

# Direkte Detektion eines lichtinduzierten Radikalpaars in einem Cryptochrom-Blaulichtrezeptor\*\*

Till Biskup, Erik Schleicher, Asako Okafuji, Gerhard Link, Kenichi Hitomi, Elizabeth D. Getzoff und Stefan Weber\*

Proteine der Photolyase/Cryptochrom-Familie zeichnen sich durch eine Vielzahl von Gemeinsamkeiten aus. Hierbei sind insbesondere ihre sehr ähnliche dreidimensionale Struktur, die hohe Aminosäuresequenzhomologie und der gemeinsame redoxaktive Flavinadenindinucleotid-Cofaktor (FAD) zu nennen.<sup>[1]</sup> Trotz dieser Gemeinsamkeiten sind sie an unterschiedlichen physiologischen Prozessen beteiligt: Unter anderem vermögen sie durch UV-Licht geschädigte DNA zu reparieren, sind integraler Bestandteil bei der Regulation zirkadianer Rhythmen und steuern das durch blaues Licht angetriebene Pflanzenwachstum.<sup>[1–3]</sup> All diese Prozesse eint die notwendige Aktivierung durch blaues oder UV-A-Licht. Mitglieder der Photolyase/Cryptochrom-Familie wurden in den verschiedensten Organismen, von Bakterien über Pflanzen bis hin zu Tieren und Menschen gefunden.<sup>[1]</sup> Innerhalb der Proteinfamilie gibt es einen phylogenetischen Cluster von Cryptochrom-ähnlichen Genen, die ursprünglich in *Arabidopsis* und *Synechocystis* identifiziert wurden, sich aber von den zuvor charakterisierten pflanzlichen (z.B. *Arabidopsis* HY4) und tierischen (z.B. aus *Drosophila* und *Homo sapiens*) Cryptochromen unterscheiden, wobei sie mehr den zuletzt genannten ähneln.<sup>[4]</sup> Bemerkenswerterweise wurden Gene dieses neuen Clusters (Cry-DASH) nunmehr in allen Bereichen der belebten Natur entdeckt.<sup>[5]</sup> Während zahlreiche biologische Funktionen von Cryptochromen diskutiert werden, ist es nun prinzipiell möglich, deren komplexe Proteinchemie mithilfe der Cry-DASH-Vertreter zu entschlüsseln, da stabile, rekombinant exprimierte Cry-DASH-Proteine aus verschiedenen Spezies zur Verfügung stehen. Die Er-

gebnisse jüngster Experimente legen nahe, dass Cry-DASH-Proteine ebenso als Regulatoren der Transkription<sup>[4,5]</sup> wie auch als DNA-Reparaturenzyme für UV-geschädigte Einzelstrang-DNA<sup>[6]</sup> fungieren können. Andere experimentelle Befunde deuten auf ihre Beteiligung als Signalgeber bei zirkadianen Rhythmen hin.<sup>[7,8]</sup>

Man nimmt an, dass Redoxreaktionen eine Schlüsselrolle bei der lichtgetriebenen Aktivität der Cryptochrome spielen.<sup>[9,10]</sup> Ergebnisse aus In-vitro- und In-vivo-Experimenten lassen darauf schließen, dass der Redoxzustand des FAD-Cofaktors von der vollständig oxidierten Form (FAD<sup>ox</sup>) im Grundzustand zur Radikalform im Signalzustand wechselt.<sup>[11,12]</sup> Diese Befunde sind in Einklang mit der Redoxaktivität der Photolyasen,<sup>[13]</sup> in denen ein lichtinduzierter Elektronentransfer ausgehend vom FAD<sup>ox</sup>-Zustand ein Radikalpaar erzeugt, das aus einem FAD-Radikal einerseits und einem Tyrosin- oder einem Tryptophan-Radikal andererseits besteht und mit zeitauf lösender Elektronenspinresonanz-(EPR)-Spektroskopie direkt beobachtet werden kann.<sup>[14–16]</sup>

Durch Elektronentransfer erzeugte Radikalpaare sind für eine große und taxonomisch vielfältige Gruppe von Organismen als essenzielle Elemente eines möglichen Kompasses für die Orientierung im Erdmagnetfeld vorgeschlagen worden.<sup>[17–19]</sup> In den Organismen, in denen eine Lichtabhängigkeit dieses Prozesses nachgewiesen wurde,<sup>[20]</sup> kommt ein Sensor, der auf Magnetfeld-empfindlichen Radikalpaarreaktionen beruht, prinzipiell in Betracht. Allerdings können auch andere Mechanismen der Magnetfeldperzeption, z.B. mithilfe von Eisen enthaltenden Partikeln, nicht ausgeschlossen werden.<sup>[21]</sup> Sollten Cryptochrome wegen ihrer Ähnlichkeit zu Photolyasen nach Anregung mit blauem Licht Radikalpaare erzeugen können, so kämen sie als Photorezeptoren für die lichtabhängige Magnetfeldperzeption in lebenden Organismen in Betracht.<sup>[18,22]</sup> Gestützt wird diese Hypothese durch die Tatsache, dass Cryptochrome kürzlich in der Retina von Zugvögeln nachgewiesen wurden.<sup>[23]</sup>

