

## Nukleotidexzisionsreparatur

Deutsche Ausgabe: DOI: 10.1002/ange.201601524  
Internationale Ausgabe: DOI: 10.1002/anie.201601524

## Mechanismen der DNA-Reparatur durch Photolyasen und Exzisionsnukleasen (Nobel-Aufsatz)\*\*

Aziz Sancar\*

Cryptochrom · Maxicell-Methode · Nukleotidexzisionsreparatur · Photoreaktivierung · Zirkadiane Uhr

## Einleitung

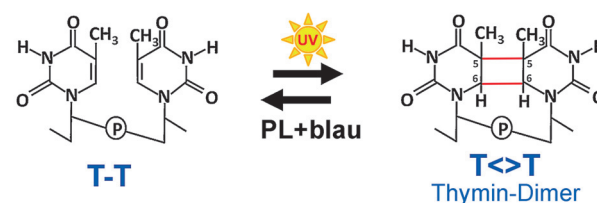
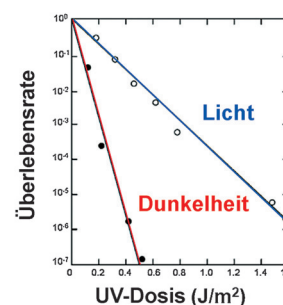
Der ultraviolette (UV) Teil des Sonnenlichts schädigt die DNA durch die Umwandlung zweier benachbarter Thyminen in Thymindimere ( $T < > T$ ), die potentiell mutagen, karzinogen oder letal für den Organismus sind. Dieser Schaden wird repariert durch DNA-Photolyasen in *E. coli* und durch das Nukleotidexzisionsreparatursystem in *E. coli* und im Menschen. In diesem Aufsatz stelle ich unsere Arbeiten zu den Photolyasen und zur Nukleotidexzisionsreparatur vor. Ich werde schildern, wie unsere Arbeit an den DNA-Photolyasen zur Entdeckung von Cryptochromen geführt hat, die eine essentielle Rolle spielen als Proteine im zirkadianen Rhythmus (*clock proteins*) und wie diese Entdeckung die beiden Forschungsgebiete miteinander verknüpft und den Kreis schließt.

## Photolyase

Photolyasen sind photonengetriebene Nanomaschinen, welche die Photonen des blauen Lichts nutzen, um die Reparatur von Thymindimeren durchzuführen, die in der DNA durch die Einwirkung von UV-Strahlung entstehen. Photolyasen wurden 1958 von meinem Doktorvater Claud S. (Stan) Rupert entdeckt (Abbildung 1), und diese Entdeckung markierte den Anfang des Gebiets der DNA-Reparatur als wissenschaftliche Disziplin. Jahrzehnte vor der Entdeckung der Photolyasen war bereits bekannt, dass UV-Strahlung Bakterien sehr effizient abtötet (Abbildung 1, Diagramm rechts). 1949 hatte Kelner am Cold Spring Harbor Laboratory die interessante Beobachtung gemacht, dass mittels UV-Licht abgetötete Bakterien wieder lebendig wurden, wenn man sie sichtbarem Licht aussetzte.<sup>[1,2]</sup> Es gab keine Erklärung für dieses Phänomen, das als Photoreaktivierung bezeichnet wurde. Rupert analysierte das Phänomen weiter und demonstrierte, dass UV-Licht die Bakterien durch Schädigung der DNA abtötet und es ein Enzym gibt (Photoreaktivierungsenzym = Photolyase), das blaues Licht als Energiequelle nutzt, um diese DNA-Schäden zu reparieren. Blaues Licht bringt also tote Zellen zurück ins Leben, und demnach ist diese „Wiederauferstehung“ kein unerklärliches Phänomen, für das wir eine metaphysische Erklärung benötigen würden,<sup>[3,4]</sup> sondern kann mit den Gesetzen der Physik erklärt werden. Der von Dr. Rupert entwickelte Reaktionsmechanismus ist wie folgt:<sup>[5–7]</sup> UV-Licht wandelt zwei benachbarte



Rupert und Sancar, UT Dallas, 2009



**Abbildung 1.** Photoreaktivierung (DNA-Reparatur) und Photolyasen. Oben links: Claud S. Rupert und Aziz Sancar bei einer Feierlichkeit an der University of Texas in Dallas 2009. Oben rechts: Photoreaktivierung in *E. coli*. Ein *E. coli*-Stamm mit einer defekten Nukleotidexzisions- und Rekombinationsreparatur, der ein kloniertes Photolyase-Gen trägt, wurde mit der angegebenen UV-Dosis bestrahlt. Die Bakterien wurden entweder direkt (gefüllte Kreise) oder nach Belichtung mit einem Kamerablitz von 1 ms Dauer ausplattiert (offene Kreise). Aus Lit. [9]. Unten: Allgemeines Modell der Photolyaseaktivität basierend auf den bahnbrechenden Arbeiten von Rupert: UV-Licht induziert die Bildung eines Cyclobutan-Thymin-Dimers ( $T < > T$ ). Das Enzym Photolyase bindet an das Dimer, absorbiert ein Photon im blauen Wellenlängenbereich und verwandelt das Dimer zurück in zwei kanonische Thyminen.

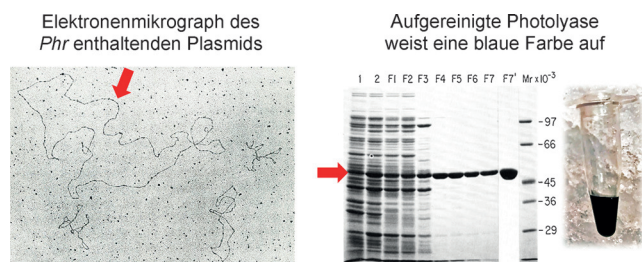
Pyrimidine, inklusive Thyminen, in ein Cyclobutan-Pyrimidin-Dimer (CPD) um, und das als Photolyase bezeichnete Enzym nutzt die Energie des blauen Lichts, um die zwei unnormalen Bindungen zwischen den Thyminen zu spalten, wodurch das

[\*] Prof. A. Sancar  
Department of Biochemistry and Biophysics  
University of North Carolina School of Medicine  
Chapel Hill, North Carolina (USA)  
E-Mail: Aziz\_Sancar@med.unc.edu

[\*\*] Copyright© The Nobel Foundation 2015. Wir danken der Nobelstiftung, Stockholm, für die Genehmigung zum Abdruck einer deutschen Fassung dieses Vortrages.

Thymindimer in zwei normale Thyminen zurückverwandelt wird (Abbildung 1, Reaktion unten). Photolyase repariert also DNA und beseitigt die gefährlichen Effekte der UV-Strahlung. Das war zunächst eine zufriedenstellende Erklärung des Photoreaktivierungsphänomens, warf aber eine physikalische Frage auf: Photolyase ist ein Protein, und Proteine absorbieren kein blaues Licht. In den folgenden zwei Jahrzehnten versuchten Rupert und viele andere Forscher, die Identität der blauen Licht absorbierenden Komponente in den Photolyasen zu identifizieren. Die Suche blieb erfolglos, zumal Rupert ermittelt hatte, dass eine *E. coli*-Zelle nicht mehr als 10 bis 20 Photolyasemoleküle enthalten sollte, was bedeutete, dass es mit den damaligen Methoden völlig unmöglich war, das Protein aufzureinigen und zu charakterisieren.

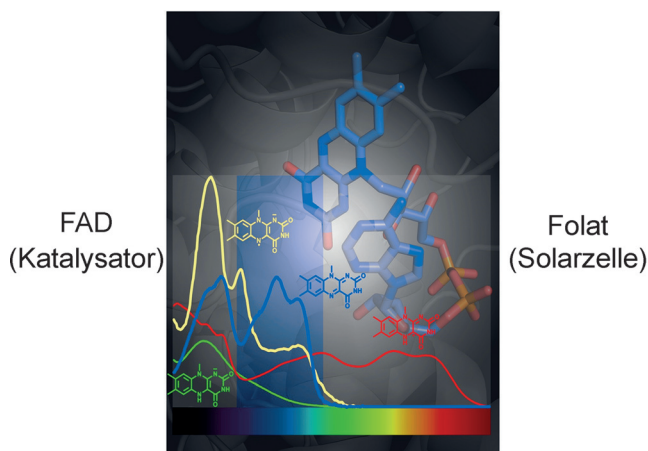
Als ich 1974 Mitarbeiter im Labor von Dr. Rupert wurde, war das Klonieren von Genen gerade an der Stanford University entwickelt worden. Als junger Absolvent dachte ich damals, ich könnte alles erreichen, was ich mir vorgestellt hatte, und deshalb schlug ich Dr. Rupert vor, das Photolyase-Gen zu klonieren, das Enzym zu überexprimieren und es aufzureinigen. Er sagte „Leg los!“ Nach vielen Monaten Arbeit gelang es mir dann, das Gen erfolgreich zu klonieren.<sup>[8,9]</sup> Ein elektronenmikroskopisches Bild des Plasmids, welches das Photolyase-Gen enthält, ist in Abbildung 2 links



**Abbildung 2.** Klonierung und Aufreinigung der Photolyase. Links: Elektronenmikrograph des Plasmids, welches das Photolyase-Gen (*Phr*) enthält. Aus Lit. [8]. Mitte: Aufreinigung der Photolyase aus einem das Protein überexprimierenden *E. coli*-Stamm. Aus Lit. [10, 11]. Rechts: Die aufgereinigte Photolyase hat eine blaue Farbe aufgrund des Flavinkofaktors des Enzyms. Je nach Konzentration des Proteins schwankt die Farbe der Lösung zwischen Himmelblau und Dunkelblau.

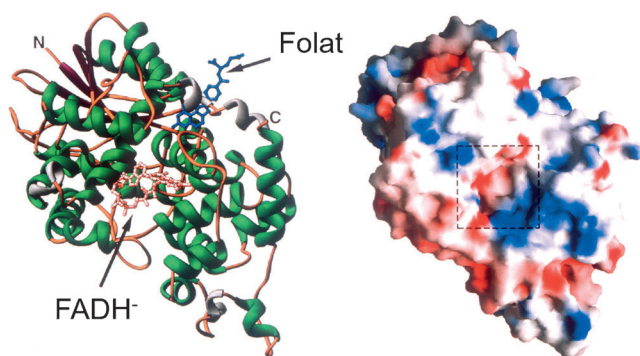
gezeigt. In den nachfolgenden Jahren an der University of North Carolina verwendeten meine Kollegen und ich das geklonte Gen, um das Enzym in Gramm-Mengen herzustellen (Abbildung 2, Mitte),<sup>[10–12]</sup> und beim Aufreinigen fanden wir, dass es eine intensive blaue Farbe hatte (Abbildung 2, rechts).<sup>[12]</sup> Ohne jede weitere chemische Analyse lieferte diese Beobachtung bereits die Antwort auf die physikalische Frage: Das Protein hat eine blaue Farbe, und das bedeutet, dass es Licht absorbieren kann. Wir versuchten, die lichtabsorbierende Komponente des Enzyms mithilfe chemischer Analysemethoden zu identifizieren. Zu unserer Überraschung fanden wir, dass das Protein nicht nur einen, sondern zwei blaues Licht absorbierende Kofaktoren enthielt, nämlich ein Methenyltetrahydrofolat (Folat) und reduziertes deprotoniertes Flavinadenindinukleotid ( $\text{FADH}^-$ ).<sup>[13–28]</sup> Darüber

hinaus fanden wir, dass das Enzym je nach Redoxzustand des Flavinkofaktors ganz unterschiedliche Farben annehmen konnte, von Violett bis Orange (Abbildung 3).<sup>[29]</sup> Als nächstes bestimmten wir die Funktion der beiden Kofaktoren mithilfe photochemischer Experimente. Wir fanden, dass das Folat

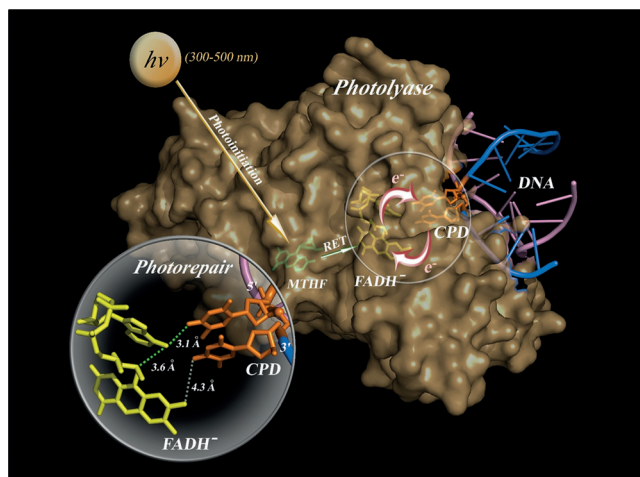


**Abbildung 3.** Die Chromophore der Photolyase. Photolyase aus *E. coli* trägt zwei Chromophore, nämlich reduziertes Flavinadenindinukleotid ( $\text{FADH}^-$ ) und Methenyltetrahydrofolat (Folat). Das Folat fungiert als Solarzelle (oder Photoantenne), das Flavin ist der katalytische Kofaktor. Beim Aufreinigen des Proteins ändert sich der Oxidationszustand des Flavins, das infolgedessen Farben von Violett bis Orange annehmen kann. Die Abbildung zeigt die vier Redoxzustände von Flavin und die dazugehörigen Absorptionsspektren, überlagert mit der Kristallstruktur des aktiven Zentrums des Enzyms. Bild mit freundlicher Genehmigung von Dongping Zhong.<sup>[29]</sup>

wie eine Solarzelle wirkt, indem es Licht absorbiert und die Anregungsenergie auf das  $\text{FADH}^-$  überträgt.<sup>[15–17, 24]</sup> Das Flavin ist der eigentliche Katalysator. Nach Anregung durch den Energietransfer vom Folat (und, weniger effizient, auch durch direkte Lichtabsorption) bewerkstelligt es die Reparatur des CPD-Schadens in einem radikalischen Mechanismus basierend auf einer zyklischen Redoxreaktion.<sup>[24, 26]</sup> Wir begannen eine Zusammenarbeit mit Johann Deisenhofer, um die strukturellen Voraussetzungen für den vorgeschlagenen Reparaturmechanismus aufzuklären und die Photolyase zu kristallisieren. Wir erhielten eine 3D-Struktur des Enzyms,<sup>[30]</sup> die in Abbildung 4 als Bänderdiagramm und Oberflächenladungsmodell dargestellt ist. Wie die biochemischen Experimente vorausgesagt hatten, wirkt das Folat wie eine Solarzelle: Es sitzt auf dem „Dach“ des Enzyms, absorbiert dort Licht und überträgt die Lichtenergie auf den Flavinkofaktor, der sich im Inneren des Enzyms befindet, um dort die katalytische Reaktion auszuführen. Mit den gewonnenen Strukturdetails wurde dann der Mechanismus der Photolyase entwickelt (Abbildung 5):<sup>[31]</sup> Die Photolyase bindet DNA, wenn diese einen CPD-Schaden enthält, weil das T <> T-Dimer das Rückgrat der DNA deformiert. Nach der Bindung an die geschädigte DNA über ionische Interaktionen zwischen der positiv geladenen Furche der Photolyase und dem negativ geladenen Phosphordiester-Rückgrat der DNA zieht das Enzym das T <> T-Dimer aus der Helix heraus in das Innere



**Abbildung 4.** Kristallstruktur der Photolyase aus *E. coli*. Links: Bändermodell. Rechts: Darstellung der Oberflächenladung. Positiv und negativ geladene Reste sind blau bzw. rot dargestellt. Das Phosphodiester-Rückgrat des geschädigten DNA-Strangs bindet an die positiv geladene, schräglauende Furche an der Oberfläche des Enzyms. Der gestrichelte Kasten markiert die Öffnung, in der sich der katalytische Kofaktor  $\text{FADH}^-$  befindet. Aus Lit. [30].

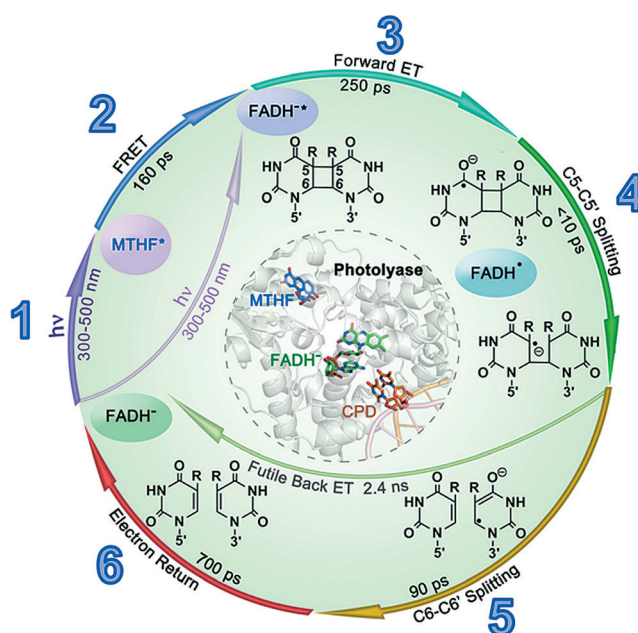


**Abbildung 5.** Reaktionsmechanismus der Photolyase. Das Enzym bildet ionische Wechselwirkungen mit den Phosphatresten des geschädigten DNA-Strangs aus und dreht das Thymindimer-Dinukleotid heraus in den Hohlraum des aktiven Zentrums, sodass das  $\text{T} < > \text{T}$ -Dimer in Van-der-Waals Kontakt zum  $\text{FADH}^-$  kommt. Die katalytische Reaktion wird durch die Absorption eines Photons (300–500 nm) durch das Folat (MTHF) ausgelöst. MTHF befindet sich im angeregten Singulett-Zustand und überträgt die Anregungsenergie auf das  $\text{FADH}^-$  durch einen Förster-Resonanzenergietransfer (FRET). Das nun im angeregten Zustand befindliche  $\text{FADH}^-$  spaltet den Cyclobutan-Ring in einer zyklischen Redoxreaktion und wandelt das  $\text{T} < > \text{T}$ -Dimer in ein  $\text{T}-\text{T}$ -Basenpaar um, wonach das Enzym von der reparierten DNA dissoziiert. Die Vergrößerung zeigt die Abstände zwischen den eingezeichneten Atomen von  $\text{FADH}^-$  und dem Cyclobutan-Pyrimidin-Dimer (CPD). Bild mit freundlicher Genehmigung von Dongping Zhong.<sup>[29, 33]</sup>

des Enzyms, sodass das  $\text{T} < > \text{T}$ -Dimer in Van-der-Waals-Kontakt zum  $\text{FADH}^-$  kommt. Es bildet sich ein stabiler Komplex, und nichts passiert bis das Folat ein Photon absorbiert und dessen Anregungsenergie auf den Flavinkofaktor überträgt. Das im angeregten Zustand befindliche Flavon,  $\text{FADH}^*$ , repariert das  $\text{T} < > \text{T}$ -Dimer in einer zyklischen Redoxreaktion, wonach das Enzym von der DNA dissoziiert,

um seine Suche nach anderen DNA-Schäden fortzusetzen und eine erneute Reparaturreaktion einzuleiten.

