

Identifikation unerwarteter Elektronentransferpfade im Cryptochrom durch zeitaufgelöste Elektronenspinresonanz-Spektroskopie**

Till Biskup, Kenichi Hitomi, Elizabeth D. Getzoff, Sebastian Krapf, Thorsten Koslowski, Erik Schleicher und Stefan Weber*

Die Natur hat in biologischen Makromolekülen erstaunliche Motive für den effizienten langreichweitigen Elektronentransfer (ET) entwickelt.^[1] Derlei Motive können grundsätzlich als Template für technologische Anwendungen dienen, beispielsweise in der Nanoelektronik auf Grundlage molekularer Drähte (z. B. DNA-Filamente) oder beim Design neuartiger Werkstoffe zur Konvertierung erneuerbarer Energien. Die Adaptation der Grundlagen dieser ET-Motive zum Beispiel auf organische Solarzellen könnte dabei helfen, deren Ladungstransfer zu optimieren, sowie die Rate der Ladungsrekombination zu verringern und somit die Effizienz der Energiekonversion zu steigern.^[2] Die Analyse der Grundlagen des schnellen Elektronentransfers in biologischen Makromolekülen und dessen Kontrolle sind daher von ganz besonderer Bedeutung.

Hier berichten wir über die Stabilität und die Konservierung eines langreichweitigen ET, der über eine Sequenz individueller ET-Schritte verläuft, in strukturell homologen Proteinen von verschiedenen Organismen. Bei einem wichtigen Vertreter der Proteinklasse des Blaulichtrezeptors Cryptochrom (CRY) und den DNA-Reparaturenzymen Photolyase (PHR) entdeckten wir eine unerwartete Variabilität und identifizierten einen alternativen ET-Pfad.

Sequentieller ET über große Distanzen spielt eine zentrale Rolle in biologischen Systemen. Beispielsweise werden im Komplex I der Atmungskette in der inneren Membran von Mitochondrien Elektronen über eine Kaskade von Eisen-Schwefel-Zentren von einem Flavinadeninmononukleotid-

Kofaktor zur Chinon-Bindungsstelle weitergeleitet.^[3] Der ET-Pfad ist in seiner Gesamtheit nahezu 10 nm lang^[4] und verläuft sehr wahrscheinlich über aromatische Aminosäuren, die als „Bindeglieder“ die stellenweise großen Abstände zwischen den Eisen-Schwefel-Zentren der ET-Kette überbrücken.^[5] Ein weiteres Beispiel für langreichweitigen ET ist der Ladungstransfer in DNA.^[6] Die π -konjugierten Nukleobasen der DNA-Doppelhelix können als Redoxintermediate fungieren, um Ladungen über recht weite Strecken zu transportieren.^[7] Die Nukleobasen sind in der B-DNA mit Abständen von etwa 3.3 Å nahezu perfekt in helikalen Stapeln angeordnet und ermöglichen einen schnellen photoinduzierten ET (PET). Dabei hängt der Mechanismus des Ladungstransfers in der DNA von der Struktur und der Dynamik der DNA-Sequenz ab.

Manche lichtaktive Proteine, darunter auch jene, die auf UV-Licht reagieren, nutzen charakteristisch angeordnete Tryptophan-Reste (Trp) zum ET.^[8] Entlang der konservierten linearen Anordnung von Tryptophanen, die sich in den Flavoproteinen der PHR/CRY-Familie findet (siehe Abbildungen S1 und S2 in den Hintergrundinformationen), darunter *Arabidopsis*-UVR2 und -UVR3, ist ein sehr schneller PET möglich.^[9] In diesen Systemen sind drei Tryptophane zwischen dem Flavinadenindinukleotid-Kofaktor (FAD) im aktiven Zentrum und der Proteinoberfläche angeordnet, mit Abständen (von Kante zu Kante) von etwa 5 Å zwischen dem proximalen Trp (TrpA) und dem mittleren Trp (TrpB) und 4 Å zwischen TrpB und dem distalen Trp (TrpC).^[10–12] Nach Lichtanregung entzieht das FAD, das entweder volloxidiert oder halbreduziert (radikalisch) vorliegt, dem nahegelegenen TrpA ein Elektron. In einem zweiten ET-Schritt wird der erzeugte Radikalzustand vom TrpA zum TrpB in der Kette weiter transferiert. Ein dritter ET-Schritt verschiebt die positive Ladung (Elektronenloch) auf das oberflächenexponierte TrpC, wo das resultierende Radikal durch Wechselwirkung mit Wassermolekülen stabilisiert werden kann.^[13–15] Ausgehend vom einfach reduzierten (radikalischen) Zustand des FAD ist dieser Gesamtladungstransfer vom TrpC zum FAD innerhalb von 30 ps abgeschlossen, was kürzlich mit zeitaufgelöster optischer Absorptionsspektroskopie an der *Escherichia coli*-DNA-Photolyase gezeigt werden konnte.^[16]