Grundsätzlich kann ein Kompass auf der Grundlage von Radikalpaar-Photochemie verwirklicht werden, wenn 1) der Übergang zwischen dem Singulett- und dem Tripletztzustand des Radikalpaars kohärent erfolgt, 2) dieser Übergang durch die Zeeman-Wechselwirkungen der beiden Elektronenspins moduliert werden kann, und 3) ausreichend kleine dipolare Wechselwirkungen und Austauschwechselwirkungen zwischen den Radikalen im Radikalpaar herrschen, sodass die Empfindlichkeit des Magnetfeldsensors gegenüber kleinen Magnetfeldänderungen nicht zu gering wird. Prinzipiell könnten spinkorrelierte Radikalpaare auf Flavinbasis diese Voraussetzungen erfüllen.<sup>[18,24,25]</sup> Folglich ist es für das Verständnis von Cryptochromen notwendig, mögliche Radikal-

[\*] Dr. E. Schleicher, A. Okafuji, Dr. G. Link, Prof. Dr. S. Weber  
Institut für Physikalische Chemie, Fakultät für Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg  
Albertstraße 21, 79104 Freiburg (Deutschland)  
Fax: (+49) 761-203-6222  
E-Mail: Stefan.Weber@physchem.uni-freiburg.de

T. Biskup  
Fachbereich Physik, Freie Universität Berlin (Deutschland)  
Dr. K. Hitomi, Prof. E. D. Getzoff  
Department of Molecular Biology and the Skaggs Institute for Chemical Biology  
The Scripps Research Institute, La Jolla, CA (USA)

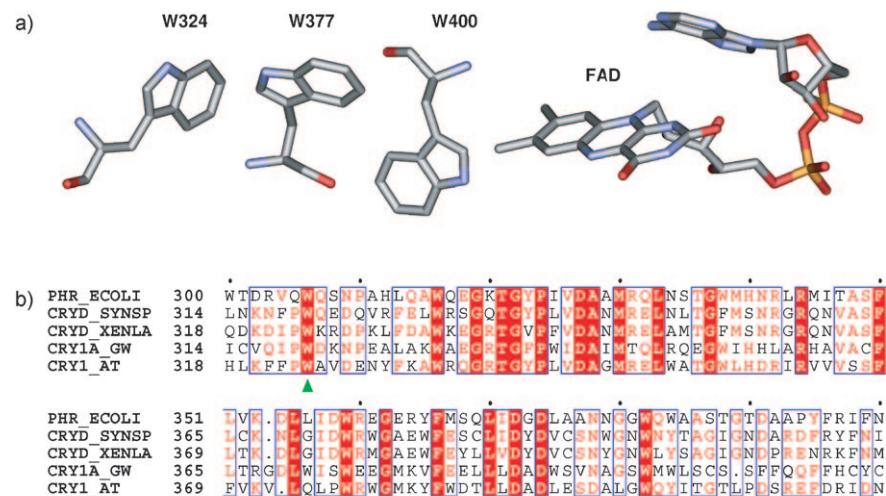
[\*\*] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (SFB 498, Projekt A2 und FOR-526), den National Institutes of Health (Grant R01 GM37684 für E.D.G.) und das Skaggs Institute of Chemical Biology (Stipendium an K.H.) unterstützt. Wir danken J. R. Norris (University of Chicago) und R. Bittl (Freie Universität Berlin) für hilfreiche Diskussionen.

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.200803102> zu finden.

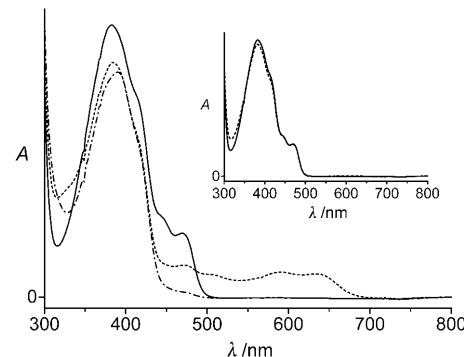
paarzustände zunächst einmal direkt nachzuweisen und, falls vorhanden, deren Ursprung näher zu charakterisieren um deren Eignung zur Magnetfeldperzeption zu beurteilen. Besondere Bedeutung kommt dabei der Bestimmung der magnetischen Wechselwirkungsparameter im Radikalpaar und der Charakterisierung der Zerfallskinetik des Radikalpaarzustands zu. Zu diesem Zweck untersuchen wir hier Cry-DASH-Proteine von *Xenopus laevis* (Afrikanischer Krallenfrosch), die im weiteren Verlauf als *Xl*Cry-DASH abgekürzt werden.