In den letzten Jahren haben wir intensiv mit Dongping Zhong an der Ohio State University zusammengearbeitet, um die mikroskopischen Geschwindigkeitskonstanten der DNA-Reparatur durch die Photolyase zu bestimmen. Wir bestimmten die Geschwindigkeit des Energietransfers, des Elektronentransfers, der Bindungsspaltung, der Bindungsbildung und des Elektronenrücktransfers in Echtzeit mit Pikosekunden-Auflösung (Abbildung 6).<sup>[29–35]</sup> Der gesamte katalytische Zyklus ist in 1.2 ns abgeschlossen, und das Enzym repariert ein  $\text{T} < > \text{T}$ -Dimer mit einer Quantenausbeute von 0.9.<sup>[29, 31, 34]</sup> Die Photolyasen gehören heute mit zu den am besten verstandenen Enzyme.



**Abbildung 6.** Die mikroskopischen Geschwindigkeitskonstanten der Photolyase wurden durch ultraschnelle zeitaufgelöste Absorptions- und Fluoreszenzspektroskopie bestimmt. Die Bindungsspaltung des Cyclobutanrings ist ein koordinierter asynchroner Mechanismus, der die Spaltung der C5-C5-Bindung in weniger als 10 ps mit der Spaltung der C6-C6-Bindung in 90 ps koppelt. Die gesamte photochemische Reaktion ist in 1.2 ns abgeschlossen, mit einer gesamten Quantenausbeute von ca. 0.9. Der innere Kreis zeigt die jeweilige Lage der Photoantenne (MTHF), des Katalysators ( $\text{FADH}^-$ ) und des Thymindimer-Substrats (CPD). Bild mit freundlicher Genehmigung von Dongping Zhong.<sup>[29, 33]</sup>

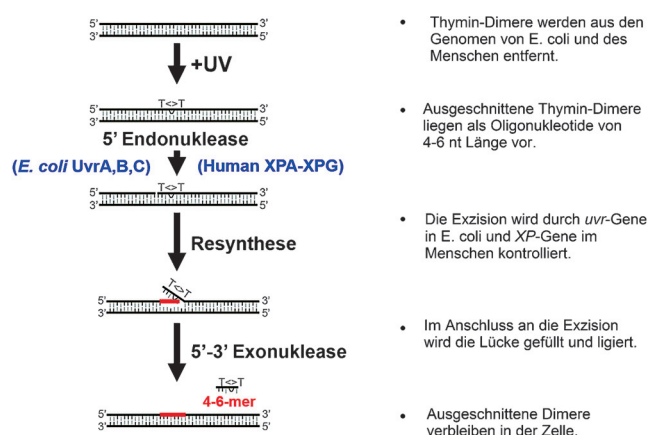
## Nukleotidexzisionsreparatur

### Exzisionsreparatur in *E. coli*

Die Arbeiten an den Photolyasen führten zur Entdeckung eines anderen großen DNA-Reparaturmechanismus, der in nahezu allen zellulären Organismen vorkommt, nämlich der Nukleotidexzisionsreparatur (Exzisionsreparatur). In frühen Arbeiten zur DNA-Photolyase wurden *E. coli*-Zellen in Suspension in einem Puffer mit UV-Licht bestrahlt. Die eine Hälfte wurde danach mit blauem Licht bestrahlt, die andere



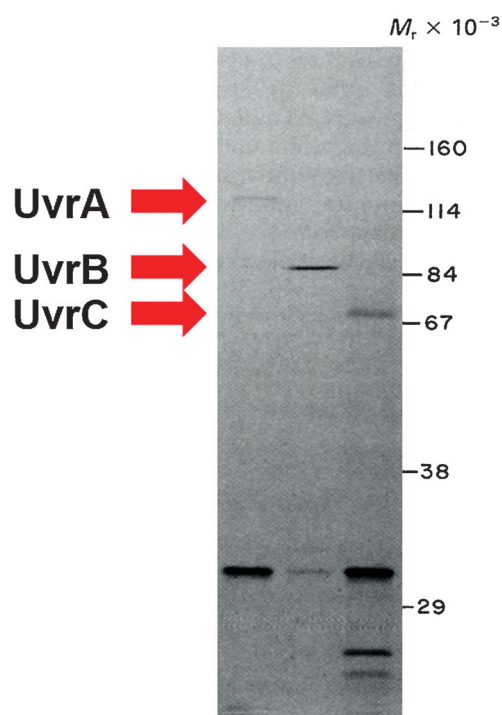
im Dunkeln gehalten. Es wurde gefunden, dass die mit UV-Licht induzierten T<>T-Dimere aus dem Genom der dem blauen Licht exponierten Zellen verschwunden waren. Im Genom der unbelichteten Kontrollzellen waren die T<>T-Dimere hingegen nicht beseitigt. Wurden die gleichen Experimente in einem Puffer durchgeführt, der Glukose als Energiequelle enthielt, führte die Inkubation der UV-bestrahlten *E. coli*-Zellen sowohl in der Dunkelheit als auch unter Licht zu einem Verschwinden der T<>T-Dimere im Genom.<sup>[36,37]</sup> Dennoch gab es einen fundamentalen Unterschied zwischen den beiden Zelltypen: In den lichtexponierten Zellen verschwanden die T<>T-Dimere komplett, so wie erwartet. In den unbelichteten Zellen verschwanden die T<>T-Dimere zwar aus dem Genom, aber sie akkumulierten quantitativ im Zytosol.<sup>[36–38]</sup> Dieses Resultat, das 1964 durch Paul Howard-Flanders<sup>[36]</sup> an der Yale University und Richard Setlow<sup>[37]</sup> am Oak Ridge National Laboratory erhalten wurde, führte zum Konzept der Nukleotidexzisionsreparatur. Weiterführende Studien verschiedener Forschungsgruppen führten zu den in Abbildung 7 dargestellten



**Abbildung 7.** Von 1964–1982 gültiges „Cut-and-Patch“-Modell für die Nukleotidexzisionsreparatur in *E. coli* und im Menschen unter Beteiligung von Endonukleasen/Exonukleasen mit gekoppelter Reparatursynthese.

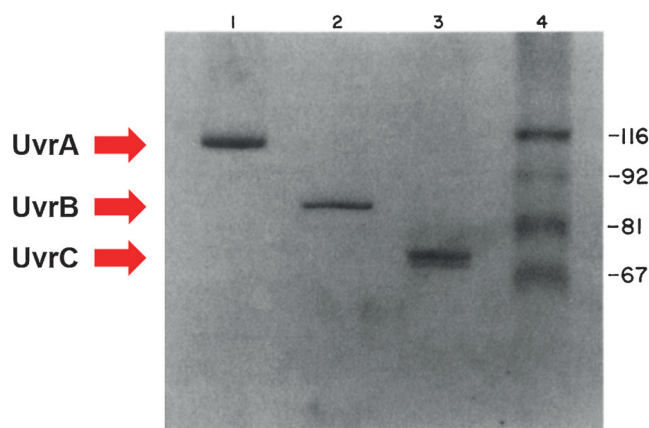
Überlegungen: T<>T-Dimere werden sowohl in *E. coli*-Zellen als auch in humanen Zellen aus dem Genom beseitigt (herausgeschnitten),<sup>[39,40]</sup> und zwar in Form eines 4 bis 6 Nukleotide langen Oligomers.<sup>[36,37,40–42]</sup> Sie bleiben aber in der Zelle und werden nicht exportiert. Die Exzisionsreparatur wird genetisch kontrolliert durch die *uvr*-Gene in *E. coli*<sup>[43]</sup> und die *XP*-Gene im Menschen.<sup>[44,45]</sup> Nach dem Ausschneiden wird die Reparaturlücke aufgefüllt und anschließend ligiert.<sup>[39,46]</sup> Von 1964–1982 war das allgemeine Modell für die Nukleotidexzisionsreparatur der „Cut-and-Patch“-Mechanismus,<sup>[47]</sup> wonach eine Endonuklease, die durch Uvr-Proteine in *E. coli* und XP-Proteine im Menschen kontrolliert wird, in 5'-Richtung zum T<>T-Dimer einschneidet. Anschließend wird das T<>T-Dimer durch eine Exonuklease entfernt; diese Reaktion ist an die Reparatursynthese gekoppelt, welche die Einzelstranglücke auffüllt. Abgeschlossen wird der Reparaturprozess durch Ligation der Reparaturstelle.

1977 schloss ich mich der Arbeitsgruppe von Dean Rupp an der Yale University an, um am Mechanismus der Nukleotidexzisionsreparatur in *E. coli* zu forschen. Ich erfand die Maxicell-Methode, mit der plasmidkodierte Proteine spezifisch radioaktiv markiert werden können.<sup>[48]</sup> Dies erlaubte es mir, die drei an der Exzisionsreparatur beteiligten Gene zu identifizieren und zu klonieren: *uvrA*, *uvrB* und *uvrC*.<sup>[49–51]</sup> Über die spezifische Funktion dieser Gene war zu dieser Zeit nichts bekannt. Ich fand heraus, dass die drei Gene für 100 kDa, 85 kDa und 66 kDa große Proteine kodierten (Abbildung 8). Mithilfe der Maxicell-Methode gelang es mir, die drei Proteine in Milligramm-Mengen aufzureinigen (Abbildung 9), und so konnte ich ihren Einfluss auf die Reparatur UV-geschädigter DNA detailliert studieren. Ich fand heraus, dass die UvrA,B,C-Proteine DNA basierend auf einem Mechanismus reparieren, der sich von dem klassischen Endonuklease/Exonuklease-Modell („Cut-and-Patch“) stark unterscheidet: Die drei Proteine arbeiten zusammen und führen einen konzertierten doppelten Einschnitt in präziser Distanz zum Photoprodukt aus.<sup>[52]</sup> Der Einschnitt erfolgt vom Schaden aus sieben Nukleotide in 5'-Richtung und drei Nukleotide



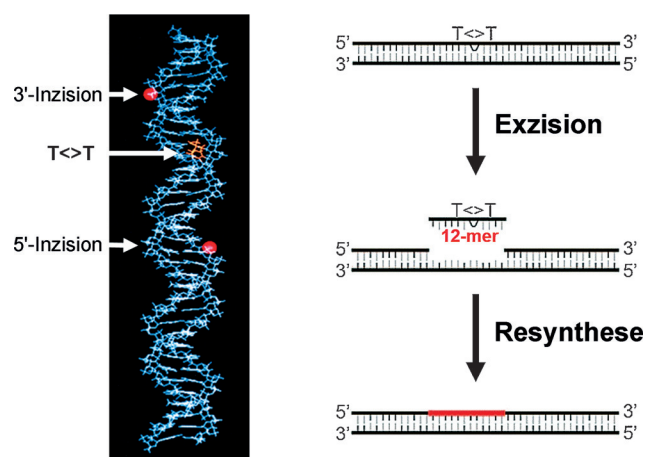
**Abbildung 8.** Identifizierung der Uvr-Proteine aus *E. coli*. Bei der Maxicell-Methode wird eine *recA<sup>-</sup>uvrA<sup>-</sup>*-Mutante, die das Plasmid mit dem zu untersuchenden Gen enthält, mit einer gemäßigten UV-Dosis bestrahlt. Das UV-Licht trifft die chromosomale DNA an mehreren Stellen, die viel kleineren Plasmide (typischerweise 500- bis 1000-mal kleiner) werden nicht getroffen. Dies führt zu einem Totalabbau der chromosomalen DNA in 6–12 Stunden und hinterlässt Zellen (Maxicellen), die nur Plasmid-DNA enthalten. Nun werden durch die Zugabe von radioaktiv markiertem <sup>35</sup>S-Methionin zum Medium nur die plasmidkodierte Proteine markiert, die anschließend durch Autoradiographie detektiert werden können. Gezeigt ist ein Autoradiogramm der drei in Maxicellen von *E. coli* exprimierten Proteine UvrA, UvrB und UvrC. Die niedermolekularen Banden sind Proteine, die von den Antibiotikaresistenzgenen Tetracyclin und Ampicillin kodiert werden. Aus Lit. [48–51].



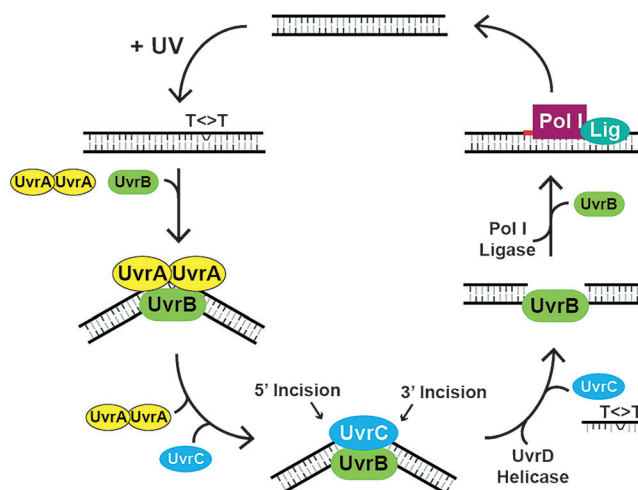


**Abbildung 9.** Aufreinigung der UvrA-, UvrB- und UvrC-Proteine. Die Proteine wurden aus Maxizellen aufgereinigt, welche die jeweiligen Proteine exprimieren. Die Aufreinigung wurde radiochemisch verfolgt. Die aufgereinigten Endprodukte wurden mit SDS-PAGE analysiert und mit Coomassie Blue angefärbt. Die letzte Spur zeigt den molekularen Größenmarker. Aus Lit. [52].

in 3'-Richtung, sodass insgesamt ein dodekamerer (12-merer) DNA-Einzelstrang herausgeschnitten wird, der das  $T \leftrightarrow T$ -Photoprodukt enthält. Das herausgeschnittene Oligonukleotid wird dann vom Doppelstrang entfernt, und die resultierende Lücke wird aufgefüllt und ligiert (Abbildung 10). Später, an der University of North Carolina, untersuchten wir die Funktion dieser drei Proteine in der Reparaturreaktion genauer. Wir fanden, dass UvrA und UvrB ATPasen sind, UvrC ist eine Nuklease. Wir führten detaillierte biochemische Studien durch, um den Reaktionsmechanismus zu entschlüsseln, der in Abbildung 11 dargestellt ist.<sup>[53–68]</sup> UvrA erkennt den Schaden und rekrutiert UvrB an die Schadenstelle. Dies führt zur Bildung eines stabilen UvrB-DNA-Komplexes in einer ATP-abhängigen Reaktion. UvrA dissoziiert dann vom



**Abbildung 10.** Exzision durch duale Inzision in *E. coli*. Die Proteine UvrA + UvrB + UvrC schneiden in Gegenwart von ATP +  $Mg^{2+}$  sieben Nukleotide 5' und drei bis vier Nukleotide 3' zum Thymindimer ( $T \leftrightarrow T$ ), wie im 3D-Modell (links) und in der Darstellung als Linien-diagramm (rechts) gezeigt. Die 12 bis 13 Nukleotide lange Lücke wird durch die Polymerase aufgefüllt und ligiert. Aus Lit. [82].



**Abbildung 11.** Der Reaktionsmechanismus der Exzisionsreparatur in *E. coli*. Der Schaden wird vom (UvrA)<sub>2</sub>-Homodimer erkannt, das als molekularer Verkoppler fungiert und UvrB an die Schadenstelle rekrutiert. Eine ATP-abhängige Reaktion fördert anschließend die Bildung eines sehr stabilen UvrB-DNA-Komplexes. Dieser Komplex rekrutiert UvrC, das 5' und 3' zum Schaden einschneidet, da die Nukleasen des aktiven Zentrums innerhalb der N-terminalen und C-terminalen Hälften des Proteins liegen. UvrC und das ausgeschnittene Dodekamer (12-mer) werden dann durch die UvrD-Helikase verdrängt. Die DNA-Polymerase I verdrängt UvrB und füllt die Lücke auf. Das Reparaturstück wird schließlich durch die DNA-Ligase verschlossen. Aus Lit. [65].