Nach der Photoanregung des FAD im volloxidierten Zustand wird durch PET eine Reihe von Radikalpaaren (RP) erzeugt, die prinzipiell mit zeitaufgelöster Elektronenspinresonanz-Spektroskopie (time-resolved electron paramagnetic resonance; TREPR) untersucht werden kann.^[17–20] Bei ausreichend hoher Zeitauflösung kann man mit der TREPR die elektronische Spinpolarisation der frühen transienten paramagnetischen Zustände detektieren.^[21] Eine quantitative

[*] S. Krapf, Prof. Dr. T. Koslowski, Dr. E. Schleicher, Prof. Dr. S. Weber
Institut für Physikalische Chemie
Albert-Ludwigs-Universität Freiburg
Albertstraße 21, 79104 Freiburg (Deutschland)
E-Mail: Stefan.Weber@physchem.uni-freiburg.de

Dr. T. Biskup
Fachbereich Physik, Freie Universität Berlin (Deutschland)
und Department of Chemistry, University of Oxford (UK)

Dr. K. Hitomi, Prof. Dr. E. D. Getzoff
Department of Molecular Biology und Skaggs Institute
for Chemical Biology, The Scripps Research Institute
La Jolla, CA (USA)

[**] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (FOR-526 für S.W.), den U.S. National Institutes of Health (Grant R01 GM37684 für E.D.G.), und dem Skaggs Institute for Chemical Biology (Stipendium an K.H.) finanziell gefördert. Wir danken R. Bittl (Freie Universität Berlin) für die Spektrometernutzung, M. E. Michel-Beyerle (Nanyang Technological University) für hilfreiche Diskussionen und C. Hitomi für technische Unterstützung.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201104321> zu finden.

spektrale Analyse der Spinpolarisation von TREPR-Signalen liefert sowohl Informationen über die chemische Natur der beobachteten Radikalpaare als auch über die Spinmultiplizität des Vorläuferzustands, aus dem heraus das RP erzeugt wurde.^[22] Die Detektion von Radikalpaaren mit der TREPR nutzen wir in dieser Studie, um ET-Pfade in homologen Proteinen der PHR/CRY-Familie aufzuklären.

Im DNA-Reparaturenzym Photolyase stellt der vollständig reduzierte FAD-Kofaktor (FADH^-) dasjenige Elektron zur Verfügung, welches zur lichtabhängigen katalytischen Reparatur von Photoprodukten in UV-geschädigter DNA erforderlich ist.^[19] Ist der FAD-Kofaktor in Photolyasen hingegen ganz oder teilweise oxidiert und somit katalytisch inaktiv, so kann die katalytische DNA-Reparaturaktivität durch photoinduzierte Reduktion (auch Photoaktivierung genannt) über einen ET entlang der Trp-Kaskade wiederhergestellt werden.^[13] Alle bislang untersuchten Photolyasen nutzen diese FAD-Photoaktivierung^[23] trotz beträchtlicher Diversität hinsichtlich ihrer Aminosäuresequenz, ihrer Struktur und Funktion. Obwohl die Relevanz dieses Prozesses für die effiziente enzymatische DNA-Reparatur durch Photolyasen infrage gestellt wurde,^[24] ist die Photoaktivierung unter In-vivo-Bedingungen für die Kontrolle der Proteinqualität unter oxidativem Stress sehr wahrscheinlich von zentraler Bedeutung: Photolyasen erkennen unabhängig vom Redoxzustand ihres FAD-Kofaktors durch UV-Licht geschädigte DNA und binden an diese; deshalb würden ohne FAD-Photoaktivierung durch Oxidation inaktivierte Photolyasen, die an geschädigte DNA gebunden sind, notwendige Reparatur-, Transkriptions- und Zellteilungsprozesse in Zellen verhindern.