Ein gemeinsames Motiv aller strukturell charakterisierten Proteine der Photolyase/Cryptochrom-Familie ist eine konservierte Kette dreier Tryptophanreste, die als Elektronentransferpfad von der Proteinoberfläche zum FAD-Cofaktor hin vorgeschlagen wurde.<sup>[26,27]</sup> Durch Vergleich der Aminosäuresequenzen von *Xl*Cry-DASH und Photolyase/Cryptochrom-Proteinen mit bekannter Struktur<sup>[4,26,28–30]</sup> gelang es uns, die mutmaßliche Tryptophantriade in *Xl*Cry-DASH darzustellen (Abbildung 1). In der zu *Xl*Cry-DASH verwandten DNA-Photolyase aus *Escherichia coli* wird der FAD-Cofaktor zunächst durch einen lichtinduzierten Elektronentransfer von einem benachbarten Tryptophan reduziert.<sup>[31]</sup> Der resultierende Tryptophan-Radikalzustand wird daraufhin schrittweise auf den terminalen Tryptophanrest (W306) übertragen.<sup>[13,32]</sup> Ausgehend von einem ursprünglich vollständig oxidierten FAD wird durch den Elektronentransfer ein kurzelbiges Radikalpaar auf Flavinbasis erzeugt.<sup>[14–16]</sup> In der Folge führen eine Protonenabgabe durch das Tryptophanyl-Radikalkation und eine Protonenaufnahme durch das Flavin-Radikal anion zu einem Paar von Neutralradikalen [W306<sup>·+</sup>...FADH<sup>·</sup>]. Weil das Strukturmotiv hoch konserviert ist, gehen wir von einem vergleichbaren Mechanismus für den Elektronentransfer in DASH-Cryptochromen aus.

Die zeitauflösende EPR-Spektroskopie (TREPR) ermöglicht dank ihrer hohen Zeitauflösung (bis 10 ns) eine direkte Beobachtung kurzlebiger, durch einen Laserpuls erzeugter Radikalpaare in Echtzeit.<sup>[33]</sup> Wir vergleichen hier die TREPR-Signale des Wildtyp des *Xl*Cry-DASH-Proteins mit denen einer Mutante (W324F), bei der der terminale Tryptophanrest der mutmaßlichen Tryptophankette gegen einen Phenylalaninrest ausgetauscht wurde (Abbildung 1). Grundsätzlich kann der Isoalloxazinrest von FAD in Cry-DASH-Proteinen drei verschiedene Redoxzustände annehmen: vollständig reduziert ( $\text{FADH}^{\cdot}$ ), um ein Elektron oxidiert ( $\text{FAD}^{\cdot+}$  oder  $\text{FADH}^{\cdot+}$ ) oder vollständig oxidiert ( $\text{FAD}^{\text{ox}}$ ). Jeder dieser Zustände lässt sich anhand seines charakteristischen optischen Absorptionsspektrums identifizieren (Abbildung 2). Die auffällige Absorption nahe 380 nm stammt



**Abbildung 1.** Die konservierte Tryptophantriade von *Xl*Cry-DASH. a) Ausschnitt aus dem dreidimensionalen Proteinstruktur-Homologiemodell aus der SWISS-MODEL-Datenbank (UniProt ID: CRYD\_XENLA). b) Vergleich der Aminosäuresequenzen von fünf Proteinen der Photolyase/Cryptochrom-Familie. Die konservierten Tryptophanreste der mutmaßlichen Elektronentransferkette in DNA-Photolyase aus *E. coli* (PHR\_ECOLI),<sup>[26]</sup> Cry-DASH aus *Synechocystis* sp. (CRYD\_SYNSP),<sup>[4]</sup> *Xl*Cry-DASH (CRYD\_XENLA), Cry-1a der Gartengrasmücke (*Sylvia borin*) (CRY1a\_GW) und Cry-1 von Ackerschmalwand (*Arabidopsis thaliana*) (CRY1\_AT)<sup>[28]</sup> sind mit grünen Dreiecken markiert. Spalten mit einer hohen Ähnlichkeit (>0.7) sind mit einem blauen Rand umgeben. Konservierte Aminosäurereste sind rot auf weißem Hintergrund dargestellt, strikt konservierte Aminosäurereste sind weiß auf rotem Hintergrund dargestellt. Der Vergleich wurde mit den Programmen Mult-Alin erstellt und mit ESPript 2.2 bearbeitet.