Komplex, und UvrB rekrutiert UvrC zur Schadenstelle. UvrC hat zwei katalytische Nukleasestellen, die den 5'- und 3'-Einschnitt in einer abgestimmten Reaktion durchführen.<sup>[69, 70]</sup> UvrC und das herausgeschnittene Oligomer diffundieren nun vom Doppelstrang weg, was durch die UvrD-Helikase eingeleitet wird.<sup>[61]</sup> Zum Schluss verdrängt die DNA-Polymerase I UvrB und füllt die Lücke auf. Das Reparaturstück wird durch die DNA-Ligase verschlossen.<sup>[67]</sup>

### Transkriptionsgekoppelte Reparatur

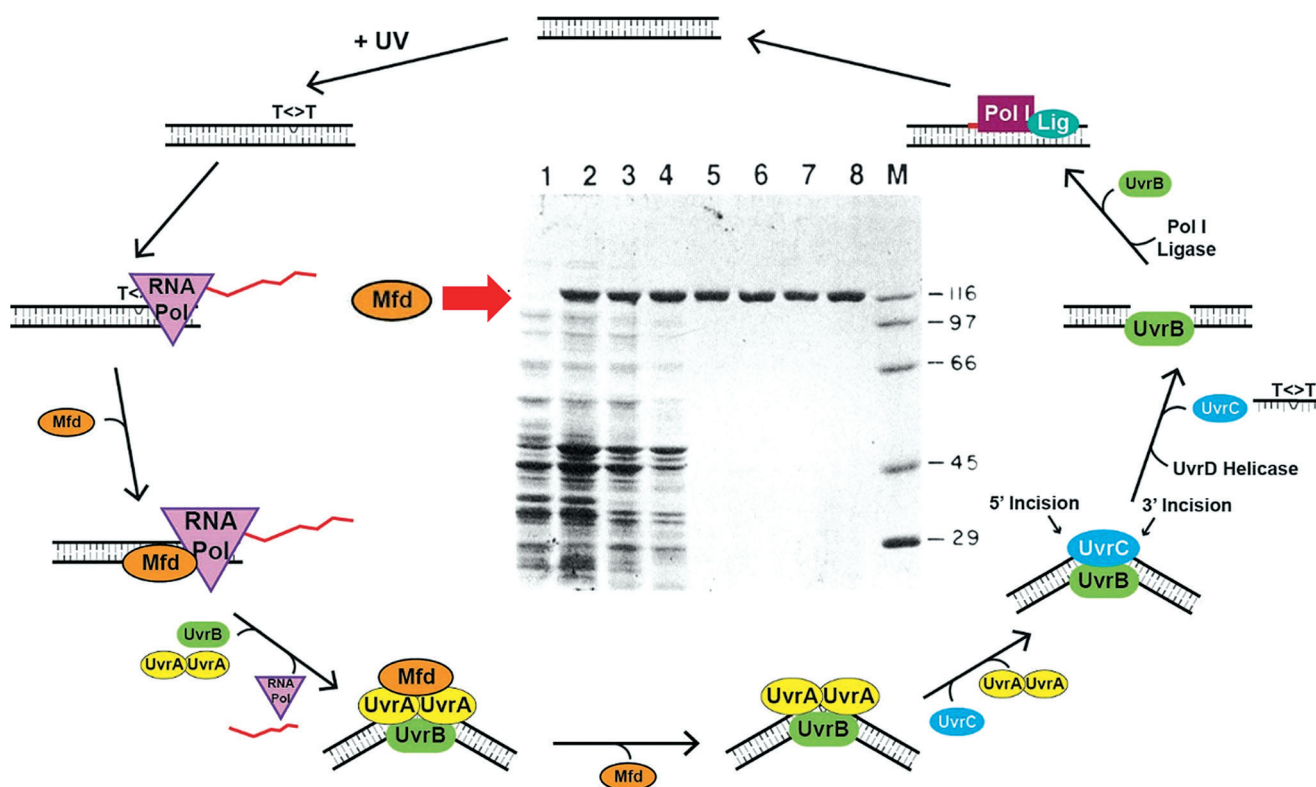
Während wir den Reaktionsmechanismus der Exzisionsnuklease (Excinuklease) aus *E. coli* charakterisierten, berichtete Philip Hanawalt von der Stanford University, dass Transkription die Reparatur in vivo stark stimuliert, und zwar sowohl in Säugerzellen als auch in *E. coli*.<sup>[71–73]</sup> Er postulierte, dass dies auf den Umstand zurückzuführen ist, dass die RNA-Polymerase die Schadenerkennung beschleunigt, welche der geschwindigkeitsbestimmende Schritt in der Nukleotidexzisionsreparatur ist. Wir begannen daraufhin mit der Untersuchung des Mechanismus der transkriptionsgekoppelten Reparatur in *E. coli* in einem definierten System. Hierzu verwendeten wir ein geschädigtes DNA-Substrat, aufgereinigte RNA-Polymerase und die UvrA,B,C-Proteine. Wir fanden heraus, dass ein DNA-Schaden das Voranschreiten der RNA-Polymerase blockiert – so wie es vorausgesagt war – und zur Bildung eines sehr stabilen RNA-Polymerase-Elongationskomplexes an der DNA-Schadenstelle führt. Entgegen der Erwartung, dass dieser eingefrorene Komplex die Reparatur beschleunigt, weil er ein großes Ziel für Reparaturenzyme

darstellt, fanden wir jedoch, dass die blockierte RNA-Polymerase die Reparatur nicht stimulierte, sondern hemmte – vermutlich, weil der Komplex verhindert, dass die Proteine UvrA, B und C an die Schadenstelle binden können.<sup>[74]</sup> Wir schlossen daraus, dass es einen weiteren unbekannten Faktor geben müsste, der zwei Funktionen ausführt. Der Faktor sollte erstens die DNA-Blockade beseitigen, die durch die stehengebliebene RNA-Polymerase aufgebaut wird, und zweitens die Proteine UvrA, B und C an die Schadenstelle rekrutieren, um so die Reparatur zu beschleunigen. Wir entwickelten einen biochemischen In-vitro-Assay, um diesen Kopplungsfaktor aufzureinigen zu können. Es gelang uns, ein Protein von 130 kDa aufzureinigen, das in der Tat beide Funktionen ausführte.<sup>[75–83]</sup> Wir nannten dieses Protein Transkriptions-Reparatur-Kopplungsfaktor (TRCF). Mit einem definierten System gelang es uns dann, den Reaktionsmechanismus der transkriptionsgekoppelten Reparaturreaktion in *E. coli* aufzuklären (Abbildung 12): TRCF ist eine Translokase, die stehengebliebene RNA-Polymerasen erkennt und von der geschädigten Stelle verdrängt, während sie gleichzeitig das Protein UvrA rekrutiert, um die Reparaturreaktion beschleunigt. Wir konnten auch zeigen, dass TRCF vom *mfd*-Gen (*mfd* = „mutation frequency decline“) kodiert wird, das

ursprünglich 1966 von Evelyn M. Witkin als ein bestimmte Arten von UV-induzierter Mutagenese verhinderndes Gen beschrieben wurde. Die Entdeckung der Äquivalenz von TRCF und Mfd ist die mechanistische Erklärung für den *mfd*<sup>–</sup>-Phänotyp, der zuvor 25 Jahre lang unerklärlich war.<sup>[84]</sup>

### Exzisionsreparatur im Menschen

Nachdem wir den Exzisionsreparaturmechanismus in *E. coli* 1987 weitgehend beschrieben hatten, begannen wir mit Arbeiten an der humanen Exzisionsreparatur. Zu dieser Zeit wurde angenommen, dass die humane Exzisionsreparatur durch einen 5'-Endonuklease/Exonuklease-Mechanismus („Cut-and-Patch“) bewerkstelligt wird, so wie es im klassischen *E. coli*-Modell beschrieben wurde (Abbildung 7).<sup>[47]</sup> Es war James Cleaver von der University of California in San Francisco, der 1968 beobachtete, dass Patienten mit der vererbten Krankheit Xeroderma Pigmentosum (XP) eine defekte Exzisionsreparatur aufweisen.<sup>[44]</sup> Diese Patienten sind sehr empfindlich gegen Sonnenlicht und haben eine etwa 5000-fache Wahrscheinlichkeit, an durch Sonnenlicht induziertem Hautkrebs zu erkranken (Abbildung 13). Die gene-

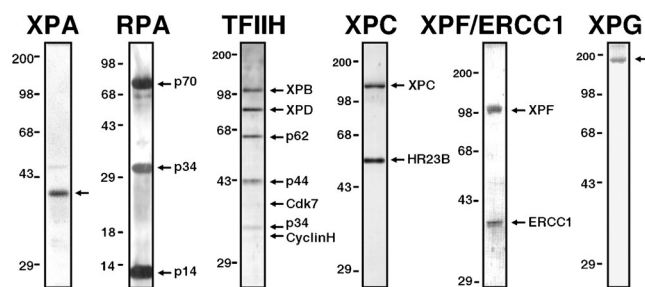


**Abbildung 12.** Der molekulare Mechanismus der transkriptionsgekoppelten Reparaturreaktion in *E. coli*. Die RNA-Polymerase stoppt, sobald sie auf das T < > T-Dimer im transkribierten DNA-Strang stößt. Der Ternärkomplex (DNA + RNA-Polymerase + RNA) ist über Stunden stabil. Das T < > T-Dimer innerhalb des Komplexes ist nicht zugänglich für UvrA, was dazu führt, dass die Reparatur gehemmt wird. Der Transkriptions-Reparatur-Kopplungsfaktor (TRCF; auch bekannt unter dem Namen Mfd) ist eine Translokase (aber keine Helikase) mit hoher Sequenzähnlichkeit zu UvrB und Affinität zur RNA-Polymerase. Mfd (TRCF) erkennt den blockierten Komplex und benutzt seine Translokaseaktivität, um die RNA-Polymerase mit der abgebrochenen RNA zu verdrängen. Wegen der Ähnlichkeit zu UvrB rekrutiert Mfd zeitgleich UvrA, was wiederum die Bildung eines transienten Mfd-UvrA-UvrB-DNA-Komplexes an der geschädigten Stelle fördert und die schnelle Bildung eines UvrB-DNA-Präinziationskomplexes erleichtert, gefolgt von der Rekrutierung von UvrC und der dualen Inzision. In der Bildmitte ist die Aufreinigung von Mfd (TRCF) aus Mfd-überexprimierenden Zellen dargestellt (SDS-PAGE und Anfärbung mit Coomassie Blue). Aus Lit. [77].

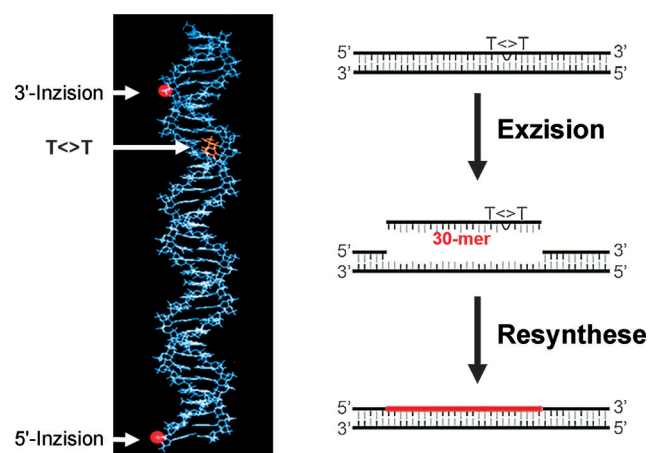


**Abbildung 13.** Patient mit Xeroderma Pigmentosum. Patienten, die keine XP-Reparaturproteine (XPA–XPG) besitzen, sind äußerst empfindlich gegen Sonnenlicht und sogar Weißlicht aus elektrischen Lichtquellen. XP-Patienten haben eine mehrere tausendfach höhere Wahrscheinlichkeit an Hautkrebs zu erkranken. Aus: J. Halpern et al., *Cases J.* 2008, 1, 254.

tische Analyse von XP-Patienten ergab, dass sieben Gene (bezeichnet als XPA bis XPG) für die Beseitigung UV-induzierter Photoprodukte verantwortlich sind.<sup>[45]</sup> Basierend auf unseren Kenntnissen der Exzisionsreparatur in *E. coli* begannen wir, die humane Exzisionsreparatur zu charakterisieren.<sup>[85]</sup> Von Anfang an fanden wir, dass ebenso wie in *E. coli* die Exzisionsreparatur im Menschen auf einer dualen Inzision basiert und nicht dem konventionellen Modell folgt.<sup>[86–91]</sup> Bis auf diese Tatsache stellte sich heraus, dass sich der humane Exzisionsreparaturmechanismus stark vom *E. coli*-System unterscheidet.<sup>[87–126]</sup> Zunächst einmal sind im Menschen nicht nur drei Proteine (UvrA, B, C), sondern 16 Proteine in sechs Reparaturfaktoren notwendig,<sup>[93,97]</sup> um die duale Inzision auszuführen (Abbildung 14). Weiter stellte sich heraus, dass die humanen Proteine mit den Exzisionsreparaturproteinen in *E. coli* nicht evolutionär verwandt sind. Obwohl in beiden Spezies das Prinzip der dualen Inzision realisiert ist, unterscheiden sich die Mechanismen stark. Während in *E. coli* die 5'-Inzision sieben Nukleotide und die 3'-Inzision drei Nukleotide vom Schaden erfolgt, wird bei der humanen Exzisionsreparatur 20–22 Nukleotide zum 5'-Ende und fünf Nukleotide zum 3'-Ende relativ zum Schaden geschnitten. Insgesamt wird ein Oligomer von 27–30 Basen Länge herausgeschnitten.<sup>[86]</sup> Das unterscheidet sich stark von dem aus 12–13 Basen bestehenden Oligomer bei *E. coli* (Abbildung 15). Auch der Mechanismus der Schadenerkennung und -prozessierung ist sehr verschieden: Während in *E. coli* die Schadenerkennung durch UvrA erfolgt, wird beim Menschen der Schaden durch die Proteine RPA, XPA und XPC erkannt, mit nachfolgender Rekrutierung von TFIIH. Letzteres enthält die Helikasen XPB und XPD, welche die DNA entwinden und die Nukleasen XPG und XPF für die nachfolgenden 3'- und 5'-Inzisionen rekrutieren. Der dualen Inzision folgt die Freisetzung des 30 Nukleotide langen ausgeschnittenen Oligomers, das Auffüllen der Einzelstranglücke und die Ligation durch die DNA-Polymerase und Ligase,



**Abbildung 14.** Exzisionsreparaturfaktoren im Menschen. Sechs Reparaturfaktoren bestehend aus insgesamt 16 Proteinen werden für die duale Inzision im Menschen benötigt. Zu beachten ist, dass der Faktor RPA auch in der Replikation und Rekombination eine Rolle spielt. TFIIH besteht aus acht weiteren Untereinheiten zusätzlich zu den XPB- und XPD-Helikasen und ist ein allgemeiner Transkriptionsfaktor für die Initiation der Transkription durch die RNA-Polymerase II. Die humanen Exzisionsreparaturproteine sind nicht evolutionär verwandt mit den prokaryotischen Proteinen. Gezeigt sind die mit SDS-PAGE aufgetrennten und mit Silber angefärbten Reparaturfaktoren. Aus Lit. [93,97].