Für Cryptochrome, Homologe der Photolyasen, jedoch ohne DNA-Reparaturaktivität, wird angenommen, dass der FAD-Redoxzustand eine Schlüsselrolle bei der lichtinduzierten Aktivität einnimmt.^[25,26] In-vitro- und In-vivo-Experimente legen nahe, dass der Radikalzustand des FAD für die Signalisierung^[27] und die Magnetorezeption verantwortlich ist.^[28] Analog zu den Photolyasen wurde hierfür die konservierte Trp-Triade als essenzielles Strukturmotiv vorgeschlagen;^[25,29] dazu bedarf es jedoch nach wie vor eines direkten Nachweises. Gleichwohl treten in Cryptochromen lichtinduzierte, spinkorrelierte Radikalpaare mit Lebensdauern und Spin-Spin-Kopplungsparametern auf, die sie als zentrale Komponente eines biologischen Magnetkompasses prinzipiell geeignet erscheinen lassen.^[20,22,30]

Um die Konservierung und die Diversität des photoinduzierten Elektronentransfers entlang der Trp-Triade in der PHR/CRY-Proteinfamilie eingehender zu untersuchen, haben wir nun vergleichende TREPR-Experimente an Cryptochromen vom DASH-Typ (CRYD) aus dem Cyanobakterium *Synechocystis* sp. PCC6803 und dem Glatten Krallenfrosch *Xenopus laevis* durchgeführt. Bereits zuvor konnten wir die Kristallstruktur des *Synechocystis*-CRYD lösen,^[12] und es ist uns weiterhin der wichtige Nachweis gelungen, dass die Trp-Triade des *Xenopus*-CRYD ET-aktiv ist.^[20] Die beiden Proteine sind sich bezüglich ihrer Aminosäuresequenz (67% Sequenzhomologie) und ihrer dreidimensionalen Struktur sehr ähnlich und konservieren die Trp-Triade ($\text{W396} \equiv \text{TrpA}$, $\text{W373} \equiv \text{TrpB}$ und $\text{W320} \equiv \text{TrpC}$ in *Syn-*

echocystis-CRYD, sowie $\text{W400} \equiv \text{TrpA}$, $\text{W377} \equiv \text{TrpB}$ und $\text{W324} \equiv \text{TrpC}$ in *Xenopus-laevis*-CRYD; siehe Abbildung S1).^[12]

Im *Xenopus*-CRYD beginnt der PET aus einem angeregten Singulettzustand des redoxaktiven FAD heraus, wie wir kürzlich durch die Analyse elektronenspinpolarisierter TREPR-Signale des auf einer Zeitskala im Nanosekundenbereich erzeugten RP-Zustands $\text{FAD}^{\bullet-}\text{TrpC}^{\bullet}$ zeigen konnten.^[22] Der Austausch des oberflächenexponierten TrpC gegen Phenylalanin (W324F) unterdrückt die RP-Bildung auf einer Zeitskala von etwa 10–100 ns (das entspricht der maximalen Zeitauflösung unseres experimentellen TREPR-Aufbaus) und darüber hinaus. Der RP-Zustand $\text{FAD}^{\bullet-}\text{TrpB}^{\bullet}$ könnte (über das intermediäre RP $\text{FAD}^{\bullet-}\text{TrpA}^{\bullet}$) dennoch mit sehr kurzer Lebensdauer gebildet werden. Allerdings ist in diesem Zustand das FAD-Radikal weder vom TrpA- noch vom TrpB-Radikal ausreichend weit entfernt, so dass es ohne das terminale TrpC nicht zu einer stabilen Ladungstrennung auf einer längeren Zeit- und Längenskala kommen kann; effizienter Elektronenrücktransfer und die Rekombination der Radikale führen in diesem Fall binnen weniger als 10 ns in den diamagnetischen Grundzustand zurück.

TREPR-Experimente am Wildtyp des cyanobakteriellen *Synechocystis*-CRYD-Proteins liefern ein RP-Spektrum (Abbildung 1), das dem des Wildtyps des *Xenopus*-CRYD-Proteins hinsichtlich der Abfolge der Elektronenspinpolari-

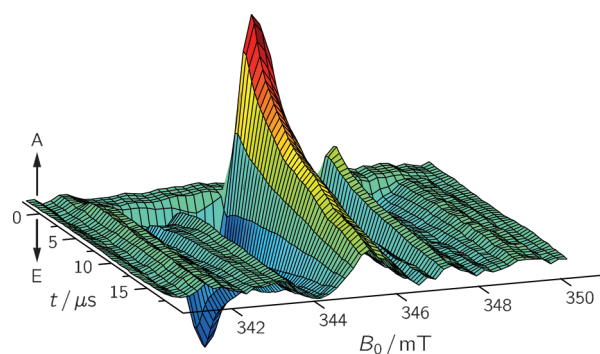


Abbildung 1. TREPR-Datensatz für das *Synechocystis*-CRYD, aufgenommen bei einer Temperatur von 274 K. Jedes Zeitprofil stellt die Mittelung von 120 Einzelmessungen dar, die mit einer Laserpulswiederholungsrate von 1.25 Hz bei einer Mikrowellenfrequenz von 9.68 GHz, einer Mikrowellenleistung von 2 mW und einer Detektionsbandbreite von 100 MHz aufgenommen wurden. A: verstärkte Absorption; E: Emission.