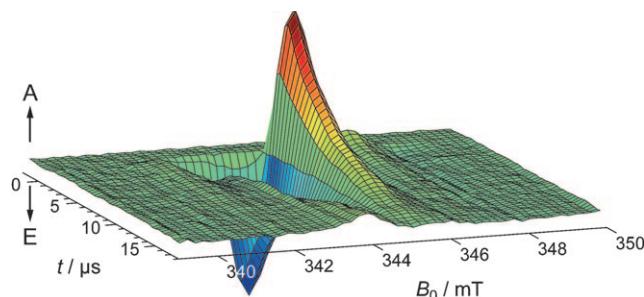


**Abbildung 2.** Optische Absorptionsspektren von *Xl*Cry-DASH, aufgenommen bei 273 K, zeigen den FAD-Cofaktor in unterschiedlichen Oxidationszuständen:  $\text{FAD}^{\text{ox}}$  (—),  $\text{FADH}^{\cdot}$  (---) und  $\text{FADH}^{\cdot+}$  (—·—). Einschub: *Xl*Cry-DASH mit dem  $\text{FAD}^{\text{ox}}$ -Cofaktor vor Belichtung (—) und nach 12 Stunden Blaulichtbestrahlung durch Luftsauerstoff reoxidiert (---). Das Protein bleibt bezüglich seiner Cofaktor-Zusammensetzung auch während der langen Belichtung stabil.

vom zweiten Chromophor, einem Methenyltetrahydrofolyl-Polyglutamat.<sup>[5]</sup> *Xl*Cry-DASH, das nach der Proteinreinigung zunächst als Mischung aller drei Redoxzustände vorliegt, kann durch Zugabe von Kaliumhexacyanoferrat(III) homogen mit vollständig oxidiertem FAD-Cofaktor ( $\text{FAD}^{\text{ox}}$ ) präpariert werden.<sup>[14]</sup> Aus zwei Gründen wurde  $\text{FAD}^{\text{ox}}$  als Ausgangszustand für die Untersuchung von Photoreaktionen gewählt: Zum einen hat sich  $\text{FAD}^{\text{ox}}$  als der physiologisch relevante Dunkelzustand in pflanzlichen und tierischen Cryptochromen herausgestellt,<sup>[34–36]</sup> und zum anderen können

ausgehend vom  $\text{FAD}^{\text{ox}}$ -Zustand durch photoinduzierten Elektronentransfer Radikalpaarintermediate erzeugt werden.<sup>[14–16]</sup>

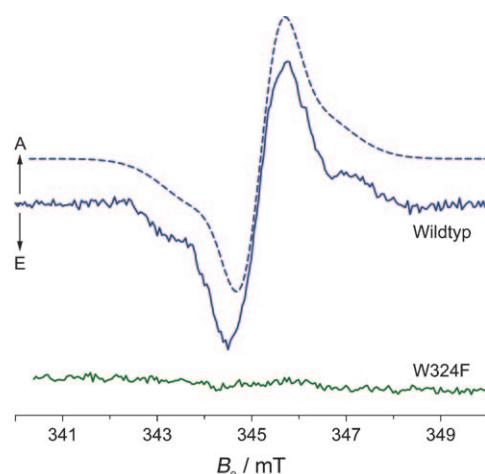
In Abbildung 3 ist die Amplitude des TREPR-Signals für den Wildtyp von *X/Cry*-DASH bei einer physiologisch relevanten Temperatur (274 K) als Funktion des Magnetfelds  $B_0$



**Abbildung 3.** Kompletter TREPR-Datensatz des Wildtyps von *X/Cry*-DASH, aufgenommen bei 274 K. Um mögliche Veränderungen in der Form des TREPR-Signals durch Zersetzung der Probe zu kontrollieren, wurden die Spektren zuerst von niedrigem zu hohem Magnetfeld und anschließend durch Messung in umgekehrter Richtung aufgenommen. Jedes Zeitprofil ist die Mittelung von 120 Einzelmessungen, die mit einer Laserpulsreihenfolge von 1.25 Hz bei einer Mikrowellenfrequenz von 9.68 GHz, einer Mikrowellenleistung von 2 mW und einer Detektionsbandbreite von 100 MHz aufgenommen wurden. A: verstärkte Absorption; E: Emission.

und der Zeit  $t$  nach der Anregung mit einem Laserpuls ( $\lambda = 460 \text{ nm}$ ) dreidimensional dargestellt. Im Unterschied zur herkömmlichen EPR-Spektroskopie mit kontinuierlicher Mikrowellenanregung wird in der TREPR keine Magnetfeldmodulation verwendet, um die Zeitauflösung des Experiments nicht durch die Modulationsfrequenz zu begrenzen. Die mit hoher Zeitauflösung detektierten positiven und negativen Signale entsprechen hier verstärkt absorptiver (A) bzw. emissiver (E) Elektronenspinpolarisation der EPR-Übergänge, die durch die selektive Besetzung der Radikalpaar-Energieniveaus hervorgerufen wird.<sup>[37,38]</sup>