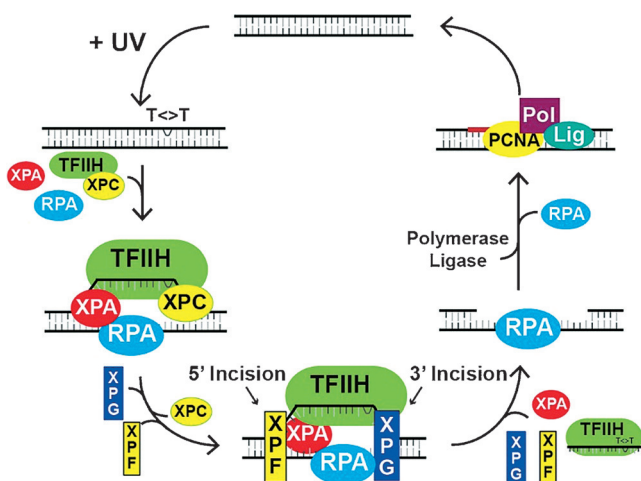
**Abbildung 15.** Exzision durch duale Inzision im Menschen. Im Menschen werden Thymindimere ( $T < > T$ ) und andere sperrige Basenaddukte durch die duale Inzision entfernt. Die Einschnitte befinden sich  $20 \pm 5$  Phosphodiesterbindungen zum 5'-Ende und  $6 \pm 3$  Phosphodiesterbindungen zum 3'-Ende vom DNA-Schaden entfernt, was zu einem 24–32 nt langen Oligonukleotid führt (symbolisch als 30-mer bezeichnet). Links: Stellen für die duale Inzision in einem 3D-Modell der DNA. Rechts: Schema der humanen dualen Inzision gefolgt von der Reparatursynthese und Ligation. Aus Lit. [82,86].

die also ein 30 Nukleotide langes Reparaturoligonukleotid erzeugen.<sup>[102]</sup> Abbildung 16 fasst unser derzeitiges Modell des Mechanismus der humanen Nukleotidexzisionsreparatur zusammen. In jüngster Zeit führten uns diese Arbeiten zu Studien anderer zellulärer Antworten auf DNA-Schäden, einschließlich Schaden-Checkpoints.<sup>[127–130]</sup>

#### Die Exzisionsreparaturkarte des Humangenoms in Einzelnukleotidauflösung

Unsere Entdeckung der Exzision eines 30-meren Oligonukleotids durch die humane Nukleotidexzisionsreparatur in



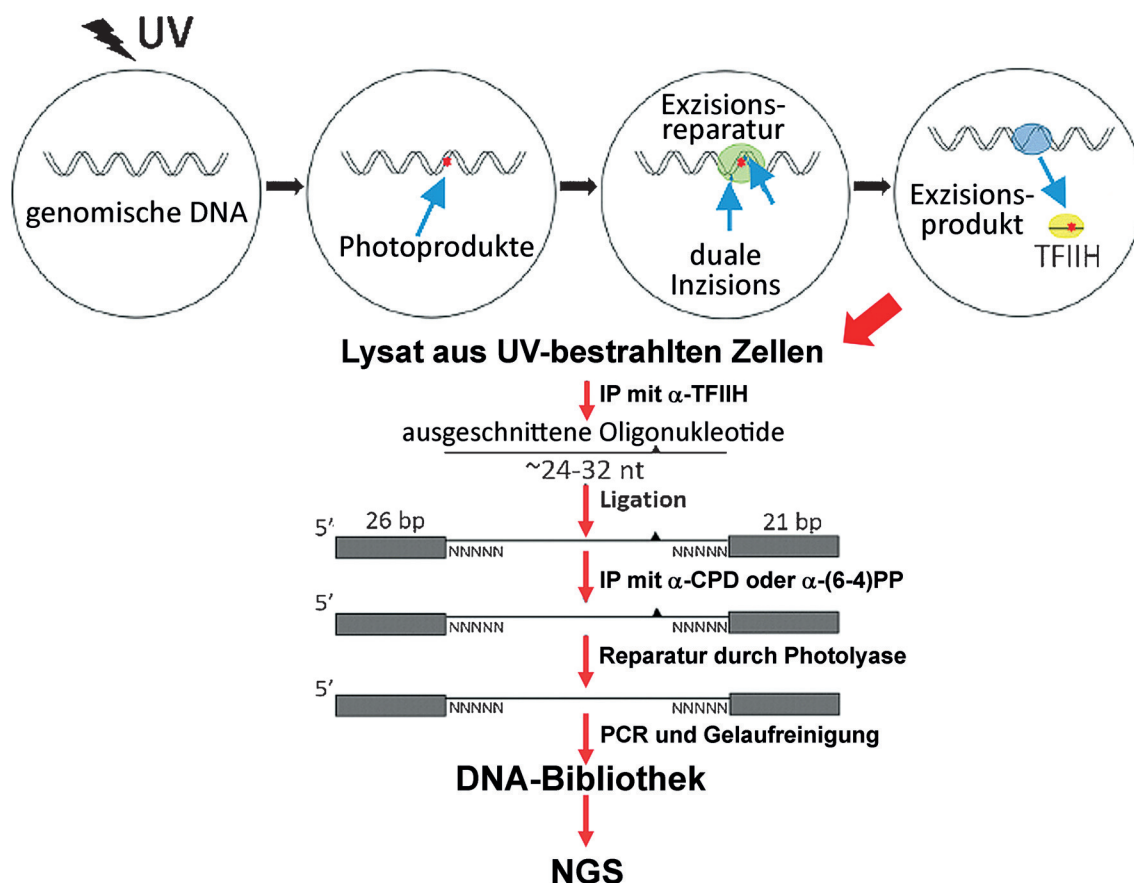


**Abbildung 16.** Reaktionsmechanismus des humanen Exzisionsnukleasystems. Der Schaden wird durch kooperative Wechselwirkungen der Proteine RPA, XPA und XPC erkannt, anschließend erfolgt die Rekrutierung von TFIIH. Die Helikase-Aktivität des TFIIH trägt durch kinetisches Korrekturlesen zum größten Teil zur Spezifität bei und führt zur Bildung eines stabilen Komplexes, aus dem XPC ausgestoßen wird. Zu beachten ist, dass XPC eine ähnliche Rolle wie UvrA in *E. coli* spielt, da beide eine wichtige Funktion in der Schadenerkennung haben. XPC verlässt den Komplex, damit weitere Schritte stattfinden können (molekularer Kuppler). Gleichzeitig mit der Dissoziation von XPC werden die XPG- und XPF-Nukleasen rekrutiert, um die 3'- und 5'-Einschnitte in einer koordinierten Reaktion durchzuführen. Das ausgeschnittene „30-mer“ wird als Komplex mit TFIIH freigesetzt. Die Einzelstranglücke wird durch die DNA-Polymerase mit einem 30 nt langen Reparaturoligonukleotid aufgefüllt und ligiert. Aus Lit. [116].

Zellextrakten und mit rekonstituierten Enzymsystemen wurde durch andere Gruppen bestätigt. Jedoch widersprachen diese Beobachtungen verschiedenen Berichten, wonach die herausgeschnittenen T<>T-Dimere in Form eines DNA-Oligomers mit einer Länge von nur 4 bis 6 Nukleotiden in humanen Zellen vorlägen.<sup>[40–42]</sup> Diese Diskrepanz zwischen den In-vivo- und In-vitro-Daten blieb über zwei Jahrzehnte ungeklärt. Die Lösung des Problems brachten In-vitro-Studien zum Schicksal des ausgeschnittenen 30-mers mithilfe zellfreier Extrakte und einer rekonstituierten Reparaturreaktion. Wir fanden, dass sich das herausgeschnittene 30-mer, das vom Doppelstrang freigesetzt wird, in vitro in einem festen Komplex mit TFIIH befindet,<sup>[131,132]</sup> und wir vermuteten, dass dies auch in vivo der Fall sein müsste. Um diese Hypothese zu untersuchen, bestrahlten wir humane Zellen, und nach einer Inkubationsphase von 1–6 Stunden, in der Reparatur stattfinden konnte, lysierten wir die Zellen, immunpräzipitierten TFIIH und analysierten das mit TFIIH assoziierte DNA-Fragment. Wir fanden, dass die in vivo generierten Exzisionsprodukte tatsächlich 30 Nukleotide lang waren, entsprechend dem Oligomer aus der In-vitro-Reaktion.<sup>[133–137]</sup> Nach einer längeren Inkubationsphase wird das ursprüngliche Exzisionsprodukt zu kürzeren, < 10 nt langen Fragmenten abgebaut. Das erklärt die früheren In-vivo-Studien, in denen herausgeschnittene Oligonukleotide üblicherweise 24 Stunden nach Bestrahlung der Zellen isoliert wurden.

Die Isolierung des ursprünglichen Exzisionsprodukts löste nicht nur die scheinbare Diskrepanz zwischen den In-vitro- und In-vivo-Exzisionsreaktionen auf, sondern ermöglichte uns auch, eine Reparaturkarte für das gesamte Humangenom zu erstellen (Abbildung 17).<sup>[138]</sup> Nach Belichtung von Zellen mit UV-Licht und Inkubation dieser Zellen für eine gewisse Zeit, um Reparatur zu ermöglichen, lysierten wir die Zellen und immunpräzipitierten TFIIH, um die damit assoziierten herausgeschnittenen Oligomere zu isolieren. Die herausgeschnittenen Oligomere wurden dann mithilfe modernster Sequenzieretechniken der nächsten Generation (NGS) sequenziert. In einem typischen Experiment erhielten wir 15–20 Millionen Reads, die mit dem Humangenom abgeglichen wurden, um die Lage aller herausgeschnittenen Oligomere zu ermitteln und die Reparaturkarte zu erstellen. Abbildung 18 zeigt die Reparaturkarte der 22 somatischen und zwei Geschlechterchromosomen für ein männliches Individuum. Die schwarzen Spuren repräsentieren Transkription, die grünen Spuren repräsentieren die Reparaturstellen der beiden Photoproducte für die beiden Stränge über das gesamte Genom. Die Abbildung ist eine Momentaufnahme der Reparaturkarte für ein gesamtes Genom. Allerdings geben diese Daten kaum Informationen über die bestimmenden Faktoren des Reparaturmodus und der Reparaturrate an einem bestimmten Genlocus preis. Konzentriert man sich auf ein spezifisches Chromosom in unterschiedlichen Auflösungen, wird deutlicher, welcher Art die in dieser Karte vorhandenen Informationen sind. Abbildung 19 zeigt die Reparaturkarte des Chromosoms 17. Dieses Chromosom ist 83 Megabasen lang und enthält das *p53*-Gen, welches in etwa 50 % aller humanen Krebse mutiert ist. Die Karte zeigt die Transkripte entlang des gesamten Genoms in beiden Strängen als schwarze Spuren und die Exzisionsreparatur (XR-seq) für beide Stränge als blaue Spuren. Die Reparaturkarte ist eine Karte im echten, geographischen Sinne. Es gibt Berge, Täler und Schluchten, entsprechend Regionen mit hoher, niedriger oder ohne Reparatur. Wichtig ist nun, dass man mit solchen Karte die Frage nach dem Reparaturmodus und der Effizienz an einem gegebenen Nukleotid im Genom beantworten kann. Ein Beispiel: Abbildung 19 zeigt die Transkriptions- und Reparaturkarten für *p53* in Kilobasenauflösung (Mitte). In Einzelbasenauflösung (unten) zeigt die Karte die Reparatureffizienz und den Reparaturmodus eines Mutations-Hotspots in *p53* an einer T-T-Dinukleotidposition (7,577,150–7,577,151). Das Thymindimer an dieser Position wird durch Inzision 20 Nukleotide zum 5'-Ende und vier Nukleotide zum 3'-Ende relativ zum Photoprodukt beseitigt. Es wird deutlich, dass eine solche Karte viel mehr Information bezüglich der bestimmenden Faktoren der Reparatur von UV-Schäden an einer beliebigen Stelle im Genom liefert. Noch wichtiger ist die Tatsache, dass die Nukleotidexzisionsreparatur auch DNA-Schäden repariert, die durch das wichtige Antikrebsmedikament Cisplatin erzeugt werden. Wir sind derzeit damit befasst, eine genomweite Reparaturkarte für Cisplatin-Schäden von normalen Zellen und Krebszellen zu generieren, und wir hoffen, dass die darin enthaltenen Informationen für die Krebstherapie nützlich sein werden.

Fassen wir unsere Arbeiten zur Exzisionsreparatur zusammen (Abbildung 20):<sup>[67,68,82,83,120,121,124]</sup> Die Reparatur wird



**Abbildung 17.** Die XR-seq-Methode („excision repair-sequencing“) zur Generierung einer humanen Exzisionsreparaturkarte. Die mit UV-Licht bestrahlten Zellen werden lysiert, gefolgt von einer Inkubationszeit und der Immunpräzipitation von TFIID. Die herausgeschnittenen Oligonukleotide (24–32 nt), die mit TFIID assoziiert sind, werden extrahiert und an Adaptoren ligiert. Oligonukleotide, die CPDs oder (6-4)-Pyrimidin-Pyrimidon-Photoproducte enthalten, werden anschließend mit den jeweiligen Photoprodukt-Antikörpern immunpräzipitiert. Die Photoproducte werden durch die entsprechenden Photolyasen repariert. Die Oligonukleotide werden dann mithilfe von PCR amplifiziert und mittels Gelelektrophorese aufgereinigt. Die aufgereinigten Oligomere wurden mit Sequenzieretechniken der nächsten Generation (NGS) unter Verwendung des Illumina HiSeq 2000 Systems sequenziert. Aus Lit. [138].

durch duale Inzision des DNA-Doppelstrangs ausgelöst, sowohl in *E. coli* als auch beim Menschen. Die Inzision generiert ein 12–13 nt langes Einzelstrangstück in *E. coli* und ein ungefähr 30 nt langes Einzelstrangstück im Menschen. Die duale Inzision benötigt die Proteine UvrA, B und C in *E. coli* und sechs Reparaturfaktoren mit insgesamt 16 Proteinen im Menschen, darunter die von den Genen *XPA* bis *XPG* kodierten Proteine. Nach Exzision der Oligonukleotide wird die gebildete Lücke durch die DNA-Polymerase aufgefüllt und ligiert, entsprechend einem 12–13 nt langen Flicker in *E. coli* und einem ungefähr 30 nt langen Flicker im Menschen. Durch Isolieren des herausgeschnittenen 30-mer als Produkt der humanen Nukleotidexzisionsreparatur in vivo gelang es uns schließlich, eine Exzisionsreparaturkarte von UV-Schäden des gesamten Humangenoms zu generieren.

### Cryptochrome und die zirkadiane Uhr – der Kreis schließt sich

Ich möchte diese Präsentation mit Ausführungen darüber abschließen, wie unsere Arbeiten über Photolyasen dazu

beigetragen haben, Cryptochrome als essentielle Komponenten der zirkadianen Uhr der Säugetiere zu identifizieren und wie die zirkadiane Uhr die Nukleotidexzisionsreparatur bei Säugetieren reguliert. Damit verknüpfen wir die beiden Themen unserer langjährigen Forschungen, die Photolyasen und die Nukleotidexzisionsreparatur.

### Entdeckung der Cryptochrome in Säugetieren

Ich habe oben die Exzisionsreparaturmechanismen im Menschen und in *E. coli* beschrieben, aber bezüglich der Photolyasen bin ich nur auf *E. coli* eingegangen. Das liegt daran, dass Menschen keine Photolyase besitzen.<sup>[139]</sup> Tatsächlich war nach der Entdeckung der Photolyasen in *E. coli* das Vorkommen von Photolyasen in Menschen 30 Jahre lang Gegenstand der Kontroverse. Einige Forscher berichteten, dass Photolyase in menschlichen Zelllinien nicht nachzuweisen war, andere beschrieben hingegen eine robuste Photolyaseaktivität in humanen Zellen sowie die Aufreinigung des Enzyms bis zur Homogenität aus menschlichen weißen Blutzellen.<sup>[140]</sup> Nachdem wir 1980 einen hochempfindlichen

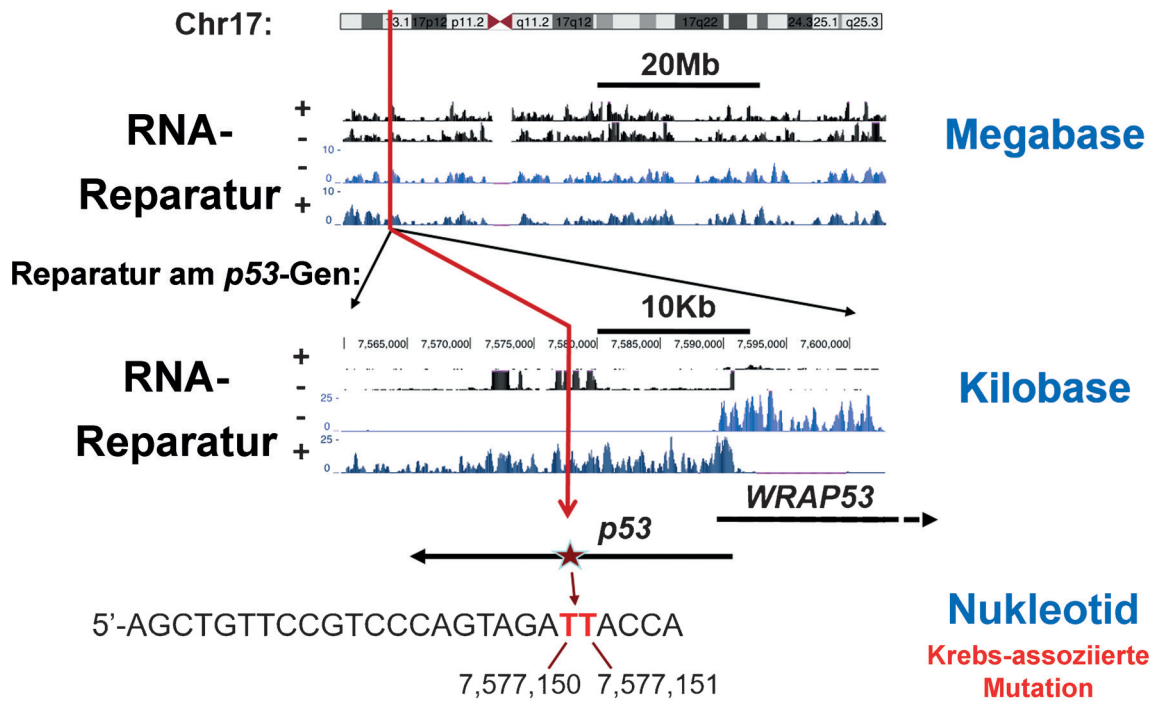


**Abbildung 18.** Die Exzisionsreparaturkarte des gesamten Humangenoms. Die grünen Spuren zeigen die Lage der Reparaturstellen für CPD und (6-4)PP in beiden Strängen der Duplex-DNA über alle Chromosomen des menschlichen NHF1-Zellgenoms (männlich). Zum Vergleich sind die ENCODE RNA-Seq-Spuren (schwarz) über den XR-Seq-Spuren dargestellt. Chromosom 17 (rot eingrahmt) trägt das *p53*-Gen, das in fast 50% aller Krebse mutiert ist. Aus Lit. [138].

