über eine *Strep-Tag-II*-Säule und abschließend über eine Heparin-Säule gereinigt.

Die oxidiert vorliegende (6-4)-Photolyase wurde unter Lichtausschluss mit einem 15-meren DNA-Doppelstrang, der einen zentralen Thymin-Thymin-(6-4)-Photoschaden enthielt, cokristallisiert. Die Struktur der (6-4)-Photolyase wurde mit Selenomethionin-markierten Proteinkristallen und der Methode der einfachen anomalen Dispersion (SAD) bestimmt (Tabelle S2 in den Hintergrundinformationen). Es wurden zwei Kristallstrukturen erhalten: das Enzym im Komplex mit dem T(6-4)T-Schaden im aktiven Zentrum bei 2.0 Å Auflösung sowie – nach Reduktion mit Dithionit und Bestrahlung der Kristalle mit Weißlicht – die (6-4)-Photolyase im Komplex mit dem T(6-4)T-Schaden (2.7 Å Auflösung; Abbildung 1d und Abbildung S3 in den Hintergrundinformationen). Im zweiten Fall sieht man ein repariertes TpT im aktiven Zentrum. Wie vermutet, entspricht die Struktur der (6-4)-Photolyase den bereits zuvor veröffentlichten Strukturen der CPD-Photolyasen und der Cryptochrom; dazu gehören eine α/β-Domäne und eine FAD bindende helicale Domäne (Abbildung 1a).^[6–12] Während der Schadenserkenntnis öffnet die (6-4)-Photolyase die DNA um die Schadstelle vollständig, wobei das Dimer um fast 180° aus der DNA in die aktive Tasche des Enzyms gedreht wird. Mehrere Proteinreste stabilisieren die Ausbuchtungsstruktur („bulge“) der DNA (Abbildung 1b). Arg421, ein hoch konservierter Rest in (6-4)-Photolyasen, ragt in den Duplex hinein, stapelt sich über der Guaninbase am 3'-Ende und wechselwirkt mit dem Phosphatrückgrat der neunten (3.1 Å) und zehnten (3.1 Å)

[*] Dr. T. R. M. Barends,^[4] Dr. M. J. Cryle, T. Domratcheva, Prof. Dr. I. Schlichting

Max-Planck-Institut für medizinische Forschung
Department für Biomolekulare Mechanismen
Jahnstraße 29, 69120 Heidelberg (Deutschland)
E-Mail: ilme.schlichting@mpimf-heidelberg.mpg.de

M. J. Maul,^[4] A. F. Glas,^[4] Dr. S. Schneider, Prof. Dr. T. Carell
Centre for Integrative Protein Science, Department Chemie und Biochemie, Ludwig-Maximilians-Universität München
Butenandtstraße 5-13, 81377 München (Deutschland)
Fax: (+49) 892-1807-7756
E-Mail: Thomas.carell@cup.uni-muenchen.de

[†] Diese Autoren haben den gleichen Beitrag zu dieser Arbeit geleistet.

[**] Wir danken J. C. Pieck und U. Hennecke für Klonierungs- und Bestrahlungsexperimente sowie I. Vetter für die Hilfe bezüglich der Kristallographiesoftware und A. Studer sowie C. Chatgilialoglu für hilfreiche Diskussionen. Beugungsdaten wurden an der Swiss Light Source, Strahlengang X10SA (Paul Scherrer Institut, Villigen, Schweiz), aufgenommen. Wir danken dem Dortmund-Heidelberg-Team und der PXII-Belegschaft für ihre Hilfe. Diese Forschung wurde durch die MPG, die DFG (SFB749 und SFB 646), die Volkswagen-Stiftung und den Exzellenzcluster CIPS^M unterstützt.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.200804268> zu finden.