sation und der spektralen Breite ähnelt.^[20,22] Dies lässt auf eine weitgehend analoge Erzeugung des vorliegenden RP-Zustandes im bakteriellen CRYD schließen. Positive und negative Signalanteile entsprechen dabei einer verstärkt absorptiven oder emissiven Elektronenspinpolarisation des jeweiligen EPR-Übergangs. Die spektrale Linienform wird durch die magnetischen Wechselwirkungen innerhalb (Zeeman- und Hyperfeinwechselwirkung) und zwischen (Dipol-Dipol- und Austauschwechselwirkung) den beiden Radikalen im RP-Zustand bestimmt. Hierzu verweisen wir auf von uns kürzlich publizierte Details zu Spektrensimulationen von TREPR-Signalen gekoppelter und spinkorrelier-

ter Radikalpaare im *Xenopus*-CRYD.^[22] Die zeitliche Entwicklung des in der Abbildung 1 gezeigten TREPR-Signals zeigt, dass der lichtinduzierte RP-Zustand im *Synechocystis*-CRYD ebenso wie der im *Xenopus*-CRYD^[20] eine Lebensdauer von mindestens 6 μ s hat.

Die W320F-Mutation von *Synechocystis*-CRYD, in der das terminale TrpC durch ein Phenylalanin ersetzt wurde (W320F), führte im Gegensatz zur entsprechenden Mutation des Froschproteins nicht zu einem Verschwinden des lichtinduzierten TREPR-Signals (Abbildung 2). Unerwarteterweise zeigte diese Mutante des *Synechocystis*-CRYD ein TREPR-

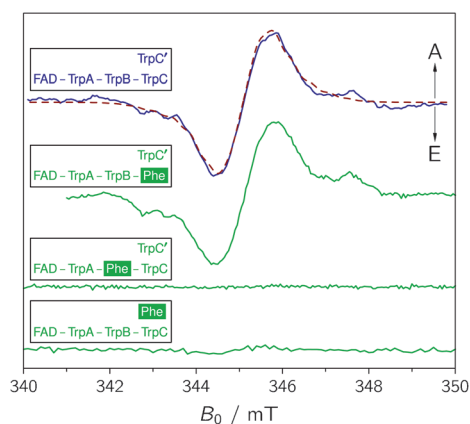


Abbildung 2. TREPR-Spektren des Wildtyps (durchgezogene blaue Kurve) und unterschiedlicher Trp-Mutanten (durchgezogene grüne Kurven) von *Synechocystis*-CRYD, aufgenommen 500 ns nach Laserpulsanregung. Die Spektren wurden auf vergleichbares Signal-zu-Rausch-Verhältnis skaliert. TrpA \equiv W396, TrpB \equiv W373, TrpC \equiv W320 und TrpC' \equiv W375. Von oben nach unten: WT, W320F, W373F und W375F. Experimentelle Parameter wie in Abbildung 1. Die gestrichelte rote Kurve zeigt ein simuliertes Spektrum (für die Parameter vgl. die Hintergrundinformationen) des TREPR-Spektrums des Radikalpaarzustands FAD \cdots TrpC'.

Spektrum, das nahezu mit dem des Wildtyps übereinstimmt. Die Trp-Triade von *Synechocystis*-CRYD lässt sich strukturell gut mit der von *E. coli*-PHR überlagern (Abbildung S1).^[10,12] Dennoch führt ganz offensichtlich die Photoanregung sowohl des Wildtypproteins als auch der TrpC-defizienten Mutante zur Bildung eines Radikalpaars. Daraus zogen wir zunächst den Schluss, dass TrpC eventuell nicht der terminale Elektronendonator der FAD-Photoreduktionskaskade in *Synechocystis*-CRYD ist.

Um die Herkunft der RP-Signatur im WT-*Synechocystis*-CRYD aufzuklären, untersuchten wir zwei weitere Mutanten, W373F und W375F. Erstere hatte das Ziel herauszufinden, ob das mittlere TrpB (= W373) der konservierten Trp-Triade für den langreichweitigen ET im cyanobakteriellen Protein notwendig ist, letztere diente der Untersuchung eines möglichen PET über das TrpC hinaus zum W375 \equiv TrpC' (Abbildung 3). TrpC' liegt relativ nahe bei TrpC und wie dieses an der Proteinoberfläche.^[12] Insofern könnten die Deprotonierung des zunächst gebildeten TrpC'-Kationradikals und eine Wechselwirkung mit dem Lösungsmittel den photoinduzierten TrpC'-Radikalzustand ebenso stabilisieren wie den von TrpC. Käme