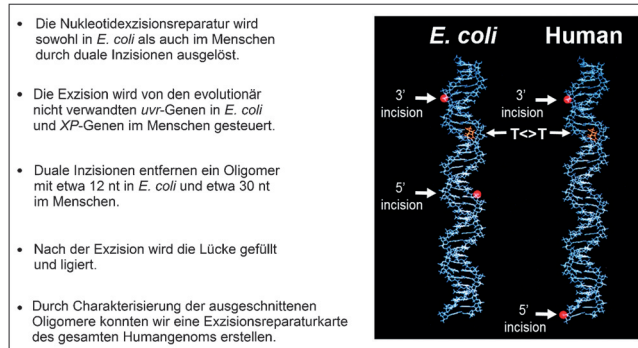
und spezifischen Assay für Photolyase entwickelt hatten, gingen wir daran, diese Kontroverse aufzulösen. Wir begannen eine intensive Suche nach Photolyasen in frisch isolierten menschlichen weißen Blutzellen. Wir konnten keine Photolyaseaktivität entdecken und publizierten dieses Ergebnis 1993<sup>[139]</sup> mit der klaren Aussage, dass Menschen keine Photolyase besitzen (Abbildung 21). Allerdings wurde zwei Jahre später in einer der ersten Veröffentlichungen des Humangenomprojekts eine der ESTs („expressed sequence tags“) als Photolyasehomolog gelistet.<sup>[141]</sup> Wir schlossen daraus, dass wir die Photolyaseaktivität in unserer früheren Arbeit möglicherweise übersehen hatten und begannen, die Funktion dieses Gens genauer zu untersuchen. Wir besorgten uns den cDNA-Klon, exprimierten das Protein und analysierten seine Funktion. Noch während diese Arbeiten im Gange waren, entdeckten wir ein zweites Photolyasehomolog im menschlichen Genom. Wir besorgten uns die gesamte cDNA der beiden Gene, die den Photolyasen aus *E. coli* sowohl auf der Sequenzebene als auch bezüglich der 3D-Strukturen bemerkenswert ähnlich waren (Abbildung 21). Wir exprimierten die beiden Proteine und reinigten sie auf, um dann festzustellen, dass beide keine Photolyaseaktivität besaßen. Daraus schlossen wir, dass es sich bei diesen beiden Genprodukten nicht um Photolyasen, sondern um Photolyaseparaloge han-

delt. Diese Arbeit schlossen wir im April 1996 ab, weil wir aber nichts über die Funktion der Paraloge wussten, zögerten wir, unsere Ergebnisse zu publizieren (Abbildung 22). Im Mai 1996 reiste ich wie jedes Jahr zu meinen Eltern in die Türkei. Auf dem Rückflug las ich im Bordmagazin einen Artikel von William Schwartz zum Thema Jetlag mit dem Titel „Internal Timekeeping“.<sup>[142]</sup> Ich glaube, dies war das erste Mal, dass ich etwas über die zirkadiane Uhr erfahren habe. In dem Artikel wurde erwähnt, dass Licht die zirkadiane Uhr mit der physikalischen Uhr synchronisiert und dass die zirkadiane Uhr besonders empfindlich für blaues Licht ist. Ich hielt es für möglich, dass die menschlichen Photolyaseparaloge Clock-Proteine sein könnten, die empfindlich für blaues Licht sind. Nach meiner Rückkehr ins Labor schlug ich meinen Mitarbeitern vor, dass wir unsere Daten nun publizieren und die humanen Photolyaseparaloge in Analogie zu den Blaulichtphotorezeptoren der Pflanzen Cryptochrome nennen sollten.<sup>[143]</sup> Ich schlug außerdem vor, die humanen Cryptochrome (CRY1 und CRY2) als zirkadiane Clock-Proteine zu beschreiben.<sup>[144]</sup> Wir schrieben das Paper und reichten es im August zur Publikation ein; es wurde im November 1996 publiziert.<sup>[144]</sup> Wir gingen dann einen Schritt weiter und versuchten, unsere Hypothese zu beweisen.<sup>[145]</sup> Dazu analysier-





**Abbildung 19.** Exzisionsreparatur in Einzelbasenauflösung. Die Transkriptions- und Reparaturkarten des Chromosoms 17 einer XP-C-mutierten Zelllinie, die nur die transkriptionsgekoppelte Reparatur durchführen kann, sollen den drastischen Effekt der Transkription auf die Reparatur veranschaulichen. Die rote Linie zeigt die Position des Mutations-Hotspots im *p53*-Gen an. Oben: Transkriptions- und Reparaturkarten in Megabasenauflösung. Mitte: Transkriptions- und Reparaturkarten in Kilobasenauflösung. Zu beachten ist das starke Reparatursignal im transkribierten DNA-Strang der *p53*- und *WRAP53*-Gene, im Gegensatz zu der kaum vorhandenen Reparatur im nicht-transkribierten DNA-Strang. Unten: Reparaturmuster eines Mutations-Hotspots an einer T > T-Dinukleotidposition (7,577,150–7,577,151). Das Photodimer wird in Form eines 26-mers durch duale Inzision 20 Nukleotide zum 5'-Ende und der vier Nukleotide zum 3'-Ende relativ zum Dimer entfernt. Aus Lit. [138].

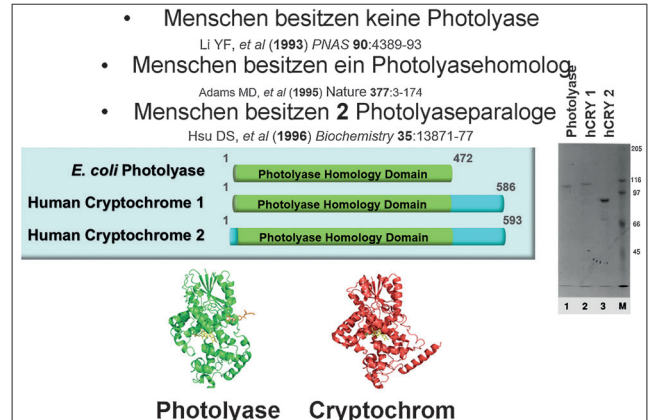


**Abbildung 20.** Exzisionsreparatur in *E. coli* und im Menschen. In beiden Organismen erfolgt die Reparatur durch duale Inzision, allerdings unterscheiden sich die Proteine für die duale Inzision, der Mechanismus der Schadenerkennung und das Muster der dualen Inzision völlig.

ten wir Mäuse mit abgeschalteten *CRY*-Genen auf ihr zirkadianes Verhalten.

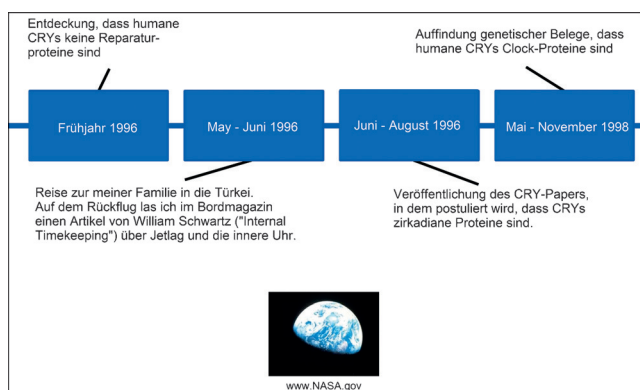
### Die zirkadiane Uhr

Bevor ich die Daten zu den *CRY*-Knockout-Mäusen vorstelle, möchte ich kurz die Funktionsweise der zirkadianen Uhr zusammenfassen (Abbildung 23).<sup>[146–149]</sup> Allgemein ist



**Abbildung 21.** Die Verbindung zwischen Photolyase und Cryptochrom. Oben: Entscheidende Veröffentlichungen, die zur Entdeckung der humanen Cryptochrome geführt haben. Mitte: Sequenzähnlichkeiten zwischen der Photolyase aus *E. coli* und den humanen Cryptochromen 1 und 2. Unten: Die 3D-Strukturen der Photolyase aus *E. coli* und des Cryptochroms 1 aus *Arabidopsis* zeigen die Gemeinsamkeiten in der zur Photolyase homologen Domäne (aus C. A. Brautigam et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, 101, 12142–12147). Rechte Seite (aus Lit. [144]): aufgereinigte Photolyase aus *E. coli*, hCRY1 und hCRY2, analysiert durch SDS-PAGE und anschließendes Anfärben mit Coomassie Blue.

eine Uhr ein Instrument bzw. System zur Zeitmessung. Die zirkadiane Uhr funktioniert so ähnlich wie die uns vertrauten



**Abbildung 22.** Abfolge der Ereignisse, die zur Entdeckung der humanen CRY-Proteine als zirkadiane Clock-Proteine geführt haben. Zunächst wurde vorhergesagt, dass CRY das blaublichtsensorische Protein im zirkadianen Rhythmus darstellt, genetische Analysen offenbarten dann, dass CRY ein wichtiges „Zahnrad“ der zentralen Clock-Maschinerie ist.

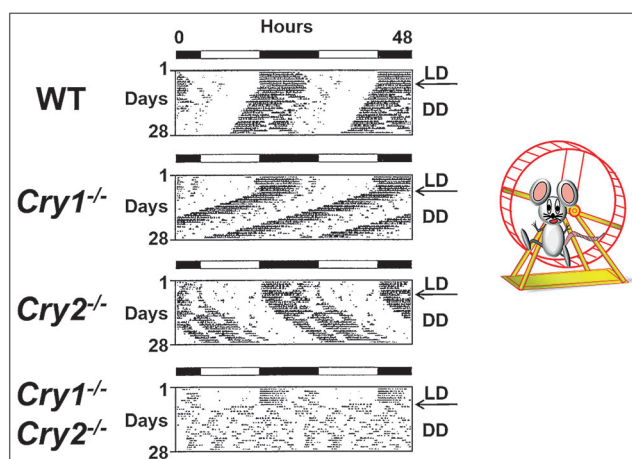
- Eine Uhr ist ein Gegenstand oder ein System zur Zeiterfassung
- mechanisch
  - elektronisch
  - molekular (innere/zirkadiane Uhr)
- Die zirkadiane Uhr ist ein molekularer Mechanismus, der den Tagesrhythmus biochemischer, physiologischer und verhaltensbezogener Funktionen unabhängig von äußeren Einwirkungen aufrechterhält.

**Abbildung 23.** Analogie zwischen mechanischen/elektronischen Uhren und der zirkadianen Uhr. Ebenso wie mechanische und elektrische Uhren misst die zirkadiane Uhr die Zeit unabhängig von externen Reizen. Der Unterschied ist, dass die zirkadiane Uhr statt aus Getrieben und elektronischen Schaltkreisen aus Molekülen aufgebaut ist.

Uhren, die auf mechanischen oder elektronischen Prinzipien beruhen. Die zirkadiane Uhr hat ein ganz ähnliches Designprinzip – mit dem Unterschied, dass die Bestandteile der Uhr Moleküle sind und ihre Funktion darin besteht, uns über die Tageszeit zu informieren. Indem sie das tut, hält die zirkadiane Uhr unseren Tagesrhythmus an biochemischen, physiologischen und auch verhaltenstechnischen Funktionen aufrecht – und dies sogar in Abwesenheit äußerer Reize.

### Die Rolle der Cryptochrome in der zirkadianen Uhr

Um zu testen, ob die CRYs zirkadiane Clock-Proteine sind, generierten wir Mäuse mit Mutationen in entweder *CRY1* oder *CRY2* oder in beiden Genen. Wir analysierten die Funktionsweise der zirkadianen Uhr in Mäusen, indem wir ihre Aktivität in einem Hamsterrad über 28 Tage beobachteten.<sup>[150,151]</sup> Während der ersten Woche wurden die Mäuse 12 Stunden Licht und 12 Stunden Dunkelheit ausgesetzt



**Abbildung 24.** Verhaltensanalyse von Mäusen mit ausgeschalteten Cryptochrome-Genen. Mäuse der angegebenen Genotypen wurden für 28 Tage in Käfigen mit Hamsterrädern gehalten und ihr Aktivitätsprofil aufgezeichnet (Aktogramm). Die y-Achse zeigt die Umdrehungen pro Minute des Hamsterrades, auf der x-Achse ist die Tageszeit aufgetragen. Der obere Balken gibt die Dunkel- und Hellphasen an. Bis zum 7. Tag (Pfeil) waren die Mäuse einem Zyklus von 12 h hell/12 h dunkel (LD) ausgesetzt, danach ständiger Dunkelheit (DD). Im LD-Zyklus zeigen alle vier Mäuse ähnliche Aktivitäts- und Ruhephasen innerhalb einer Periodizität von 24 Stunden. In der DD-Phase zeigen die Mäuse Aktivitäts- und Ruhephasen mit einer Periodizität, die von ihrer inneren Uhr bestimmt wird: Wildtyp-Mäuse 23.7 h; *Cry1*<sup>-/-</sup> 22.7 h; *Cry2*<sup>-/-</sup> 24.7 h. Die Doppel-Knockout-Maus *Cry1*<sup>-/-</sup> *Cry2*<sup>-/-</sup> ist arrhythmisch, da ihre zirkadiane Uhr nicht funktioniert. Aus Lit. [150, 151].

(LD12:12). In den anschließenden drei Wochen wurden sie in konstanter Dunkelheit gehalten. Die Versuchsergebnisse sind in Abbildung 24 gezeigt. Unter Licht-Dunkel-Bedingungen waren die Wildtyp(WT)-Mäuse und die Mutanten aktiv im Dunkeln und ruhten sich tagsüber aus, wie man es von Mäusen als nachtaktive Tiere erwarten würde. Unter den Bedingungen ständiger Dunkelheit, also ohne externen Reiz, verhielten sich die Mäuse allerdings sehr unterschiedlich. Während die WT-Mäuse einen Tag-Nacht-Rhythmus mit einer Periodizität von 23.7 Stunden beibehielten, nahmen die *CRY2*-Mutanten einen längeren Rhythmus von 24.7 Stunden und die *CRY1*-Mutanten einen kürzeren Rhythmus von 22.7 Stunden an. Noch beeindruckender waren die Experimente mit einer *CRY1*<sup>-/-</sup> *CRY2*<sup>-/-</sup>-Doppel-Knockout-Maus, die unter den Bedingungen ständiger Dunkelheit keinen Rhythmus mehr aufwies. Diese Resultate etablierten die Cryptochrome als zentral wichtige Clock-Proteine. Während diese Arbeiten in unserem Laboratorium voranschritten,<sup>[152-170]</sup> führten andere spektakuläre Forschungsergebnisse auf dem Gebiet der zirkadianen Rhythmik in den Jahren 1996–2000 zur Identifizierung von vier Proteinklassen (Abbildung 25), die sich als essentiell für die Kontrolle der zirkadianen Uhr im Menschen herausstellten.<sup>[146-149,171,172]</sup> Für die molekulare Funktionsweise der zirkadianen Uhr wurde das folgende Modell entwickelt: CLOCK und BMAL1 aktivieren die Transkription von CRY und PER, welche nach einer gewissen Verzögerung in den Zellkern eindringen, um die Inhibition ihrer eigenen Transkription einzuleiten. Dieser Prozess führt zu einem Anstieg und Abfall der CRY- und PER-Konzentrationen mit einer Periodizität von ungefähr

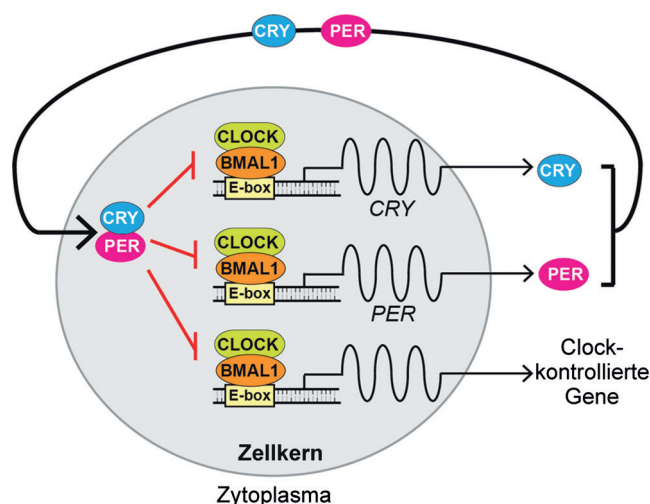
- 1) CRYPTOCHROME (Flavoprotein)
- 2) PERIOD (PAS-Domäne)
- 3) CLOCK (bHLH-PAS)
- 4) BMAL1 (bHLH-PAS)

**Abbildung 25.** Clock-Gene und Clock-Proteine in Säugetieren. Die vier Gene und ihre Paralogen wurden kloniert und die Proteine im Verlauf von 5 Jahren charakterisiert.

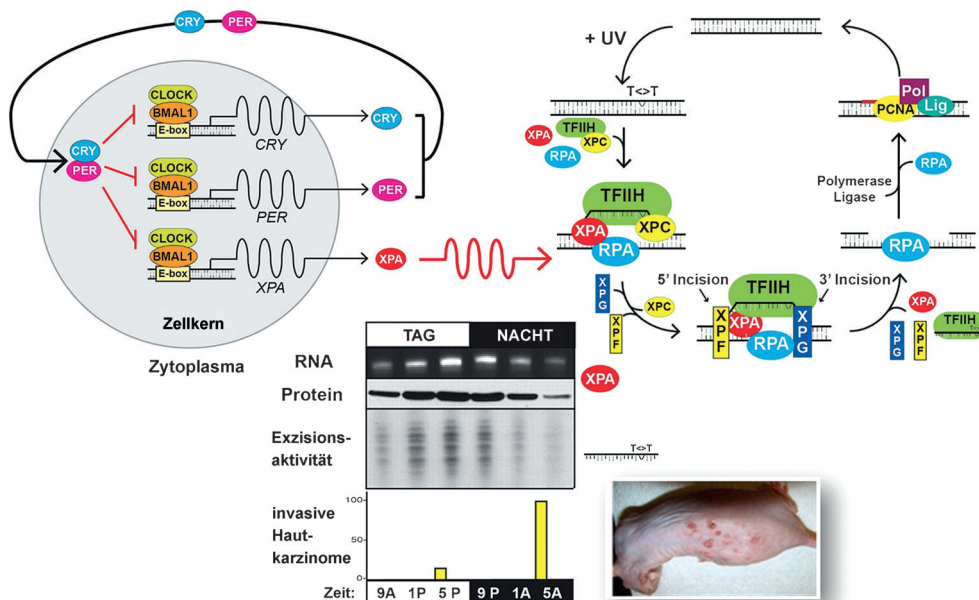
24 Stunden. Zusätzlich dazu kontrollieren diese Clock-Proteine die Expression von rund 30% aller Gene in einem Gewebe, um dieses zyklische Expressionsmuster und damit die Tagesrhythmik weiterzutragen (Abbildung 26).