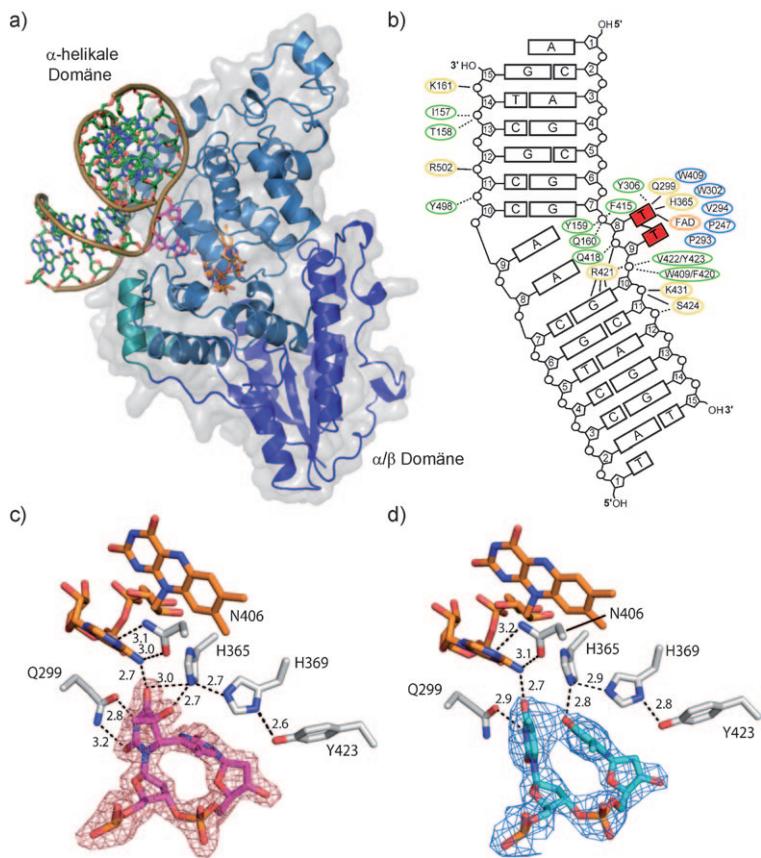


Abbildung 1. a) Struktur des (6-4)-Photolyase-DNA-Komplexes. b) Schematische Darstellung der Protein-DNA-Wechselwirkungen. Ausgeklappte Läsion: rot; direkte Wasserstoffbrücken/elektrostatische Wechselwirkungen: gelb, wasservermittelte Kontakt: grün; Reste, die die hydrophobe Tasche bilden: blau. c) Fo-DFc-Elektronendicharkarte der Schadstelle nach „simulated annealing“-Verfeinerung in CNS, berechnet ohne die Koordinaten der Läsion, vor ((c), DNA in Rosa) und nach der Reparatur ((d), reparierte DNA in Cyan), konturiert bei 3σ . Blau: N, rot: O, orange: C-Atome von FAD, grau: C-Atome wichtiger Aminosäuren im aktiven Zentrum.

Base des geschädigten Stranges. Auf ähnliche Weise stehen Lys431 und Ser424 in Kontakt mit dem Phosphatsauerstoffatom der elften Base des geschädigten Stranges (beide 2.8 Å). Außerdem bilden Lys161 und Arg502 Salzbrücken zum Phosphatrückgrat der Basen 14 und 12 (2.6 und 3.0 Å) des ungeschädigten Stranges in 3'-Richtung des Schadens. Wie bei den CPD-Photolyasen und den Cryptochromen liegt das FAD in einer U-förmigen Konformation vor.^[6-12] Der Adeninrest faltet sich zurück zur Ribitylkette und liegt oberhalb des Flavinsystems. Diese Konformation wird durch Wasserstoffbrücken zwischen der N1-Position und dem NH₂-Rest von Asp406 (3.1 und 3.2 Å) stabilisiert. Die Schadstelle selbst (Abbildung 1c) wechselwirkt mit dem Protein über Watson-Crick-Wasserstoffbrücken zwischen Gln299 und dem Pyrimidin-N3-Atom (2.8 Å) und -O2-Atom (3.2 Å) sowie über eine Wasserstoffbrücke zwischen der Pyrimidin-C5-Hydroxygruppe und His365 (2.8 Å). Dieser Rest ist in (6-4)-Photolyasen hoch konserviert.^[13] Der Schaden ist in einer auffallend hydrophoben Tasche aus Trp302, Trp409, Pro247, Pro293 und Val294 lokalisiert. In dieser Tasche befindet sich nur ein Wassermolekül, das eine Wasserstoffbrücke zur Hy-

droxygruppe in der C5-Position (2.9 Å) des Pyrimidinrestes bildet (Abbildung S4 in den Hintergrundinformationen).