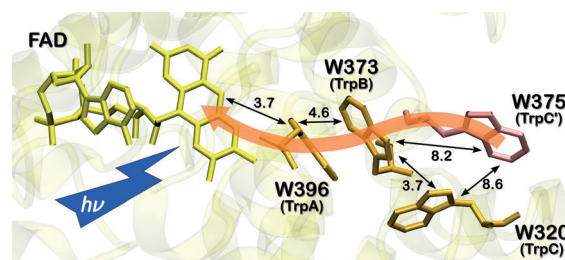


Abbildung 3. Die konservierte Trp-Triade von *Synechocystis*-CRYD (orange) und der alternative ET-Pfad ausgehend von W375 (hellrot). Die Ebenen der Indolringe von TrpC und TrpB stehen nahezu senkrecht aufeinander, wohingegen die Ringebenen von TrpB und TrpC' eine (für den ET vorteilhaftere) nahezu parallele Orientierung zueinander einnehmen. Die Zahlen an den schwarzen Pfeilen sind Abstände in Å (jeweils gemessen von Kante zu Kante).

TrpC' zur klassischen Trp-Triade hinzu, erweiterte das den ET-Pfad in *Synechocystis*-CRYD auf vier Tryptophane.

Sämtliche TREPR-Experimente am WT und an den Trp-Mutanten von *Synechocystis*-CRYD wurden unter identischen Bedingungen durchgeführt (Abbildung 2). Bemerkenswerterweise lieferten aber weder W373F (TrpB) noch W375F (TrpC') ein signifikantes RP-Signal (in den gleichen Zeitintervallen), während sowohl der WT als auch die W320F-(TrpC)-Mutante ein Signal zeigten. Diese Ergebnisse belegen, dass TrpC' und nicht TrpC das kritische, oberflächenexponierte, distale Trp im ET-Weg im *Synechocystis* CRYD ist, im Gegensatz zur *E. coli*-Photolyase und zum *Xenopus*-CRYD, die beide TrpC als terminalen Elektronendonator nutzen.^[20,31] Des Weiteren zeigen die Resultate an cyanobakteriellem CRYD eindeutig, dass der PET weder direkt vom TrpC' (außen) zum TrpA (innen) noch schrittweise über TrpC, sondern – zu unserer großen Überraschung – über TrpB in der Mitte der konservierten Kette verläuft, und das trotz des größeren Abstands zwischen TrpB und TrpC' (8.2 Å, gemessen von Kante zu Kante) als zwischen TrpB und TrpC (3.7 Å; vgl. Abbildung 3). Recht feine Unterschiede zwischen den TREPR-Spektren von *Xenopus*- und *Synechocystis*-WT-Cryptochrom (vgl. Abbildung S3) ebenso wie Spektrensimulationen, die auf der Theorie spinkorrelierter gekoppelter Radikalpaare basieren, stützen diese Schlussfolgerungen: Die TREPR-Signatur des RPs des cyanobakteriellen WT-Proteins kann mit den magnetischen Wechselwirkungsparametern (g -Werte, dipolare Kopplung und Austauschwechselwirkung) des RP-Zustands FAD \cdots TrpC' zufriedenstellend simuliert werden (Abbildung 2), nicht jedoch mit denen von FAD \cdots TrpB' und FAD \cdots TrpC' (vgl. die Hintergrundinformationen). Der alternative terminale Elektronendonator, TrpC', ist innerhalb der PHR/CRY-Proteinfamilie grundsätzlich nicht konserviert; allerdings enthalten sowohl CRY1 (W379) als auch CRY2 (W376) aus *A. thaliana* dieses TrpC' (Abbildung S1).

Der im Vergleich zum *Xenopus*-CRYD oder den verwandten Photolyasen unterschiedliche ET-Pfad in *Synechocystis*-CRYD wirft die Frage auf, warum der PET im cyanobakteriellen CRYD über die deutlich längere Distanz vom distalen TrpC' zum TrpB anstatt vom konservierten TrpC zum TrpB abläuft. Unsere experimentellen Beobachtungen

versuchen wir auf Grundlage der Marcus-Theorie des Ladungstransfers zu verstehen,^[32] die vorhersagt, dass die erreichbare ET-Rate (k_{ET}) außer von der Temperatur (T) von 1) der elektronischen Kopplung (H_{AB}) zwischen den Redox-Zuständen, 2) der Änderung der gesamten freien Enthalpie beim Ladungstransfer (ΔG) und 3) der Reorganisationsenergie (λ) abhängt [siehe Gleichung (1); k_{B} ist die Boltzmann-Konstante].

$$k_{\text{ET}} = \frac{H_{\text{AB}}^2}{\hbar} \sqrt{\frac{\pi}{\lambda k_{\text{B}} T}} \exp \left[-\frac{(\Delta G + \lambda)^2}{4\lambda k_{\text{B}} T} \right] \quad (1)$$