Nach Lichtanregung konnten wir durch TREPR-Spektroskopie am Wildtyp von *X/Cry*-DASH eine spinpolarisierte paramagnetische Spezies detektieren, die wir aufgrund der Linienform und der geringen Breite einem Radikalpaar zuordnen. (Das TREPR-Signal eines unter vergleichbaren Bedingungen aufgenommenen spinpolarisierten Flavin-Triplettzustands wäre infolge der großen Spin-Spin-Wechselwirkungen zwischen den ungepaarten Elektronen in der Triplettkonfiguration über 150 mT breit.<sup>[39]</sup>) Die zeitliche Entwicklung des TREPR-Signals zeigt, dass der detektierte Radikalpaarzustand eine Lebensdauer von mindestens 6  $\mu\text{s}$  hat. Eine genaue Bestimmung ist nicht möglich, da das Abklingen des EPR-Signals im Wesentlichen durch die Relaxation der Elektronenspinpolarisation in die Boltzmann-Gleichgewichtsbesetzung bestimmt ist. Das 500 ns nach der optischen Anregung aufgenommene TREPR-Spektrum von *X/Cry*-DASH (Abbildung 4) ähnelt jenen, die kürzlich für lichtinduzierte kurzlebige Radikalpaare (bestehend aus Flavin- und Aminosäure-Radikalen) bei der FAD-Photoreduktion von Photolyasen erhalten wurden.<sup>[15,16]</sup> In der DNA-



**Abbildung 4.** TREPR-Spektren des Wildtyps von *X/Cry*-DASH (durchgezogene blaue Kurve) und der Mutante W324F (durchgezogene grüne Kurve), aufgenommen 500 ns nach Laserpulsanregung. Die experimentellen Parameter sind dieselben wie in Abbildung 3. Die gestrichelte Kurve zeigt ein simuliertes Spektrum des Wildtypproteins. Simulationsparameter:  $\mathbf{g}_{\text{FAD}} = (2.00431; 2.00360; 2.00217)$ ;  $\mathbf{g}_{\text{Trp}} = (2.00370; 2.00285; 2.00246)$ ;  $\Omega(\mathbf{g}_{\text{FAD}} \cdots \mathbf{g}_{\text{Trp}}) = (126.5^\circ; 76.5^\circ; 246.5^\circ)$ ;  $D = -0.36 \text{ mT}$ ;  $E = 0$ ;  $\Omega(\mathbf{g}_{\text{FAD}} \cdots \mathbf{D}) = (0^\circ; 109.9^\circ; 110.5^\circ)$ ;  $J = +0.24 \text{ mT}$ .

Photolyase von *E. coli* wurde das beobachtete TREPR-Signal dem Radikalpaarzustand [ $\text{W306}^{\cdot\cdot\cdot}\text{FADH}^{\cdot}$ ] zugeordnet, wobei W306 der terminale Tryptophanrest der konservierten Triade ist.<sup>[14,32]</sup> Um die Herkunft des Radikalpaarsignals in *X/Cry*-DASH zu klären, haben wir eine Mutante untersucht, in der der terminale Tryptophanrest W324, der W306 in der DNA-Photolyase von *E. coli* entspricht, durch Phenylalanin ersetzt wurde (W324F, Abbildung 1). Unter identischen experimentellen Bedingungen zeigt W324F-*X/Cry*-DASH aber überhaupt kein TREPR-Signal (Abbildung 4). Daraus schließen wir, dass W324 entweder der letzte Elektronendonator beim Elektronentransfer zum Flavin ist oder zumindest einen essenziellen Bestandteil des Elektronentransferpfads von der Proteinoberfläche zum FAD in Cry-DASH darstellt.

Weitere Informationen über den Radikalpaarzustand [ $\text{W324}^{\cdot\cdot\cdot}\text{FADH}^{\cdot}$ ] in *X/Cry*-DASH liefern Spektrensimulationen, die wir auf der Grundlage des Modells spinkorrelierter gekoppelter Radikalpaare<sup>[37,38]</sup> (CCRP-Modell) erstellt haben. (Das verwendete Simulationsprogramm ist in den Hintergrundinformationen beschrieben.) Die Rechnungen wurden mit publizierten  $\mathbf{g}$ -Tensor-Parametern für FAD- und Tryptophan-Neutralradikale durchgeführt.<sup>[40,41]</sup> Die relativen Orientierungen der Hauptachsen beider  $\mathbf{g}$ -Tensoren und des Dipol-Dipol-Kopplungstensors wurden dem Homologiemodell (siehe Abbildung 1) entnommen und bei der Spektrenanpassung konstant gehalten. Die Stärke der dipolaren Kopplung ( $D = -0.36 \text{ mT}$ ,  $E = 0$ ) zwischen  $\text{FADH}^{\cdot}$  und  $\text{W324}^{\cdot}$  wurde auf Grundlage der Punktdipolnäherung festgelegt [ $D(r)/\text{mT} = -2.78/(r/\text{nm})^3$ ]. Dabei gingen wir von einem Abstand  $r = 2.0 \text{ nm}$  zwischen den beiden Radikalen aus (zwischen den Punkten höchster ungepaarter Elektronenspindichte: C(4a) in  $\text{FADH}^{\cdot}$  und C(3) in  $\text{W324}^{\cdot}$ ). Charakteristische inhomogene Gauß-Linienbreiten für  $\text{FADH}^{\cdot}$  und  $\text{W324}^{\cdot}$  wurden bei der Berechnung der Radikalpaarspektren

berücksichtigt. Wir haben unsere Simulationen auf TREPR-Spektren beschränkt, die direkt nach der Laserpulsanregung aufgenommen wurden, um spektrale Einflüsse durch anisotrope Spinrelaxation zu vermeiden.