In der Struktur des reparierten TpT (Abbildung 1d) bleibt His365 weiterhin in Kontakt mit dem ursprünglichen C5-Sauerstoffatom, das sich nach der Übertragung des Sauerstoffatoms an Position C4 der 3'-Thyminbase befindet. Abgesehen vom Transfer des Sauerstoffatoms verändert sich die Struktur des aktiven Zentrums überraschenderweise kaum. Besonders interessant ist, dass Glu299 im reparierten Komplex nur eine einzige Wasserstoffbrücke zum TpT-Dinucleotid bildet, was das Zurückdrehen der reparierten Schadstelle in die DNA-Doppelhelix erleichtern könnte. Die Kristallstrukturen deuten darauf hin, dass die eukaryotische (6-4)-Photolyase ähnliche Energie- und Elektronentransfermechanismen wie die bakteriellen Klasse-I-CPD-Photolyasen nutzt. Die Lichtenergie wird vom FADH⁻ absorbiert, wobei der anschließende Elektronentransfer zur Schadstelle über eine kurze Distanz von 2.7 Å ($\text{NH}_2\text{-FADadenin}-\text{O}_4\text{-Läsion}$) erfolgt und vermutlich unter Beteiligung des Adeninrestes von FAD verläuft.

Mithilfe von Mutationsstudien wurde die zentrale Hypothese untersucht, dass die zwei hochkonservierten Histidinreste His365 und His369 in direkter Nachbarschaft zur Schadstelle essenziell für die Katalyse sind. Dazu wurden die beiden Histidinreste sowie Tyr423, das mit His369 wechselwirkt, sukzessive mutiert. In Übereinstimmung mit den Literaturdaten ist die Mutante His365Asn nicht in der Lage, den (6-4)-Schaden zu reparieren;^[13] dagegen weist die Mutante His369Met eine stark verringerte, aber noch detektierbare Restaktivität auf (Abbildung S5 in den Hintergrundinformationen). Die letzte Mutation der Triade, Tyr423Phe, verringert ebenfalls die Reparaturaktivität, jedoch in deutlich geringerem Ausmaß als die His369Met-Substitution. Kristallstrukturen der Mutanten zeigen, dass die Mutationen die Struktur des aktiven Zentrums nicht verändern. Zusammen belegen diese Daten, dass die Triade His365-His369-Tyr423 von zentraler Bedeutung für die volle katalytische Aktivität ist.