#### Die zirkadiane Uhr, Kontrolle der Exzisionsreparatur und Karzinogenese

Unter den Genen, die von der zirkadianen Uhr reguliert werden, fanden wir das Exzisionsreparaturprotein XPA. Wir fragten uns, ob die gesamte Nukleotidexzisionsreparatur mit dem Tagesrhythmus oszilliert. Wie in Abbildung 27 gezeigt, ist die Transkription von XPA und damit auch der Protein Spiegel etwa um 5 Uhr nachmittags am höchsten. Die geringste Aktivität wird um 5 Uhr morgens beobachtet. Wichtig

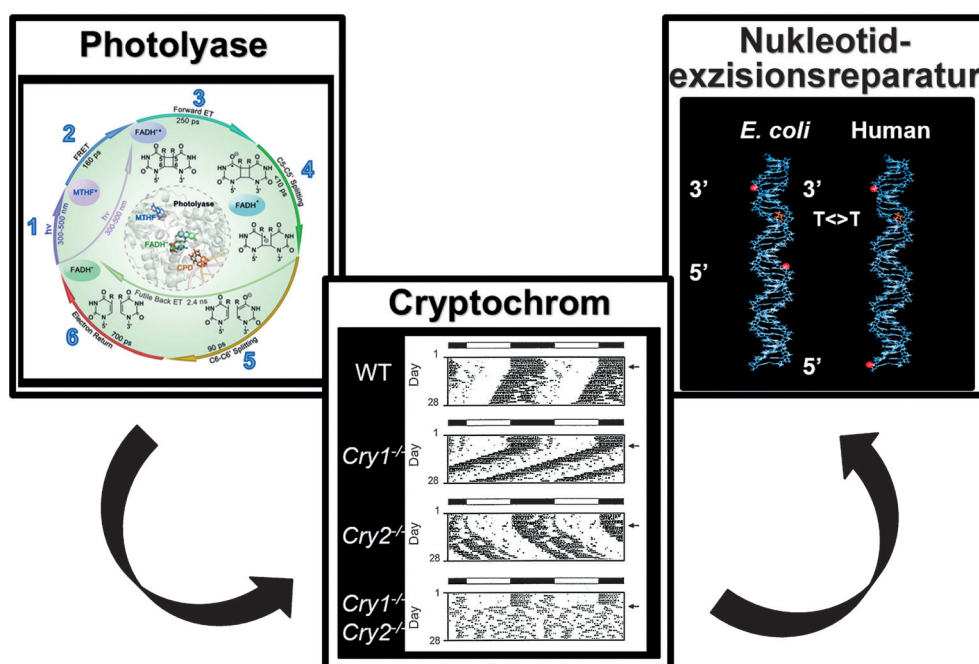


**Abbildung 26.** Molekularer Mechanismus der zirkadianen Uhr in Säugetieren. Bei den Proteinen CLOCK und BMAL1 handelt es sich um Aktivator der Transkription. Sie bilden ein CLOCK-BMAL1-Heterodimer, das an die E-Box-Sequenz (CACGTG) in den *Cry*- und *Per*-Genen bindet, um deren Transkription zu aktivieren. Bei den Proteinen CRY und PER handelt es sich um Repressoren der Transkription. Nach einer gewissen Verzögerung (bedingt durch die Proteinsynthese und das Eindringen in den Zellkern) inhibieren sie ihre eigene Transkription, einhergehend mit einem Anstieg und Abfall der CRY- und PER-Konzentrationen mit einer Periodizität von ungefähr 24 Stunden (Kerntakt). Außerdem beeinflussen diese taktgebenden Proteine auch andere Gene, bei denen die E-Box in der regulierenden Region liegt. Infolgedessen sind rund 30% aller Gene Clock-kontrollierte Gene (CCG) und unterliegen daher der Tagesrhythmik. Neben diesen Genen wird auch das *Xpa*-Gen, das essentiell für die Nukleotidexzisionsreparatur ist, durch die biologische Uhr gesteuert. Aus Lit. [170].



**Abbildung 27.** Zirkadiane Kontrolle der Exzisionsreparatur und der Photokarzinogenese in Mäusen. Die taktgebende Maschinerie kontrolliert die rhythmische Expression des Proteins XPA, sodass die RNA- und Proteinspiegel von XPA ihr Minimum um 5 Uhr morgens und ihr Maximum um 5 Uhr nachmittags erreichen. Das gesamte Exzisionsreparatursystem zeigt deshalb ein ähnliches Muster der täglichen Periodizität. Wurden Mäuse mit UVB-Licht um 5 Uhr morgens bestrahlt, kam es zu einer 5-fach gesteigerten Ausbildung von invasivem Hautkrebs im Vergleich zu Mäusen, die um 5 Uhr nachmittags bestrahlt wurden. Die im Bild gezeigte Maus gehörte zu der um 5 Uhr morgens bestrahlten Gruppe und wies bei Abschluss des Experiments eine Vielzahl invasiver Hautkarzinome auf. Aus Lit. [174, 176].





**Abbildung 28.** Photoreparatur, Cryptochrome und Nukleotidexzisionsreparatur. Ich habe über 40 Jahre an der Photolyase geforscht, deren Photozyklus hier gezeigt ist. 35 Jahre habe ich mit Forschungen zur Nukleotidexzisionsreparatur verbracht und dabei zwei verschiedene Muster der dualen Inzision in *E. coli* und im Menschen entdeckt. Die Arbeiten an der Photolyase führten schließlich zur Entdeckung der Cryptochrome als Clock-Proteine, welche die Nukleotidexzisionsreparatur in Mäusen kontrollieren. Letzteres zeigt, dass Photolyase-ähnliche Proteine (Cryptochrome) zwar keine Reparaturaktivität besitzen, aber trotzdem über die zirkadiane Uhr die Reparatur kontrollieren können.

war die Beobachtung, dass die Aktivität des gesamten Exzisionsreparatursystems ein ähnliches Muster zeigt.<sup>[173–175]</sup> Das führte zu der Annahme, dass Mäuse empfindlicher gegen UV-Licht sind, wenn sie um 5 Uhr morgens exponiert werden (wenn die Reparaturaktivität niedrig ist). Um 5 Uhr nachmittags (wenn die Reparaturaktivität maximal ist) sollte die Empfindlichkeit hingegen gering sein. Um diese Annahme zu überprüfen, belichteten wir zwei Gruppen von Mäusen mit UV-Licht entweder um 5 Uhr morgens oder um 5 Uhr abends. Tatsächlich fanden wir, dass die um 5 Uhr morgens belichtete Gruppe invasiven Hautkrebs mit einer 4- bis 5-fach höheren Rate ausbildete als die um 5 Uhr nachmittags belichtete Gruppe.<sup>[176]</sup> Derzeit untersuchen wir, ob es diese Rhythmik der Exzisionsreparatur auch beim Menschen gibt. Wenn ja, hätte dies möglicherweise Auswirkungen auf die Verhaltensempfehlungen im Zusammenhang mit der Vermeidung von Hautkrebs.<sup>[170,177]</sup> Ähnlich bedeutsam scheint uns die Tatsache zu sein, dass die Exzisionsreparatur auch der Reparaturmechanismus ist, der durch Cisplatin hervorgerufene Schäden aus der DNA entfernt. Damit könnte unsere Forschung bezüglich der Periodizität der Nukleotidexzisionsreparatur dazu beitragen, die Krebsbehandlung mit Cisplatin zu verbessern.

## Zusammenfassung

Abbildung 28 ist die Zusammenfassung meiner Forschungen zur DNA-Photolyase der letzten 40 Jahre, zur Nu-

kleotidexzisionsreparatur in *E. coli* und im Menschen der letzten 35 Jahre und – als Bindeglied – zu den Cryptochromen der letzten 20 Jahre.


## Danksagung

Es war mir in meiner Karriere vergönnt, mit außergewöhnlichen Studenten und Postdoktoranden zusammenarbeiten zu dürfen, die die meisten der hier beschriebenen Experimente durchgeführt haben (Abbildung 29). Ich danke

Sancar Lab Members		
Adar, Sheera	DeRocco, Vanessa	Levy, Michael
Ahn, Kyujeong	Ensch-Simon, Ingrid	Li, Wentao
Akan, Zafer	Erkmen, Gulnihal Kulaksiz	Li, Ywan-Feng
Annayev, Yunus	Gaddameedhi, Shobhan	Lin, Jing-Jer
Araujo, Francisco	Gauger, Michele	Lindsey-Boltz, Laura
Arat, Nezahat	Han, Chih-Chiang (Eric)	Malhotra, Khushbeer
Arnette, Robin	Hara, Ryujiro	Matsunaga, Tsukasa
Asimgil, Hande	Hassan, Bachar	McDowell-Buchanan, Carla
Bereketoglu, Sidar	Heenan, Erin	Meganck, Rita
Bercoval, Gloria	Hsu, Shiao-Wen (David)	Miyamoto, Yasuhide
Bessho, Tadayoshi	Hu, Jinchuan	Mo, Jinyao
Bondo, Eddie	Huang, Juch-Chin (JC)	Morrison, Lydia
Bouyer, James	Husain, Intisar	Mu, David
Branum, Mark	Hutsell, Stephanie	Myles, Gary
Cakit, Ceylan	Jiang, Gouchun	Nichols, Anne
Cantrik, Fazile	Kang, Tae-Hong	Ogrunc, Muge
Capp, Christopher	Karaman, Muhammet	Orren, David
Carlton, Wendi	Kavakli, Ibrahim (Halli)	Ozer, Zahide
Chlou, Yi-Ying	Kawara, Hiroaki	Ozgur, Sezgin
Choi, Jun-Hyuk	Kazantsev, Aleksey	Ozkan-Dagliyan, Irem
Croteau, Deborah	Kemp, Michael	Ozturk, Nuri
Dawut, Lale	Kim, Sang-Tae	Park, Chi-Hyun
Denaro, Tracy	Lee, Jin-Hyup	Partch, Carrie
		Payne, Gillian
		Payne, Nicola
		Petit, Claude
		Phillips, A. Meleah
		Rastogi, Promila
		Reardon, Joyce
		Sar, Funda
		Selby, Christopher
		Sercin, Ozdemirhan
		Shields, Katie
		Sibghat-Ullah
		Smith, Frances
		Song, Sang-Hun
		Svoboda, Daniel
		Thomas, David
		Thompson, Carol
		Thresher, Randy
		Unsal-Kacmaz, Keziban
		Vagas, Elif
		Van Houten, Ben
		Wakasugi, Mitsuo
		Worthington, Erin (Nikki)
		Yang, Yanyan
		Ye, Rui
		Yilmaz, Sevil
		Zhao, Xiaodong (Jerry)
		Zhao, Shaying

**Abbildung 29.** Mitarbeiter meiner Arbeitsgruppe.

Professor Muzaffer Aksoy, der mich ermutigt hat, den Schritt in die Vereinigten Staaten zu tun, meinem Mentor Dr. Rupert, der die DNA-Reparatur im modernen Sinne entdeckte und der immer ein Vorbild war, sowie W. Dean Rupp und Paul Howard-Flanders, die mich in das Gebiet der Nukleotidexzisionsreparatur einwiesen und die Grundlage für meine Forschungen zur DNA-Reparatur legten (Abbildung 30). Ich hatte das außerordentliche Glück, mit führen-

Mentors	Collaborators	
RUPERT, CLAUD S. Aksoy, Muzaffer Rupp, W. Dean Howard-Flanders, Paul	Bambara, Robert Chaney, Stephen Cordeiro-Stone, Marila Deisenhofer, Johann Griffith, Jack Hearst, John Heelis, Paul Hurwitz, Jerard Jorns, Marilyn Kaufmann, William Kunkel, Thomas Lieb, Jason	Linn, Stuart Lippard, Stephen Modrich, Paul Rajagopalan, K.V. Reinberg, Danny Sancar, Gwendolyn Smithies, Oliver Takahashi, Joseph Taylor, John-Stephen Thompson, Larry Van Gelder, Russel Wold, Marc Zhong, Dongping
<b>Funding</b>		
 National Institute of General Medical Sciences		

**Abbildung 30.** Mentoren und Kooperationspartner. Von Muzaffer Aksoy, meinem Medizin-Professor an der Istanbul University School of Medicine, lernte ich die wissenschaftliche Methode. Professor Claud S. Rupert, mein Doktorvater an der University of Texas in Dallas, hatte den größten Einfluss auf meine Entwicklung als Wissenschaftler. Die Professoren W. Dean Rupp und Paul Howard-Flanders führten mich in das Gebiet der Nukleotidexzisionsreparatur ein und halfen mir, das spannende Forschungsgebiet der DNA-Reparatur an der Yale University aufzubauen. Die hier aufgeführten Kooperationspartner waren am Erfolg aller drei großen Forschungsprojekte unserer Arbeitsgruppe maßgeblich beteiligt. Meine Forschungen der letzten 33 Jahren wurden durch die National Institutes of Health (NIH) unterstützt.

den Wissenschaftlern auf den Gebieten der DNA-Enzymologie, Flavinphotochemie, der analytischen Chemie, der Kristallographie, der ultraschnellen Spektroskopie und der zirkadianen Uhr zusammenarbeiten zu können (Abbildung 30). Zum Schluss möchte ich all den Forschern danken, die weitere wichtige Beiträge zu den Photolyasen, der Exzisionsreparatur und der zirkadianen Uhr geleistet haben. Im Rahmen dieses Aufsatzes war es mir nicht möglich, all die wichtigen Beiträge auf diesen Gebieten aufzuführen. Dennoch habe ich versucht, unsere Arbeit in einen historischen Kontext zu stellen. Wissenschaft findet nicht im luftleeren Raum statt, und auch wir haben sehr stark von den Arbeiten anderer profitiert – von Vorgängern ebenso wie von Zeitgenossen (Abbildung 31). Ihre Ideen, ihre Resultate und auch die Reagentien, die wir ausgetauscht haben, waren entscheidend für unseren wissenschaftlichen Erfolg. Ganz besonders danke ich Laura Lindsey-Boltz, Michael Kemp und Rita

Contributors		
<b>Photolyase</b> Eker, Andries Sancar, Gwendolyn Todo, Takeshi Yasui, Akira	<b>Circadian Clock</b> Provencio, Ignacio Reppert, Steven Rosbash, Michael Sassone-Corsi, Paolo Schibler, Ueli Takahashi, Joseph van der Horst, Gijbertus Young, Michael	<b>Excision Repair</b> Cleaver, James Egly, Jean-Marc Friedberg, Errol Goosen, Nora Grossman, Larry Hanaoka, Fumio Hanawalt, Philip Hoeijmakers, Jan
		Kisker, Caroline Prakash, Louise Prakash, Satya Tanaka, Kiyoji Thompson, Larry Van Houten, Ben Witkin, Evelyn Wood, Richard

**Abbildung 31.** Mitarbeiter und Kollegen, die mit ihren Ideen, Ergebnissen und Reagentien zu unserer Forschung beigetragen haben.

Meganck für ihre Hilfe bei der Vorbereitung des Nobel-Vortrages und dem Erstellen des Manuskripts.

## Biographie

### Einleitung

„On 11 March 1890, a five-hour banquet for hundreds of invited guests was held in the festive chamber of the Berlin City Hall. A festival of a magnificence perhaps unparalleled in the history of science ... The vast chandelied room was decorated with palm trees and laurel leaves, and one end was dominated by a five-metre-high oil painting of Bismarck and other European statesmen carving up the Turkish empire at the Congress of Berlin.“

Ich las diesen Text erstmals 2004 in John Buckinghams exzellentem Buch *Chasing the Molecule*.<sup>[178]</sup> Das besagte Bankett wurde zu Ehren Kekulés gegeben, einem der Väter der chemischen Strukturtheorie (die besagt, dass alle Moleküle eine definierte dreidimensionale Struktur besitzen). Seine Entdeckung der hexagonalen Molekülstruktur des Benzols im Jahr 1865 war einer der großen Meilensteine der Chemie. Ich war beeindruckt von dem zentralen Thema des Benzolfestes und des Zelebrierens der Chemie, fühlte mich aber auch getroffen von der hochmütigen Gesinnung der Europäer jener Zeit, so wie der Autor jener Zeilen über die „Aufteilung des Türkischen Reichs“ schrieb. Diese zwei Themen, die Wissenschaft und die türkische Nation (das Osmanische Großreich und die türkische Republik) – nicht unbedingt in dieser Reihenfolge – beeinflussten mein Denken solange ich mich erinnern kann. Ich wuchs auf als türkischer Patriot, der ich noch immer bin, und wurde schon im Alter von 10 Jahren zu einem begeisterten, und später praktizierenden, Wissenschaftler.