Die gute Übereinstimmung zwischen berechneten und experimentellen TREPR-Spektren (Abbildung 4) stützt unsere Hypothese, dass W324 der terminale Elektronendonator für FAD ist. Eine zufriedenstellende Simulation des E/E/A/A-Polarisationsmusters wurde aber nur unter den folgenden zwei Annahmen erhalten: 1) In Einklang mit jüngsten Ergebnissen aus zeitauf lösenden optischen Absorptionsmessungen<sup>[42]</sup> wird ein reiner elektronischer Singulettzustand als Radikalpaarvorstufe angenommen, und 2) die Austauschwechselwirkung zwischen den Radikalen im Radikalpaar, die durch den Parameter  $J$  quantifiziert wird, darf nicht Null sein und muss einen positiven Wert annehmen. Letzteres bedeutet, dass die Triplettkonfiguration des Radikalpaars energetisch um  $2J$  gegenüber der Singulettkonfiguration begünstigt ist. Für  $J$  wird allgemein ein exponentieller Abfall mit dem Abstand  $r$  zwischen den Radikalen angenommen [ $J(r) = J_0 \exp(-\beta r)$ ].<sup>[43]</sup> Für Elektronentransferreaktionen in Proteinen wird dabei ein  $\beta$ -Wert von  $(14 \pm 2) \text{ nm}^{-1}$  eingesetzt.<sup>[44]</sup> In unseren Simulationen erhielten wir die beste Übereinstimmung mit  $J = +0.24 \text{ mT}$ . Zum Vergleich: Für das lichtinduzierte primäre Radikalpaar in einem photosynthetischen Reaktionszentrum wurde ein Wert von  $|J| = 0.9 \text{ mT}$  publiziert.<sup>[45]</sup> Dabei muss allerdings berücksichtigt werden, dass der Abstand dieses Radikalpaares mit  $r = 1.8 \text{ nm}$  etwas geringer ist als der zwischen W324<sup>·</sup> und FADH<sup>·</sup> im *X/Cry*-DASH-Radikalpaar. Skaliert man auf denselben Radikalabstand, so erhält man für  $J$  größerenordnungsmäßig ähnliche Werte, wobei die Austauschwechselwirkung im Cryptochrom etwas stärker zu sein scheint. Nimmt man an, dass die überbrückenden aromatischen Aminosäuren W377 und W400 in *X/Cry*-DASH für eine effiziente  $J$ -Kopplung zwischen FADH<sup>·</sup> und W324<sup>·</sup> förderlich sein könnten, so erscheint unser Wert plausibel, wenngleich als Unsicherheit ein Faktor zwischen 2 und 4 angenommen werden muss. Diese Fehlergrenze ist in Ungenauigkeiten bezüglich der verwendeten Modellgeometrie und möglichen Umorientierungen des FAD relativ zu W324 im Radikalpaarzustand (im Vergleich zum Grundzustand) begründet. Die großen Radikal-Radikal-Wechselwirkungen in *X/Cry*-DASH scheinen auf den ersten Blick einen ausreichend starken Einfluss von kleinen Schwankungen der Magnetfeldintensität (in der Größenordnung des Erdmagnetfeldes) auf den Singulett-Tripletts-Übergang von [W324<sup>·</sup>...FADH<sup>·</sup>] auszuschließen. Allerdings könnten sich die Austauschwechselwirkung und die dipolare Wechselwirkung aber auch teilweise gegenseitig aufheben, wie kürzlich von Efimova und Hore vorgeschlagen wurde.<sup>[25]</sup> In diesem Fall könnte das Erdmagnetfeld das Verhältnis von Singulett- und Tripletts-Radikalpaaren im Cryptochrom beeinflussen und diesem so ermöglichen, als Magnetorezeptor im Vogelkompass zu fungieren.

Zusammenfassend konnten wir zeigen, dass sich in *Cry*-DASH-Proteinen nach Blaulichtanregung spontan Radikalpaare bilden. Die Spinkorrelation dieser Radikalpaare manifestiert sich in elektronenspinpolarisierten EPR-Übergängen. Unsere Beobachtungen sprechen für eine mögliche