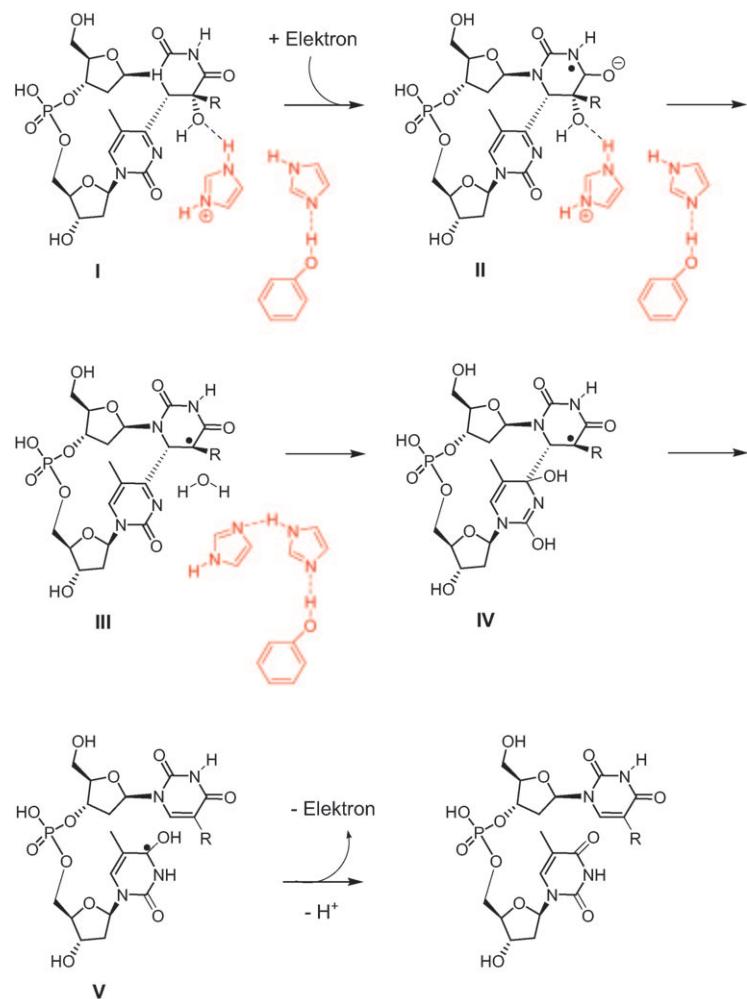
Die Strukturdaten der (6-4)-Photolyase im Komplex mit geschädigter DNA vor und nach der In-situ-Reparatur sind nicht in Einklang mit dem Oxetan-Mechanismus, wie er in Schema 1 dargestellt ist. Würde ein Oxetan-Intermediat gebildet, müsste eine Deprotonierung der C5-OH-Gruppe durch einen der essenziellen Histidinreste erfolgen. Ferner würde man eine Aktivierung der Acylimin-Einheit infolge einer Protonierung durch den zweiten Histidinrest erwarten. Beide Histidinreste liegen jedoch so weit unterhalb der Schadstelle, dass eine Acylimin-Protonierung ausgeschlossen werden kann. Tatsächlich befindet sich die Acylimin-Einheit in einer weitgehend hydrophoben Umgebung (Abbildung 1b). Die Kristallstrukturen belegen ferner, dass die betreffende C5-OH-Gruppe Wasserstoffbrücken zum Was-

sermolekül 276 (2.9 Å) und zu His365 (2.8 Å) eingehet. His365 steht wiederum in Kontakt mit His369 (2.8 Å), das mit der OH-Gruppe von Tyr423 (2.6 Å) wechselwirkt. In einer ENDOR-Studie demonstrierten Weber und Mitarbeiter, dass der Histidinrest nahe der Ribitylkette von FAD (H1') – His365 in unserem Fall – sehr wahrscheinlich protoniert vorliegt, was in Einklang mit den Strukturdaten ist. Damit wird eine Deprotonierung der C5-OH-Gruppe unwahrscheinlich.^[14] Insgesamt ist daher die Bildung eines gespannten Oxetan-Intermediats fragwürdig. Die Relevanz unserer strukturellen Beobachtungen wird durch die Tatsache untermauert, dass das Enzym im Kristall nach Reduktion und Bestrahlung aktiv ist.

Wir gehen momentan davon aus, dass C5-OH nicht vom Enzym deprotoniert wird, sondern im Gegenteil durch Protonierung mithilfe von His365 in eine bessere Abgangsgruppe umgewandelt wird. Der direkte Transfer der C5-OH-Gruppe während der Reparatur wurde mit ¹⁸O-markiertem Wasser in Reparaturexperimenten bestätigt; dabei konnte das vollständige Verbleiben von ¹⁶O in der reparierten DNA nachgewiesen werden. Wir glauben, dass der erste Schritt der Reparatur ein direkter Elektronentransfer vom durch Licht angeregten FAD auf die (6-4)-Schadstelle ist (Schema 2). Dabei würde das Radikal anion **II** erzeugt. Nach der Reduktion könnte durch Protonierung von C5-OH das Intermediat **III** entstehen. Das Wassermolekül müsste im nächsten Schritt, möglicherweise aktiviert durch die Histidinreste, das Acylimin angreifen, wobei das Intermediat **IV** entstünde. Dieses könnte dann über **V**, nach dem Rücktransfer des Elektrons zum FAD und des Protons zum His365, zu den einzelnen reparierten Basen fragmentieren.