### Kindheit und Jugend

Ich wurde am 8. September 1946 in der Kleinstadt Savur in der Provinz Mardin im Südosten der Türkei als siebtes von acht Kindern von Abdulgani und Meryem Sancar geboren (Abbildung 32). Ich hatte außerdem zwei Halbbrüder. Mein Vater war Bauer, meine Mutter kümmerte sich um die Kinder und das Haus. Nach damaligen Maßstäben waren wir eine Familie aus der unteren Mittelklasse. Wir hatten immer genug zu essen, aber Schuhe zum Beispiel waren ein Luxus; bis zur 7. Klasse trugen wir Schuhe nur, wenn wir in die Schule gingen. Ich verbrachte viel Zeit meiner Kindheit in dem kleinen Tal zu Füßen unseres Hauses, wo ich zusammen mit meinen Brüdern und meinem Vater die Obst- und Nussbäume und den Gemüsegarten hegte, der uns ernährte und zum Einkommen beitrug. Wir hatten auch Tiere auf dem Bauernhof, die uns das ganze Jahr mit Milch und Fleisch versorgten. Meine schönsten Erinnerungen sind die blühenden Mandel- und Zwetschgenbäume in unserem Obstgarten im Frühling. In dieser Zeit begann ich viel über den Islam zu lernen und war überzeugt davon, dass das Paradies aussehen



Abbildung 32. Meine Mutter Meryem Sancar, 1946 in Savur, Türkei.

musste wie unser Obstgarten wenn die Mandelbäume in voller Blüte standen.

Alles in allem mochte ich aber die Arbeit auf dem Bauernhof nicht. Die Terrassen des Gemüsegartens waren aus Steinen und ohne Mörtel aufgesetzt und mussten von meinen Brüdern und mir ständig erneuert werden. Die Walnussernte war eine besonders harte Arbeit, und als eines der jüngeren Kinder lag es an mir, hoch hinauf in die Bäume zu klettern, um ja alle Walnüsse abzuschütteln. Am schlimmsten war das Hüten der Geißlein, die viel schneller rennen konnten als ein Junge von fünf oder sieben Jahren. Mein jüngerer Bruder und ich waren für das Ziegenhüten zuständig, und oft verbrachten wir Stunden damit, die Ausreißer zu finden bevor Vater etwas merkte.



Abbildung 33. Die Familien Abdulgani und Meryem 1971. Aziz war zum Zeitpunkt der Aufnahme zum Studium im Ausland und ist nicht auf dem Foto. Hintere Reihe von links nach rechts: Kazim, Yildiz, Edibe, Meryem, Kenan, Abdulgani, Yasemin, Tahir (Onkel), Nezihe. Mitte: Hasan, Seyran, Nurhan, Orhan, Zeynel, Sevim, Belma. Vorne: Nichten und Neffen.

Unsere große Familie (Abbildung 33) war ein wichtiger Teil meiner Kindheit. Onkel, Tanten und viele Vettern lebten in Savur, und oft kamen auch Verwandte aus weiter entfernten Städten zu Besuch. Große Höhepunkte waren immer die Besuche bei meinem Onkel Sevkett und seiner Familie in Mardin. Mardin ist bekannt für seine wunderschöne Architektur, die aus der Zeit 1100–1300 v.Chr. stammt. Das Übernachten in den großen Betten auf dem Dach von Onkel Sevkets Haus war immer ein großes Vergnügen. Beim Einschlafen sah man in der Ferne die Lichter zweier syrischer Städte, und am Morgen weckte einen der Ruf des Muezzins aus der historischen Sehidiye-Moschee, die nur 200 Meter entfernt stand.

### Frühe Einflüsse

Die drei wichtigsten Einflüsse in meiner Kindheit und Jugend waren, außer Mustafa Kemal Atatürk, meine Mutter Meryem, mein Vater Abdulgani und mein ältester Bruder Kenan (Abbildung 34). Ab 1911 bis zum Ende der Türkischen Freiheitskriege 1922 befand sich das Osmanische Reich im ständigen Kriegszustand, um die „Aufteilung des Türkischen Reichs“ durch die Europäer zu verhindern. Der Krieg ließ das Land wirtschaftlich erschöpft zurück, dezimiert an Ländereien und Menschen. In dieser Phase des Umbruchs und wirtschaftlichen Probleme hatten viele aus der Generation meiner Großeltern und Eltern nicht einmal die Möglichkeit auf eine Grundschulbildung. Mustafa Kemal Atatürk führte das Türkische Reich in die Freiheitskriege gegen die europäischen Besatzungsmächte, aus denen die moderne Türkische Republik hervorging. Für die neue Republik stand die Einrichtung eines Bildungssystems für alle Türken an erster Stelle. In kürzester Zeit wurden überall im Land Schulen gegründet, mit Lehrern, die Atatürks Vision einer gebildeten Bürgerschaft teilten, die hohen Ideale des Landes vertraten und die Zukunft der Türkei mit großem Optimismus vorantrieben. Ein Ergebnis dieser Politik war, dass ich, ganz anders noch als meine Eltern und Großeltern, selbst in einem unterentwickelten ländlichen Teil der Türkei Zugang



Abbildung 34. Aziz in der 3. Klasse mit dem großen Bruder Kenan und dessen Frau Nezihe (1955).



zu exzellenten Lehrern und exzellenter Bildung hatte. Das erfüllt mich bis heute mit Stolz über die Geschichte des türkischen Volkes und gibt mir die feste Überzeugung, dass wir großartige Dinge erreichen können.

Meine Mutter war die Tochter eines Imams aus einem kleinen Dorf nahe Savur. Obwohl sie weder lesen noch schreiben konnte, war sie die intelligenteste Frau, die ich kannte. Sie war auch sehr fortschrittlich und verehrte Atatürk, und sie bestand darauf, dass alle ihre Kinder zur Schule gingen. Mein Vater war der am härtesten arbeitende Mann, den ich je kannte. Er war und ist bis heute mein Vorbild. Mein ältester Bruder Kenan brachte mir Lesen und Schreiben bei als ich fünf Jahre alt war. Bei meiner Einschulung war ich deshalb meinen Mitschülern voraus. Kenan war für mich ein Vorbild, durch exzellente Ausbildung und harte Arbeit nach Exzellenz und Fortschritt zu streben. Kenan war der Erste aus meiner Familie, der eine Hochschule besuchte, genau genommen die Türkische Militärakademie. Während seiner ganzen Laufbahn war er bei seinen Soldaten hoch respektiert für seine Gerechtigkeit, harte Arbeit und Zielstrebigkeit. Er stieg am Ende zum Brigadegeneral der türkischen Armee auf.

### Karriere-Entscheidungen

Ich war der beste Schüler meiner Grundschulklasse in Savur und später auch in der Sekundarstufe in Mardin. Meine Lieblingsfächer waren Mathematik, Türkisch, Französisch und Chemie. In der 10. Klasse hatte ich einen ausgezeichneten Chemielehrer, der mich inspirierte, Chemiker zu werden. Die Schule war aber nicht meine einzige Leidenschaft. Wie jeder Junge fast überall auf der Welt bin ich mit Fußballspielen aufgewachsen. Ich war Torwart der Schulmannschaft (Mardin Lisesi), bei Savur Spor (Savur) und auch bei Mezopotamya Spor (Mardin) (Abbildung 35). Ich war sehr gut, weil ich schnelle Reflexe hatte und furchtlos war. Mehr als einmal trugen mich meine Mitspieler auf den Schultern vom Spielfeld, weil ich entscheidende Bälle abgewehrt hatte und wir gewannen. Der Türkische Fußballverband lud mich zu regionalen Auswahlspielen für die türkische U18-Mannschaft ein. Obwohl ich immer davon geträumt hatte, einmal für das türkische Nationalteam spielen zu dürfen, ging ich nicht zu



**Abbildung 35.** Fussballmannschaft der Mardin Lisesi Highschool 1962. Aziz ist der Torwart (hintere Reihe, 2. von rechts).



**Abbildung 36.** Aziz mit seinem Histologiekurs während des Medizinstudiums 1964.

diesen Spielen, weil ich mich selbst als zu klein und zu leicht für einen Nationalspieler hielt. Auch wenn ich nach der 10. Klasse mit dem Fußballspielen selber aufgehört habe, ist meine Liebe zum Spiel geblieben, und ich bin ein glühender Anhänger der türkischen und amerikanischen Nationalteams, von Galatasaray und dem Chapel Hill Frauenteam der University of North Carolina.

Nach Abschluss der Schule absolvierte ich die Aufnahmeprüfungen für Chemie und Medizin an der Istanbuler Universität, letzteres auf Betreiben von fünf meiner Freunde aus Mardin, die unbedingt Ärzte werden wollten. Ich bestand beide Prüfungen, meine Freunde überzeugten mich dann aber, mit ihnen gemeinsam im November 1963 das Medizinstudium zu beginnen (Abbildung 36).

### Medizinstudium

In eine weltoffene Stadt wie Istanbul zu kommen, hat Vor- und Nachteile. Ich schloss Freundschaften mit Türken verschiedener ethnischer Herkunft, mit Aleviten, Armeniern, Juden, Griechen, Kurden und Nachkommen türkischer Flüchtlinge vom Balkan. Diese Begegnungen haben mir den Blick auf die Welt geöffnet, vor allem vor dem Hintergrund der grässlichen Ereignisse der Balkankriege und des Ersten Weltkriegs und der teuflischen Auswirkungen religiöser und ethnischer Bigotterie. Mehrere meiner Professoren, die meisten von ihnen Juden, waren vor oder während des Zweiten Weltkriegs aus Deutschland und den Nachbarländern geflohen. Trotz der Tatsache, dass viele von ihnen zu den besten auf ihren Gebiet gehörten, wurden sie von vielen der westlichen Länder nicht aufgenommen und gingen stattdessen an türkische Universitäten, wo sie dazu beitrugen, das Bildungssystem in der Türkei auf europäische Standards zu heben. Die türkische Nation ist diesen außergewöhnlichen Professoren zu großem Dank verpflichtet für ihre Beiträge zu unserer Wissenschaft, Bildung und Sprache.

Der hauptsächliche Nachteil, der mit dem Studium an der besten medizinischen Universität in der Türkei verbunden war, war die aufkommende Angst, zu versagen. Auch wenn ich in Mardin Klassenbester war, befand ich mich nun in einer Klasse mit Studenten, die zu den besten Absolventen der öffentlichen und privaten Schulen in der Türkei gehörten. Ich war entschlossen, meinen Mitstudenten zu beweisen, dass

auch jemand aus dem unterentwickelten Südosten der Türkei bestehen und sogar besser sein konnte als Studenten aus weltoffeneren Gegenden. Um dieses Ziel zu erreichen, tauchte ich völlig in meine Studien ein und klammerte alles andere aus. Nie ging ich in ein Kino, ein Konzert oder zu einem Fußballspiel in Istanbul. Die einzige Ablenkung war meine Teilnahme an der türkisch-nationalistischen Bewegung, die sich gegen die kommunistischen/internationalistischen Strömungen richtete, die damals in der Türkei beständig stärker wurden. Ich war nie an Gewalttätigkeiten beteiligt – aber ich war der festen Meinung, dass die „Kameraden“, die das Hauptgebäude der Istanbuler Universität besetzten und auf dem Dach die rote Flagge hissten, falsch handelten. Ich glaube bis heute, dass Kommunismus, so wie er praktiziert wird, von größtem Übel ist.

Im zweiten Jahr meines Medizinstudiums hörte ich das erste Mal von der DNA-Doppelhelix. Ich war fasziniert von der Struktur und wollte nach Abschluss des Grundstudiums in die Biochemie gehen. Ich wollte so schnell wie möglich mit Forschungsstudien beginnen und fragte den Institutsleiter der Biochemie, Mutahhar Yenson, ob ich direkt nach Abschluss meines Medizinstudiums am Institut anfangen könne. Sein Standpunkt war jedoch, dass Medizinabsolventen für mindestens zwei Jahre als Arzt arbeiten sollten, bevor sie in die Grundlagenforschung gingen. Nach Ende des Studiums, das ich als bester meiner Klasse abschloss, ging ich daher zurück nach Savur, um als Arzt zu arbeiten. Das war im Juni 1969.

#### Die Zeit als Arzt

In den ersten sechs Monaten nach meiner Rückkehr nach Savur verwandelte ich ein Zimmer im Haus meiner Familie in eine Arztpraxis. Ein glücklicher Umstand war, dass der türkische Gesundheitsminister im Herbst 1969 Savur besuchte. Er erfuhr von meiner Praxis und bot mir an, für das Gesundheitsministerium arbeiten zu können. Ich wurde zum Gesundheitsbeamten für das Nachbardorf Surgucu berufen und bekam einen Geländewagen mit Chauffeur gestellt. Ein Jahr lang behandelte ich Patienten in Surgucu und Umgebung, aber auch in abgelegeneren Dörfern. Ich war der erste Arzt, den viele meiner Patienten je zu Gesicht bekamen. Viel von meinem Gehalt, das mir das Gesundheitsministerium zahlte, verwendete ich für den Kauf von Medikamenten für meine Patienten und für Spielzeug für Kinder, deren Familien sich das nicht leisten konnten. Durch einfache medizinische Behandlungen habe ich damals, so glaube ich, vielen Kindern das Leben gerettet.

Eine der großen Herausforderungen war, dass manche meiner weiblichen Patienten nur Kurdisch sprachen. In diesem Teil der Türkei schickte man damals die Töchter nicht zur Schule, und sie konnten deshalb kein Türkisch. Als Übersetzer fungierten meist Männer aus dem Ort, denen die Frauen oft keine intimen Gesundheitsprobleme anvertrauen mochten. Ich versuchte also selbst Kurdisch zu lernen, auch wenn ich es nie richtig fließend konnte. Ich glaube dennoch, dass die Frauen meine Bemühungen sehr schätzten, und oft bewahrten sie meine ausgestellten Rezepte noch nach Einnahme der Medikamente wie einen Talisman auf.

Wenn ich zurückblicke, scheinen mir die 18 Monate, die ich als Arzt gearbeitet habe, als die glücklichste Zeit in meinem Leben. Allerdings empfand ich die Arbeit als Arzt intellektuell frustrierend. Zum Beispiel wollte ich gerne verstehen, warum Streptomycin das Tuberkulosebakterium abtötet, Penicillin aber nicht. Also bewarb ich mich während meiner ganzen Zeit als Arzt um Stipendien für ein Studium der Biochemie im Ausland.

#### Promotion: Klonierung des Photolyase-Gens

1971 erhielt ich ein NATO-Stipendium, das mir ein Promotionsstudium in einem der Mitgliedsländer der NATO erlaubte. Meine Wahl fiel auf die Vereinigten Staaten, das die weltweit führende Nation in der Wissenschaft war. Ich schrieb mich noch 1971 am Department of Biochemistry der Johns Hopkins University ein und begann meine Studien. Ich war völlig unvorbereitet auf das, was mich dort erwarten sollte. Obwohl ich im letzten Jahr des Medizinstudiums einen Englischkurs belegt hatte, konnte ich mich mit meinen Professoren und Mitstudenten nicht verständigen. Hinzu kam, dass ich aufgrund meines akademischen Erfolges und auch meiner patriotischen Einstellung wegen selbstsicher bis zur Arroganz war und die Menschen mich deshalb mieden. Es kam mir vor, als befände ich mich in Einzelhaft. Die Folge war, dass ich die Johns Hopkins im Juni 1972 wieder verließ und nach Savur zurückkehrte, um mich dort neu zu sammeln. Nachdem ich in Savur ein weiteres halbes Jahr als Arzt gearbeitet und eine kurze Reise nach England getan hatte, kehrte ich deutlich gereift in die Vereinigten Staaten zurück, vor allem mit nun besseren Englischkenntnissen. Ich bewarb mich bei Dr. Claud S. Rupert an der University of Texas in Dallas (UTD). 1973 wurde ich in das dortige Biology Program aufgenommen, und 1974 begann ich meine Forschungen im Labor von Dr. Rupert (Abbildung 37).

Dr. Rupert ist der Entdecker des Enzyms Photolyase; diese Entdeckung, im Jahr 1958, markierte den Beginn des wissenschaftlichen Gebiets der DNA-Reparatur. Setzt man das Bakterium *E. coli* UV-Licht aus, wird der Organismus abgetötet. Bestrahlt man jedoch anschließend mit sichtbarem Licht, fängt es wieder an zu leben. Man spricht von einer Photoreaktivierung, die durch das Enzym Photolyase bewirkt



Abbildung 37. Aziz mit seinem Doktorvater Claud (Stan) Rupert, 2009.

wird. Die zentrale Frage in Dr. Ruperts Labor war, wie das Enzym Licht absorbiert. Um diese Frage beantworten zu können, benötigte man große Mengen des Enzyms in hoher Reinheit, allerdings gab es niemanden, der das Enzym in ausreichenden Mengen aufzureinigen konnte. Ungefähr zu der Zeit, als ich bei Rupert anfang, wurde das molekulare Klonieren an der Stanford University erfunden. Ich sah sogleich das große Potential dieser Methode zur Lösung unseres Produktionsproblems der Photolyase. Mein Plan war, das Photolyase-Gen zu klonieren, das Enzym in großen Mengen zu exprimieren, aufzureinigen und dann seine Chromophore und den Reaktionsmechanismus aufzuklären.

Der erste Schritt war, eine Mutante zu isolieren, der das Photolyase-Gen fehlte, und diese Mutante dann als Wirt für die Klonierung zu benutzen. Ich entwickelte ein wenig intuitives experimentelles Schema zur Erzeugung und Selektion der Mutante und screenete täglich ein- bis zweimal über einen Zeitraum von sechs Monaten, bis ich den ersten *phr*-defizienten Stamm erhielt. Auf dem Weg dahin wurde mein Selbstvertrauen stark herausgefordert, nicht nur wegen der Schwierigkeiten bei der Herstellung der Mutante, sondern auch weil ein Laborkollege meinte, ich hätte kein Talent für Laborarbeit und sollte lieber wieder als Arzt arbeiten. Der letztendliche Erfolg dieses Experiments spielte eine große Rolle für meine weitere Entwicklung als Wissenschaftler, denn es zwang mich, Informationen aus verschiedensten Disziplinen einzuholen, um eine Methode auszuarbeiten – und weil ich durchhielt, bis es am Ende funktionierte. Ich glaube, es gibt drei zentrale Merkmale, die einen erfolgreichen Wissenschaftler ausmachen: Kreativität basierend auf Wissen, harte Arbeit und Hartnäckigkeit im Angesicht des Scheiterns. Auch wenn die Veröffentlichung, in der die Methode beschrieben ist, bis heute nur sechsmal zitiert wurde (inklusive zweier Eigenzitate), ist es für mich eine meiner wichtigsten Arbeiten, weil sie mir das Selbstvertrauen gab, weiter Forschung zu betreiben – und außerdem auch Dr. Rupert davon überzeugte, dass ich ein guter Student war, der die Befähigung zu eigenständigem Forschen besaß.