In einem vorausgegangenen Beitrag zur Thermodynamik des Elektronentransfers entlang der Trp-Kaskade in der *E. coli*-Photolyase haben wir H_{AB} , ΔG und λ durch eine Kombination der Berechnung der freien Enthalpie basierend auf klassischen Moleküldynamikrechnungen und quantenmechanischen Rechnungen ermittelt.^[15] Die resultierenden Reorganisationsenergien für jeden einzelnen ET-Schritt, TrpB \rightarrow TrpA (abgekürzt für: TrpB + TrpA' \rightarrow TrpB' + TrpA) und TrpC \rightarrow TrpB, ergaben ähnliche Werte. Da die dreidimensionalen Strukturen von *Synechocystis*-CRYD und *E. coli*-Photolyase vergleichbar sind,^[10,12] nehmen wir an, dass auch die λ -Werte für den alternativen ET-Schritt, TrpC' \rightarrow TrpB, und den (klassischen) ET-Schritt, TrpC \rightarrow TrpB, in *Synechocystis*-CRYD ähnliche Werte annehmen. Damit verbleiben die elektronischen Kopplungselemente, $H_{\text{AB}}(\text{TrpC}' \rightarrow \text{TrpB})$ und $H_{\text{AB}}(\text{TrpC} \rightarrow \text{TrpB})$, sowie die Änderungen der freien Enthalpie, ΔG , als hauptsächliche Quellen für die beobachteten Unterschiede im ET-Verhalten.

Die elektronische Kopplung zwischen Redoxpartnern hängt von deren Abstand ab, vorausgesetzt dass das dazwischenliegende Proteinmedium vergleichbar ist, ebenso aber von ihrer relativen Orientierung.^[32,33] Eine günstigere relative Orientierung der Redoxpartner könnte den Vorteil einer kürzeren ET-Distanz kompensieren oder gar überkompensieren.^[34] Im *Synechocystis*-CRYD ist der Abstand (gemessen von Kante zu Kante) zwischen TrpC und TrpB erheblich kleiner (3.7 Å) als zwischen TrpC' und TrpB (8.2 Å). Deshalb erwartet man, ausgehend von der phänomenologischen Abstandsregel nach Dutton,^[33] eine etwa 100-fach größere ET-Rate für TrpC \rightarrow TrpB als für TrpC' \rightarrow TrpB, die aber eindeutig nicht beobachtet wurde. Deshalb gehen wir davon aus, dass Orientierungseffekte der aromatischen Ringe der Trps zur Bevorzugung des TrpC' \rightarrow TrpB-Wegs führen. Darüber hinaus lässt die Umgebung der beiden Trps (W320 und W375 in *Synechocystis*-CRYD) vermuten, dass W375 (TrpC') besser oberflächenexponiert ist als W320 (TrpC) und daher wahrscheinlich eher durch Deprotonierung und Wechselwirkungen zwischen Lösungsmittel und Radikal stabilisiert werden kann (Abbildung 3).^[12] Während wir die Möglichkeit nicht ausschließen können, dass TrpC' in Lösung näher an TrpB liegt als in der Kristallstruktur,^[12] liefern unsere Moleküldynamiksimulationen des *Synechocystis*-CRYD-Proteins in einer Wasserbox keine Hinweise auf eine signifikante räumliche Reorientierung von TrpC'. Für den entsprechenden ET in der *E. coli*-Photolyase stellte sich das terminale TrpC (W306) als energetisch bevorzugtes Radikal heraus, 30–45 kJ mol⁻¹ unterhalb der anderen beiden Tryptophane gele-

gen.^[15] Deshalb ist der umgekehrte Ladungstransfer zu den beiden im Protein verborgenen Tryptophanen (TrpB und TrpA) langsam, sobald TrpC erreicht ist.