Um die Bildung von **III** zu überprüfen, haben wir die direkte Reparatur eines T(6-4)T-Schadens ($R = \text{CH}_3$) mit der eines U(6-4)T-Schadens ($R = \text{H}$) verglichen. Die fehlende Methylgruppe im Fall des U(6-4)T-Schadens sollte die Stabilität von **III** deutlich herabsetzen und den Reparaturprozess verlangsamen. Dies wurde tatsächlich beobachtet: Die Reparatur des U(6-4)T-Schadens ist um den Faktor 4–5 langsamer (Abbildung S6 in den Hintergrundinformationen), was für den vorgeschlagenen Mechanismus in Schema 2 spricht.

Wir berichten hier über die erste Kristallstrukturanalyse einer (6-4)-Photolyase. Die Strukturdaten zeigen das Enzym im Komplex mit einem DNA-Strang, der eine (6-4)-Schadstelle enthält, vor und nach dessen In-situ-Reparatur. Es konnte kein Oxetan-Intermediate beobachtet werden. Des Weiteren wurden während und nach der Reparatur nur sehr geringe Strukturänderungen im aktiven Zentrum festgestellt, was erneut gegen die Bildung eines stabilen Oxetan-Intermediates spricht (Abbildung S3 in den Hintergrundinformationen). Die Bildung eines sehr kurzlebigen Oxetan-Intermediates kann nicht ausgeschlossen werden. Die Lage und der Protonierungsstatus der entscheidenden Histidinreste, das H_2^{18}O -Experiment, das einen direkten Transfer der C5-OH-



Schema 2. Vorgeschlagener Reparaturmechanismus der lichtinduzierten, auf Elektronentransfer beruhenden Spaltung des (6-4)-Schadens. T(6-4)T: $R = \text{CH}_3$, U(6-4)T: $R = \text{H}$.

Gruppe belegt, sowie die geringere Effizienz der Reparatur des U(6-4)T-Schadens liefern starke Hinweise, dass die Reparatur der in Schema 2 dargestellten Reaktionssequenz folgt.

Experimentelles

(6-4)-Photolyase aus *D. melanogaster* wurde in den Vektor pDEST007 kloniert,^[15] in *Escherichia coli* (Rosetta-gami pLysS (DE3); Novagen) überexprimiert und als Fusionsprotein mit N-terminaler Strep-Tag II sowie mit anschließender Heparin-Affinitätschromatographie gereinigt (Abbildung S7 in den Hintergrundinformationen). Die Mutanten wurden mit der „QuickChange mutagenesis“-Methode (Stratagene) erhalten. Die DNA mit (6-4)-Schaden wurde durch 14-stündige Bestrahlung eines Einzelstranges bei 254 nm in einer Belichtungsapparatur unter anaeroben Bedingungen erhalten und anschließend mit HPLC gereinigt. Die Aktivität des Proteins wurde in HPLC-Assays mit DNA untersucht, die einen (6-4)-Schaden enthielt (Abbildung S8 in den Hintergrundinformationen). Hierfür wurde das Enzym/DNA-Gemisch 1 h unter Weißlicht bestrahlt und die Reaktion durch Hitzedenaturierung des Enzyms gestoppt. Die Cokristalle der DNA-gebundenen (6-4)-Photolyase wurden durch die Methode der Dampfdiffusion im hängenden

Tropfen erhalten (Enzym 8.5 mg mL⁻¹, molares Verhältnis DNA/Protein 1:1:1), wobei gleiche Volumina an Reservoir- (0.1M Hepes, pH 7.0, 15–20% PEG 4000 oder 0.1M MIB-Puffer, pH 8.6, 20–25% PEG 1500) und Enzym/DNA-Lösung gemischt wurden (PEG = Polyethylenglycol, MIB = Malonsäure, Imidazol, Borsäure). Alle Kristallisationsexperimente erfolgten unter Rotlicht. Durch Tränken der Kristalle in Gefrierschutzlösung mit Reduktionsmittel und anschließende Bestrahlung unter Weißlicht wurde die Reparatur initiiert. Die Messungen wurden an der Swiss Light Source des Paul Scherrer Instituts durchgeführt und die Strukturen mithilfe von Selenomethionin-markiertem Protein durch einfache anomale Dispersion (SAD) gelöst. Experimentelle Phasen wurden mit SHARP berechnet,^[16,17] und die Struktur wurde mit ARP/wARP^[18] und COOT^[19] erhalten. Strukturverfeinerungen wurden mit REFMAC^[20] und CNS^[21] durchgeführt. Die Atomkoordinaten und Strukturfaktoren (PDB-Einträge 3CVU und 3CVY) sind hinterlegt unter: PDB, Laboratory for Structural Bioinformatics, Rutgers University, New Brunswick, NJ (www.rcsb.org).