biologische Relevanz dieser lichtinduzierten Elektronentransferreaktion bei den Proteinen der Cryptochrom/Photolyase-Familie. Des weiteren haben wir die erste Simulation von TREPR-Spektren eines spinkorrelierten Radikalpaares auf Flavinbasis präsentiert. Anhand dieser Rechnungen lässt sich die Stärke der Austauschwechselwirkung zwischen den Radikalen im Radikalpaar bestimmen, die allein auf der Grundlage der dreidimensionalen Proteinstruktur schwierig abzuschätzen wäre. Unsere Simulationen legen nahe, dass in *Cry*-DASH von *Xenopus laevis* 1) die Bildung des Radikalpaares aus einer Vorstufe mit Singulettzustand erfolgt, und dass 2) die Austauschwechselwirkung nicht vernachlässigt werden darf, wenn Radikalpaare vom Typ [W324<sup>·</sup>...FADH<sup>·</sup>] als mögliche Spinzustände in einem Radikalpaarmechanismus der Erdmagnetfeldperzeption betrachtet werden. Die hier vorgestellten Studien zeigen, dass die in Cryptochromen durch Licht erzeugten Radikalpaare einige der grundlegenden Eigenschaften besitzen, die für einen Magnetkompass erforderlich sind.

## Experimentelles

*X/Cry*-DASH wurde wie zuvor beschrieben im Dunklen exprimiert und aufgereinigt.<sup>[5]</sup> Für die TREPR-Messungen wurde das Protein in einen Puffer (0.3 M NaCl, 0.1 M Tris-HCl, pH 8.0, 30–50% (v/v) Glycerin) mit 5 mM Kaliumhexacyanoferrat(III), K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>], überführt und über Nacht inkubiert, um die Homogenität des Oxidationszustands von FAD sicherzustellen. Nach Entfernen von überschüssigem K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] durch Ultrafiltration wurden die Proben mit 5 mM K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] und 35% (v/v) Glycerin versetzt und TREPRspektroskopisch untersucht, oder für UV/Vis-Messungen mit 10 mM EDTA versetzt und nachfolgend bei 274 K mit blauem Licht bestrahlt (Bandfilter von 430–470 nm; Halolux 100HL, Streppel, Wermelskirchen-Tente, Deutschland), um reduzierte Zustände des FAD zu erzeugen. Die Konzentrationen der einzelnen FAD-Redoxzustände wurden auf der Grundlage von publizierten Absorptionskoeffizienten (M. S. Jorns, B. Wang, S. P. Jordan, L. P. Chanderkar, *Biochemistry* **1990**, 29, 552) unter Verwendung eines Shimadzu-UV-1601PC-Spektralphotometers abgeschätzt.

Die zeitaufgelöste Detektion der nach Anregung mit einem Laserpuls auftretenden EPR-Signale erfolgte mit einem selbstgebauten Spektrometer.<sup>[16]</sup> Für die gepulste optische Anregung diente ein Nd:YAG-Laser (Spectra Physics GCR-11), der einen optischen parametrischen Oszillatoren (Opta BBO-355-vis/IR, Opta GmbH, Bensheim, Deutschland) pumpte (Wellenlänge 460 nm; Pulsdauer 6 ns; Pulsennergie 4 mJ).

Eingegangen am 27. Juni 2008,  
veränderte Fassung am 13. August 2008  
Online veröffentlicht am 4. Dezember 2008

**Stichwörter:** Elektronentransfer · EPR-Spektroskopie · Flavine · Radikalpaare · Singulett-Tripletts-Übergänge

- [1] C. Lin, T. Todo, *Genome Biol.* **2005**, 6, 220.
- [2] A. R. Cashmore, *Cell* **2003**, 114, 537.
- [3] A. Losi, *Photochem. Photobiol.* **2007**, 83, 1283.
- [4] R. Brudler, K. Hitomi, H. Daiyasu, H. Toh, K.-i. Kucho, M. Ishiura, M. Kanehisa, V. A. Roberts, T. Todo, J. A. Tainer, E. D. Getzoff, *Mol. Cell* **2003**, 11, 59.
- [5] H. Daiyasu, T. Ishikawa, K.-i. Kuma, S. Iwai, T. Todo, H. Toh, *Genes Cells* **2004**, 9, 479.