Um die thermodynamische Stabilität möglicher Zentren der Ladungslokalisation aus einer theoretischen Perspektive heraus zu untersuchen, nutzten wir ein thermodynamisches Integrationsschema,^[35] das wir für Ladungstransferreaktionen angepasst haben.^[15] Ohne Beschränkung der Allgemeingültigkeit nutzen wir die freie Enthalpie des angenommenen Orts der anfänglichen Ladungslokalisation (TrpA) als Referenz (Nullpunkt) für ΔG . Unsere Rechnungen haben die folgenden Änderungen der freien Enthalpie (ΔG) für den Transfer jeweils einer positiven Ladung zwischen zwei Tryptophanen erhalten: -49 kJ mol⁻¹ für TrpB \rightarrow TrpA, -62 kJ mol⁻¹ für TrpC \rightarrow TrpA und -81 kJ mol⁻¹ für TrpC' \rightarrow TrpA. Daraus ergibt sich im Boltzmann-Gleichgewicht bei Raumtemperatur ein Populationsüberschuss auf TrpC' von 99%. Über die Berechnung der Standardabweichung von ΔG für Ladungstransferwege mit identischen Start- und Zielorten, aber unterschiedlichen intermediären Orten, konnten wir die statistische Genauigkeit des Verfahrens zu $\sigma^2(\Delta G) \approx 5$ kJ mol⁻¹ bestimmen. Folglich können wir TrpC' (W375) in *Synechocystis*-CRYD eindeutig als thermodynamische Senke für den Lochtransfer relativ zu allen hier betrachteten Aminosäuren identifizieren.

Zusammenfassend konnten wir zeigen, dass eine Feinabstimmung der lokalen Aminosäuresequenz und Konformation Unterschiede im PET hervorrufen kann, und das trotz eines gemeinsamen Redox-Pfads in einer hochgradig konservierten Proteinumgebung. Es zeigt sich, dass ein Vergleich von Aminosäuresequenzen von Proteinen definitiv nicht ausreicht, um die Photochemie eines Proteins vorherzusagen.^[36] Weiterhin ist der Abstand zwischen Redoxpartnern nicht notwendigerweise der einzige entscheidende Parameter für die einzelnen ET-Schritte; die Orientierung der Redoxpartner^[34] und ihre Erreichbarkeit für das Lösungsmittel, und demzufolge die Stabilisierung der ladungsgetrennten Zustände,^[13–15] sind ebenso von großer Bedeutung.

Die Flexibilität der ET-Pfade in Cryptochromen, wie sie hier gezeigt wurde, hat große Auswirkungen auf das Verständnis der Photochemie und der funktionalen Diversität innerhalb der PHR/CRY-Proteinfamilie. Das schließt die vorgeschlagenen Wechselwirkungen vieler Cryptochrome mit Proteinpartnern mit ein. Weitere spektroskopische Untersuchungen der Diversität werden daher zu einem weitaus detaillierteren Verständnis der Reaktionsmechanismen dieser vielfältigen Proteine führen. Darüber hinaus können sie eine bessere Kontrolle von langreichweitigen ET-Prozessen nicht nur in biologischen Systemen ermöglichen.

Experimentelles

Die zeitaufgelöste Detektion der nach Anregung mit einem Laserpuls auftretenden TREPR-Signale erfolgte mit einem selbstgebauten EPR-Spektrometer.^[18] Für die gepulste optische Anregung der *Synechocystis*-CRYD-Proben (für Details der Proteinsynthese und Proteinreinigung vgl. die Hintergrundinformationen) diente ein Nd:YAG-Laser (Spectra Physics GCR-11), der einen optischen parametrischen Oszillator (Opta BBO-355-vis/IR, Opta GmbH, Bens-

heim, Deutschland) pumppte (Wellenlänge 460 nm; Pulsdauer 6 ns; Pulsenergie 4 mJ).

Details zum thermodynamischen Integrationsschema können den Hintergrundinformationen entnommen werden.

Eingegangen am 22. Juni 2011

Online veröffentlicht am 15. November 2011

Stichwörter: Elektronentransfer · EPR-Spektroskopie · Flavin · Radikalreaktionen · Tryptophan