Eingegangen am 29. August 2008
Online veröffentlicht am 27. Oktober 2008

Stichwörter: DNA-Reparatur · DNA-Schäden · Enzyme · Photochemie · Strukturaufklärung

-
- [1] A. Sancar, *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 2203–2237.
 - [2] R. P. Sinha, D.-P. Häder, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2002**, *1*, 225–236.
 - [3] S. T. Kim, K. Malhotra, C. A. Smith, J. S. Taylor, A. Sancar, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 8535–8540.
 - [4] X. Zhao, J. Liu, D. S. Hsu, S. Zhao, J. S. Taylor, A. Sancar, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 32580–32590.
 - [5] L. M. Kundu, U. Linne, M. Marahiel, T. Carell, *Chem. Eur. J.* **2004**, *10*, 5697–5705.
 - [6] H. W. Park, S. T. Kim, A. Sancar, J. Deisenhofer, *Science* **1995**, *268*, 1866–1872.
 - [7] T. Tamada, K. Kitadokoro, Y. Higuchi, K. Inaka, A. Yasui, P. E. de Ruiter, A. P. Eker, K. Miki, *Nat. Struct. Biol.* **1997**, *4*, 887–891.
 - [8] R. Kort, H. Komori, S. Adachi, K. Miki, A. Eker, *Acta Crystallogr. Sect. D* **2004**, *60*, 1205–1213.
 - [9] A. Mees, T. Klar, P. Gnau, U. Hennecke, A. P. Eker, T. Carell, L. O. Essen, *Science* **2004**, *306*, 1789–1793.
 - [10] Y. Huang, R. Baxter, B. S. Smith, C. L. Partch, C. L. Colbert, J. Deisenhofer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 17701–17706.
 - [11] T. Klar, R. Pokorny, J. Moldt, A. Batschauer, L. O. Essen, *J. Mol. Biol.* **2007**, *366*, 954–964.
 - [12] M. Fujihashi, N. Numoto, Y. Kobayashi, A. Mizushima, M. Tsujimura, A. Nakamura, Y. Kawarabayasi, K. Miki, *J. Mol. Biol.* **2007**, *365*, 903–910.
 - [13] K. Hitomi, H. Nakamura, S. T. Kim, T. Mizukoshi, T. Ishikawa, S. Iwai, T. Todo, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 10103–10109.
 - [14] E. Schleicher, K. Hitomi, C. W. Kay, E. D. Getzoff, T. Todo, S. Weber, *J. Biol. Chem.* **2006**, *282*, 4738–4747.
 - [15] M. Ober, H. Müller, C. Pieck, J. Gierlich, T. Carell, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 18143–18149.
 - [16] C. Vonrhein, E. Blanc, P. Roversi, G. Bricogne, *Methods Mol. Biol.* **2007**, *364*, 215–230.
 - [17] E. de La Fortelle, G. Bricogne, *Methods Enzymol.* **1997**, *276*, 472–494.
 - [18] A. Perrakis, R. Morris, V. S. Lamzin, *Nat. Struct. Biol.* **1999**, *6*, 458–463.
 - [19] P. Emsley, K. Cowtan, *Acta Crystallogr. Sect. D* **2004**, *60*, 2126–2132.
 - [20] G. N. Murshudov, A. A. Vagin, E. J. Dodson, *Acta Crystallogr. Sect. D* **1997**, *53*, 240–255.
 - [21] A. T. Brünger, P. D. Adams, G. M. Clore, W. L. DeLano, P. Gros, R. W. Grosse-Kunstleve, J. S. Jiang, J. Kuszewski, M. Nilges, N. S. Pannu, R. J. Read, L. M. Rice, T. Simonson, G. L. Warren, *Acta Crystallogr. Sect. D* **1998**, *54*, 905–921.