- [6] C. P. Selby, A. Sancar, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 17696.
- [7] P. Facella, L. Lopez, A. Chiappetta, M. B. Bitonti, G. Giuliano, G. Perrotta, *FEBS Lett.* **2006**, *580*, 4618.
- [8] S. A. Brunelle, E. S. Hazard, E. E. Sotka, F. M. Van Dolah, *J. Phycol.* **2007**, *43*, 509.
- [9] O. Froy, D. C. Chang, S. M. Reppert, *Curr. Biol.* **2002**, *12*, 147.
- [10] B. Giovani, M. Byrdin, M. Ahmad, K. Brettel, *Nat. Struct. Biol.* **2003**, *10*, 489.
- [11] M. Merrow, T. Roenneberg, *Cell* **2001**, *106*, 141.
- [12] R. Banerjee, E. Schleicher, S. Meier, R. Muñoz Viana, R. Pokorný, M. Ahmad, R. Bittl, A. Batschauer, *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 14916.
- [13] C. Aubert, M. H. Vos, P. Mathis, A. P. M. Eker, K. Brettel, *Nature* **2000**, *405*, 586.
- [14] Y. M. Gindt, E. Vollenbroek, K. Westphal, H. Sackett, A. Sancar, G. T. Babcock, *Biochemistry* **1999**, *38*, 3857.
- [15] S. Weber, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* **2005**, *1707*, 1.
- [16] S. Weber, C. W. M. Kay, H. Mögling, K. Möbius, K. Hitomi, T. Todo, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 1319.
- [17] K. Schulten, *Festkörperprobleme*, Vol. 22 (Hrsg.: J. Treusch), Vieweg, Braunschweig, **1982**, S. 61.
- [18] T. Ritz, S. Adem, K. Schulten, *Biophys. J.* **2000**, *78*, 707.
- [19] T. Ritz, P. Thalau, J. B. Phillips, R. Wiltschko, W. Wiltschko, *Nature* **2004**, *429*, 177.
- [20] W. Wiltschko, R. Wiltschko, *J. Comp. Physiol. A* **2005**, *191*, 675.
- [21] J. L. Kirschvink, J. L. Gould, *Biosystems* **1981**, *13*, 181.
- [22] M. Liedvogel, K. Maeda, K. Henbest, E. Schleicher, T. Simon, C. R. Timmel, P. J. Hore, H. Mouritsen, *PLoS ONE* **2007**, *2*, e1106.
- [23] H. Mouritsen, U. Janssen-Bienhold, M. Liedvogel, G. Feenders, J. Stalleicken, P. Dirks, R. Weiler, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 14294.
- [24] I. A. Solov'yov, D. E. Chandler, K. Schulten, *Biophys. J.* **2007**, *92*, 2711.
- [25] O. Efimova, P. J. Hore, *Biophys. J.* **2008**, *94*, 1565.
- [26] H.-W. Park, S.-T. Kim, A. Sancar, J. Deisenhofer, *Science* **1995**, *268*, 1866.
- [27] M. Byrdin, V. Sartor, A. P. M. Eker, M. H. Vos, C. Aubert, K. Brettel, P. Mathis, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* **2004**, *1655*, 64.
- [28] C. A. Brautigam, B. S. Smith, Z. Ma, M. Palnitkar, D. R. Tomchick, M. Machius, J. Deisenhofer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 12142.
- [29] Y. Huang, R. Baxter, B. S. Smith, C. L. Partch, C. L. Colbert, J. Deisenhofer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 17701.
- [30] T. Klar, R. Pokorný, J. Moldt, A. Batschauer, L.-O. Essen, *J. Mol. Biol.* **2007**, *366*, 954.
- [31] M. Byrdin, A. P. M. Eker, M. H. Vos, K. Brettel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 8676.
- [32] Y. F. Li, P. F. Heelis, A. Sancar, *Biochemistry* **1991**, *30*, 6322.
- [33] R. Bittl, S. Weber, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* **2005**, *1707*, 117.
- [34] M. Ahmad, N. Grancher, M. Heil, R. C. Black, B. Giovani, P. Galland, D. Lardemer, *Plant Physiol.* **2002**, *129*, 774.
- [35] C. Lin, D. E. Robertson, M. Ahmad, A. A. Raibekas, M. S. Jorns, P. L. Dutton, A. R. Cashmore, *Science* **1995**, *269*, 968.
- [36] A. Berndt, T. Kottke, H. Breitkreuz, R. Dvorsky, S. Hennig, M. Alexander, E. Wolf, *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 13011.
- [37] G. L. Closs, M. D. E. Forbes, J. R. Norris, *J. Phys. Chem.* **1987**, *91*, 3592.
- [38] P. J. Hore, D. A. Hunter, C. D. McKie, A. J. Hoff, *Chem. Phys. Lett.* **1987**, *137*, 495.
- [39] R. M. Kowalczyk, E. Schleicher, R. Bittl, S. Weber, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 11393.
- [40] C. W. M. Kay, R. Bittl, A. Bacher, G. Richter, S. Weber, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 10780.
- [41] R. Pogni, M. C. Baratto, C. Teutloff, S. Giansanti, F. J. Ruiz-Dueñas, T. Choinowski, K. Piontek, A. T. Martínez, F. Lendzian, R. Basosi, *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 9517.
- [42] a) K. B. Henbest, K. Maeda, P. J. Hore, M. Joshi, A. Bacher, R. Bittl, S. Weber, C. R. Timmel, E. Schleicher, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 14395; b) A. W. MacFarlane IV, R. J. Stanley, *Biochemistry* **2001**, *40*, 15203.
- [43] F. J. J. De Kanter, R. Kaptein, R. A. Van Santen, *Chem. Phys. Lett.* **1977**, *45*, 575.
- [44] C. C. Moser, J. M. Keske, K. Warncke, R. S. Farid, L. Dutton, *Nature* **1992**, *355*, 796.
- [45] R. J. Hulsebosch, I. V. Borovykh, S. V. Paschenko, P. Gast, A. J. Hoff, *J. Phys. Chem. B* **1999**, *103*, 6815.