- [1] J. N. Onuchic, D. N. Beratan, J. R. Winkler, H. B. Gray, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1992**, *21*, 349–377; P. P. Edwards, H. B. Gray, M. T. J. Lodge, R. J. P. Williams, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 6860–6868; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 6758–6765; H. B. Gray, J. R. Winkler, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 3534–3539.
- [2] B. C. Thompson, J. M. J. Fréchet, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 62–82; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 58–77.
- [3] J. Hirst, *Biochem. J.* **2010**, *425*, 327–339.
- [4] R. G. Efremov, R. Baradaran, L. A. Sazanov, *Nature* **2010**, *465*, 441–445.
- [5] C. Wittekindt, M. Schwarz, T. Friedrich, T. Koslowski, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 8134–8140.
- [6] J. C. Genereux, J. K. Barton, *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 1642–1662.
- [7] Y. Osakada, K. Kawai, M. Fujitsuka, T. Majima, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 18072–18076.
- [8] L. Rizzini et al., *Science* **2011**, *332*, 103–106.
- [9] M. Byrdin, A. Lukacs, V. Thiagarajan, A. P. M. Eker, K. Brettel, M. H. Vos, *J. Phys. Chem. A* **2010**, *114*, 3207–3214.
- [10] H.-W. Park, S.-T. Kim, A. Sancar, J. Deisenhofer, *Science* **1995**, *268*, 1866–1872.
- [11] T. Tamada, K. Kitadokoro, Y. Higuchi, K. Inaka, A. Yasui, P. E. de Ruiter, A. P. M. Eker, K. Miki, *Nat. Struct. Biol.* **1997**, *4*, 887–891; H. Komori, R. Masui, S. Kuramitsu, S. Yokoyama, T. Shibata, Y. Inoue, K. Miki, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 13560–13565; C. A. Brautigam, B. S. Smith, Z. Ma, M. Palnitkar, D. R. Tomchick, M. Machius, J. Deisenhofer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 12142–12147; T. Klar, G. Kaiser, U. Hennecke, T. Carell, A. Batschauer, L.-O. Essen, *ChemBioChem* **2006**, *7*, 1798–1806; Y. Huang, R. Baxter, B. S. Smith, C. L. Partch, C. L. Colbert, J. Deisenhofer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 17701–17706; T. Klar, R. Pokorny, J. Moldt, A. Batschauer, L.-O. Essen, *J. Mol. Biol.* **2007**, *366*, 954–964.
- [12] R. Brudler et al., *Mol. Cell* **2003**, *11*, 59–67.
- [13] C. Aubert, M. H. Vos, P. Mathis, A. P. M. Eker, K. Brettel, *Nature* **2000**, *405*, 586–590.
- [14] D. M. Popović, A. Zmircić, S. D. Zarić, E.-W. Knapp, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 3775–3782.
- [15] S. Krapf, T. Koslowski, T. Steinbrecher, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, *12*, 9516–9525.
- [16] A. Lukacs, A. P. M. Eker, M. Byrdin, K. Brettel, M. H. Vos, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 14394–14395.
- [17] Y. M. Gindt, E. Vollenbroek, K. Westphal, H. Sackett, A. Sancar, G. T. Babcock, *Biochemistry* **1999**, *38*, 3857–3866.
- [18] S. Weber, C. W. M. Kay, H. Mögling, K. Möbius, K. Hitomi, T. Todo, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 1319–1322.
- [19] S. Weber, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* **2005**, *1707*, 1–23.
- [20] T. Biskup, E. Schleicher, A. Okafuji, G. Link, K. Hitomi, E. D. Getzoff, S. Weber, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 411–415; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 404–407.
- [21] R. Bittl, S. Weber, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* **2005**, *1707*, 117–126.
- [22] S. Weber, T. Biskup, A. Okafuji, A. R. Marino, T. Berthold, G. Link, K. Hitomi, E. D. Getzoff, E. Schleicher, J. R. Norris, *J. Phys. Chem. B* **2010**, *114*, 14745–14754.
- [23] A. Okafuji et al., *DNA Repair* **2010**, *9*, 495–505.
- [24] I. H. Kavakli, A. Sancar, *Biochemistry* **2004**, *43*, 15103–15110.
- [25] O. Froy, D. C. Chang, S. M. Reppert, *Curr. Biol.* **2002**, *12*, 147–152.
- [26] B. Giovani, M. Byrdin, M. Ahmad, K. Brettel, *Nat. Struct. Biol.* **2003**, *10*, 489–490; J.-P. Bouly et al., *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 9383–9391.
- [27] M. Merrow, T. Roenneberg, *Cell* **2001**, *106*, 141–143; R. Bannerjee, E. Schleicher, S. Meier, R. Muñoz Viana, R. Pokorny, M. Ahmad, R. Bittl, A. Batschauer, *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 14916–14922.
- [28] 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*, 14395–14399.
- [29] A. Zeugner, M. Byrdin, J.-P. Bouly, N. Bakrim, B. Giovani, K. Brettel, M. Ahmad, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 19437–19440.
- [30] C. T. Rodgers, P. J. Hore, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 353–360.
- [31] Y. F. Li, P. F. Heelis, A. Sancar, *Biochemistry* **1991**, *30*, 6322–6329.
- [32] R. A. Marcus, N. Sutin, *Biochim. Biophys. Acta Rev. Bioenerg.* **1985**, *811*, 265–322.
- [33] C. C. Page, C. C. Moser, X. Chen, L. Dutton, *Nature* **1999**, *402*, 47–52.
- [34] R. J. Cave, P. Siders, R. A. Marcus, *J. Phys. Chem.* **1986**, *90*, 1436–1444; R. M. Williams, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2010**, *9*, 1018–1026.
- [35] J. G. Kirkwood, *J. Chem. Phys.* **1935**, *3*, 300–313.
- [36] J. C. Whisstock, A. M. Lesk, *Q. Rev. Biophys.* **2003**, *36*, 307–340.