Mithilfe des isolierten Mutantenstamms klonierte ich 1975 das *phr*-Gen von *E. coli* und begann Experimente zur Charakterisierung des Plasmids, welches das Gen trug. 1976 wurde ich allerdings zurück in die Türkei gerufen, um meinen Militärdienst abzuleisten. Nach vier Monaten kehrte ich zurück nach Texas im Rang eines Leutnants und nahm die Arbeiten zur Aufreinigung des Enzyms wieder auf. Zur damaligen Zeit war das Klonieren eines Gens eine ausgesprochene Herausforderung (ich meine, *phr* war das erste Gen, das östlich der Rocky Mountains kloniert wurde), und Dr. Rupert fand, dass ich genug geleistet hatte, sodass ich im Frühjahr 1977 mit dem Schreiben meiner Doktorarbeit beginnen konnte. Ermutigt durch Dr. Rupert bewarb ich mich bei drei führenden Forschungsgruppen auf dem Gebiet der DNA-Reparatur. Ich erhielt jedoch kein Angebot, wahrscheinlich weil bis dahin nichts veröffentlicht hatte. Ich war so mit dem Experimentieren beschäftigt, dass ich einfach nicht dazu kam, die sechs bis sieben Veröffentlichungen zu schreiben, für die ich sicher Material hatte. Zudem war die Genklonierung neu, und es gab nicht viele, die diese Methode zu würdigen wussten. Glücklicherweise erfuhr ich von einem

anderen Doktoranden, dass Dr. W. Dean Rupp an der Yale University plante, die *uvrA*-, *uvrB*- und *uvrC*-Gene zu klonieren, von denen man annahm, dass sie für die Nukleotidexzisionsreparatur in *E. coli* zuständig waren. Ich bewarb mich bei Dr. Rupp, und dank der starken persönlichen Empfehlung von Dr. Rupert bot er mir eine Stelle in seiner Forschungsgruppe an. Ich verteidigte meine Doktorarbeit im Juli 1977 und verließ die UTD im September, um meine Forschungen in Dr. Rupps Gruppe fortzusetzen, immer noch im Ungewissen darüber, wie die Photolyase Licht absorbierte.

#### Postdoktorat: Maxicells und duale Inzision I

Als ich bei Dr. Rupp in Yale anfang, gehörte die Universität zu den drei besten Zentren der DNA-Forschung weltweit und bot darüber hinaus eine ausgezeichnete Forschungsumgebung. Neben Dean Rupp fanden sich in Yale noch weitere Pioniere auf dem Gebiet der DNA-Reparatur und DNA-Rekombination ein, darunter Paul Howard-Flanders, Charles M. Radding und Fred Hutchinson. In schneller Folge klonierte ich die *uvrA*-, *uvrB*- und *uvrC*-Gene. Noch in Dallas hatte ich mit der Entwicklung einer Methode begonnen (von mir als Maxicells bezeichnet), mit der sich die Proteine identifizieren ließen, die durch das klonierte Gen kodiert werden. In Yale machte Dr. Rupp Vorschläge zur Verbesserung der Methode, die sich als entscheidend für den späteren Erfolg herausstellten. Es kostete mich fast ein Jahr, um die Details auszuarbeiten, aber am Ende funktionierte die Methode. Das Paper, das die Maxicell-Methode beschreibt, erschien 1979 und war sofort ein großer Treffer, da sich die Methode zur Identifizierung jedes plasmidkodierten Proteins anwenden ließ. Die Maxicell-Methode wurde in den 80er Jahren breit eingesetzt, und die zugehörige Veröffentlichung ist bis heute meine meistzitierte Arbeit.

Nachdem ich die *uvrA*-, *uvrB*- und *uvrC*-Gene kloniert hatte, verwendete ich die Maxicell-Methode mit radioaktiven Tracern, um die durch diese Gene kodierten Proteine zu markieren, zu identifizieren und aufzureinigen. Bis zu diesem Zeitpunkt lautete das klassische Modell der Nukleotidexzisionsreparatur, dass eine UV-Endonuklease den beschädigten Strang 5' zum Schaden einschneidet und anschließend eine Exonuklease den Schaden in 5'→3'-Richtung in Form eines vier bis sechs Nukleotide langen Fragments, das den Schaden enthält, entfernt. Im Frühjahr 1982 rekonstituierte ich mit den aufgereinigten Proteinen die Inzisionsreaktion in vitro und fand zu meiner großen Überraschung, dass die UvrABC-Nuklease zwei konzertierte Inzisionen ausführte. Ein Schnitt erfolgte sieben Nukleotide in 5'-Richtung zum Dimer, der zweite Schnitt erfolgte drei bis vier Nukleotide in 3'-Richtung, sodass ein 12–13 Nukleotide langes Fragment entstand, das den Dimerschaden enthält. Ich nannte das Enzym „ABC-Excinuklease“, um hervorzuheben, dass es sich um einen einzigartigen dualen Inzisionsmechanismus handelte. Dies war eine große Entdeckung auf dem Gebiet der DNA-Reparatur. Da damals etliche andere Forschungsgruppen an der gleichen Frage arbeiteten, konnte ich es niemandem außerhalb unseres Labors erzählen, bis wir dann so weit waren, die Ergebnisse auf einer Tagung mitteilen und publizieren zu



können. Dr. Rupp präsentierte die Ergebnisse erstmalig auf einer internationalen Tagung über DNA-Rekombination und DNA-Reparatur in Frankreich im Frühjahr 1982. Ich treffe heute noch Kollegen, die mir berichten, dass dieser Vortrag damals größte Begeisterung erregte. Dr. Rupps Vortrag wurde in den Proceedings der Konferenz abgedruckt, 1983 erschien dann die ausführliche Veröffentlichung.

Während meiner Zeit in Dr. Rupps Laboratorium pasierten noch andere aufregende Ereignisse in meinem persönlichen Leben. Zurück in Texas wurde ich ein enger Freund von Gwen Boles, die am gleichen Department an der UTD promovierte. Gwen schloss ihre Doktorarbeit drei Monate vor mir ab und nahm ein Postdoktorat in New York an, wo sie über die molekularen Grundlagen der Thalassämie forschte. Wir sahen uns an den Wochenenden nach meinem Wechsel nach Yale und heirateten 1978 (Abbildungen 38 und 39). Es sollte allerdings noch einmal zwei Jahre dauern bis Gwen ihre Forschungen in New York beendete und dann ebenfalls nach Yale in die Gruppe von Dean Rupp kam, um über die Regulation von DNA-Reparaturgenen in *E. coli* zu forschen. Auch wenn das Getrenntsein nicht ideal war, ermöglichte es Gwen doch, in ihrer Zeit in New York genügend Forschungsmaterial für fünf Veröffentlichungen zusammenzutragen.



Abbildung 38. Aziz und Gwen in Chapel Hill, 1994.



Abbildung 39. Aziz mit Gwen und Rose vor dem Atatürk Mausoleum, 15. Dezember 2015.

Ermutigt durch meine Forschungserfolge begann ich 1981, mich auf eine akademische Anstellung zu bewerben. Ich bewarb mich bei etwa 50 Universitäten und wurde überall abgelehnt, manchmal bekam ich nicht einmal eine Antwort. Doch dann erhielt ich einen Anruf von Mary Ellen Jones, der damaligen Dekanin am Department of Biochemistry an der University of North Carolina in Chapel Hill (UNC-CH). Dr. Jones wollte Molekularbiologen einstellen, um das Department zu modernisieren. Gwen und ich besuchten Chapel Hill, und uns beiden wurden Anstellungen als Assistenzprofessoren im Frühjahr 1981 angeboten. Da ich zu der Zeit intensiv an der Rekonstitution der ABC-Excinuklease arbeitete, wollte ich aber keine sechsmonatige Pause einlegen, die für den Aufbau der Arbeitsgruppe nötig gewesen wäre. Wir akzeptierten daher die Anstellungen unter der Bedingung, dass wir den Umzug um ein Jahr verschieben konnten, Dr. Jones erklärte sich einverstanden, und so konnte ich im Herbst 1982, knapp vor unserem Umzug nach Chapel Hill, die Arbeit einreichen, die die Rekonstitution der ABC-Excinuklease und den dualen Inzisionsmechanismus beschrieb. Dies ermöglichte Gwen und mir außerdem, unseren ersten NIH-Antrag zu schreiben, in dem wir weitere Arbeiten an der Photolyase vorschlugen. Der Antrag wurde bewilligt, was zur Folge hatte, dass bei unserer Ankunft in Chapel Hill der größte Teil der Ausrüstung schon vorhanden war, sodass wir bereits drei Tage nach unserer Ankunft mit den Experimenten beginnen konnten.

#### **Photolyase: „So komplett wie Forschung nur sein kann“**

An der UNC-CH entschloss ich mich, meine Arbeiten an der Photolyase wieder aufzunehmen, insbesondere wollte ich die Chromophore identifizieren und den Mechanismus aufklären. In relativ kurzer Zeit gelang es uns, das Enzym zu überexprimieren und aufzureinigen und wir entdeckten, dass es nicht einen, sondern zwei Kofaktoren enthält, FADH<sup>-</sup> und MTHF, die beide Licht absorbieren. In einer Serie von Experimenten, bei denen wir mit Partnern aus aller Welt kooperierten, fanden wir, dass MTHF als Antennenchromophor fungiert. Es absorbiert Lichtenergie und transferiert diese Energie auf den FAD-Kofaktor, der die Katalyse ausführt. Über die nächsten 30 Jahren gelang es dann, den Mechanismus in großer Genauigkeit aufzuklären. Wir konnten alle Einzelschritte der Reparaturreaktion in Echtzeit verfolgen, von der Lichtabsorption bis zur Spaltung des Dimers und dem Rücktransfer des Elektrons auf den Flavinkofaktor. Meine Arbeit an der Photolyase erstreckte sich über einen Zeitraum von 40 Jahren und umfasste Kooperationen mit führenden Wissenschaftlern auf den Gebieten Kofaktor-Chemie, Flavin-Photochemie, Kristallographie und ultraschneller Spektroskopie. Ich habe mich deshalb sehr gefreut, als ein Kollege kürzlich eine 2011 in Kooperation mit Dongping Zhong publizierte Arbeit mit den Worten beschrieb: „Mit diesem Paper ... ist die Geschichte der Photolyase, die vor 62 Jahren begonnen hat, nun so komplett wie ein Forschungsthema nur sein kann.“<sup>[179]</sup>

**Transkriptionsgekoppelte Reparatur – Yunus Emre Destani**

1985 und 1987 berichteten Philip Hanawalt und Mitarbeiter, dass die Transkription die Nukleotidexzisionsreparatur in humanen Zellen und in *E. coli* stark stimuliert. Sie schlugen vor, dass die an einem Schaden zum Stillstand gekommene RNA-Polymerase die Schadenerkennung beschleunigt, die der geschwindigkeitsbestimmende Schritt in der Exzisionsreparatur ist. Wir testeten dieses Modell in vitro mit aufgereinigten Proteinen aus *E. coli* und fanden, dass die blockierte RNA-Polymerase, ganz im Gegensatz zu diesen Annahmen, die Reparatur hemmt. Basierend auf diesem Ergebnis postulierten wir, dass es einen zusätzlichen Faktor geben müsste, der die blockierte RNA-Polymerase erkennt, von der Schadenstelle verdrängt und gleichzeitig die Assemblierung der Exzisionsnuklease am DNA-Schaden beschleunigt. Wir identifizierten und reinigten einen Faktor, den wir TRCF nannten („transcription repair coupling factor“), und konnten dann zeigen, dass TRCF das Produkt des *mfd*-Gens ist, das Evelyn Witkin schon 1956 beschrieben hatte. Wir konnten auch zeigen, dass aufgereinigtes TRCF, RNA-Polymerase und die ABC-Exzisionsnuklease ausreichend sind, um die transkriptionsgekoppelte Reparatur in vitro zu rekonstituieren. Ich halte die Veröffentlichung, in der wir diese Arbeiten beschrieben haben, für unsere ästhetischste – wissenschaftlich und auch stilistisch. Wir stellten eine Hypothese auf, beschafften die notwendigen Reagenzien zu ihrer Überprüfung und fanden, dass die Hypothese richtig ist. Im Verlauf der Studie fanden wir die Antwort auf eine seit 25 Jahren bestehende Frage (Absinken der Mutationshäufigkeit). Das Paper ist sehr gut geschrieben, benennt prägnant das Problem und beschreibt präzise die experimentellen Ergebnisse. Die Daten sind klar und unmissverständlich, und unser Modell hat sich bewährt. An meine türkischen Landsleute gerichtet kann ich sagen, es ist mein Yunus Emre Destani (Yunus Emre Opus). Yunus Emre war ein mystischer Dichter im 14. Jahrhundert. Er ist für die türkische Sprache das, was Chaucer für die englische Sprache ist, und jeder Türke strebt nach jener Perfektion, die Yunus Emre in seinem erkorenen Fach erlangte.

**Exzisionsreparatur im Menschen, duale Inzision II („Nur Gott und mir bekannt“) und Molekül des Jahres**

1987 wandte ich mich den Mechanismen der Nukleotidexzisionsreparatur im Menschen zu, die selbst nach 20 Jahren Arbeit noch sehr schlecht verstanden waren. Wir wählten einen biochemischen Ansatz, um den Reaktionsmechanismus aufzuklären, und konzentrierten uns zunächst auf die für uns wichtigste Frage: Nutzen humane Zellen eine UV-Endonuklease/Exonuklease zum Herausschneiden des Schadens oder findet eine duale Inzision ähnlich wie in *E. coli* statt? Über fünf Jahre testeten wir verschiedenste Assays, Zelltypen, Zellextrakte und Substrate mit geringem Erfolg. Dann, am 8. November 1991, gelang es uns, das herausgeschnittene Oligonukleotid zu fassen: Es war ein 27-mer („nominales 30-mer“), das durch duale Inzisionen freigesetzt wurde. Ja, der Mechanismus war eine duale Inzision, die sich aber sehr stark

von der in *E. coli* unterschied. Diese Entdeckung war einer der Höhepunkte meiner wissenschaftlichen Karriere. Als ich das 27-mer erstmals sah, erzählte ich Gwen: „Es gibt eine wichtige biologische Tatsache im Menschen, die nur Gott und ich kennen“. Wir verfolgten die Entdeckung weiter und isolierten und reinigten alle Proteine auf, die für die duale Inzisionsreparatur notwendig waren. Anschließend rekonstituierten wir die Reaktion in vitro mit den vollständig aufgereinigten Komponenten. Diese Arbeit, zusammen mit der Aufklärung des Mechanismus der transkriptionsgekoppelten Reparatur, trug entscheidend dazu bei, dass *Science* 1994 die DNA-Reparatur zum „Molekül des Jahres“ erklärte. Für das entsprechende Sonderheft bat man mich, Paul Modrich und Philip Hanawalt, die aufregenden Ergebnisse des vergangenen Jahres auf dem Gebiet der DNA-Reparatur aus unseren und einem dutzend anderen Laboratorien zusammenzufassen.

**Die Reparaturkarte des Humangenoms – Piri Reis-Karte**

Nach der Entdeckung der dualen Inzision im Menschen wollten wir das weitere Schicksal des herausgeschnittenen Oligomers ergründen. Es gelang uns jedoch nicht, das 30-mer aus UV-bestrahlten Zellen zu isolieren. Erst nachdem wir 20 Jahre an der Charakterisierung der humanen Exzisionsreparatur in vitro geforscht hatten, fanden wir am Ende das produzierte 30-mer in vivo. Dies erlaubte es uns, die Reparaturstellen über das gesamte Humangenom in Einzelnukleotidauflösung zu kartieren. Die Reparaturkarte zeigt – in einem tatsächlich geographischen Sinne – Berge, Täler und Schluchten, die Regionen hoher, mittlerer und geringer oder keiner Reparatur entsprechen. Diese Methode kann sicher dabei helfen, Faktoren aufzuklären, die neben den primär beteiligten Reparaturproteinen die Reparatureffizienz beeinflussen, und könnte Anwendung für die Verbesserung von Chemotherapien finden. Für mich persönlich ist dies die am meisten befriedigende Errungenschaft der letzten zehn Jahre, und an meine türkischen Landsleute gerichtet sage ich, es ist mein „Piri Reis-Karte“. Piri Reis war ein türkischer Admiral und Kartograph, der 1513 die Weltkarte mit einer Akkuratez zeichnete, an die kein anderer Kartograph seiner Zeit herankam. Er wird von Türken als großer Wissenschaftler verehrt und ist wohl einer letzten aus dem goldenen Zeitalter der „Islamischen Wissenschaft“. Nach Einreichen dieser Ergebnisse ging ich auf Vortragsreise nach Peru und meinte zu Gwen: „Falls mein Flugzeug in den Anden zerschellt und ich sterbe, dann sterbe ich als glücklicher Mann.“

**Kontrollpunkte (Checkpoints) für DNA-Schäden**

Zellen reagieren auf DNA-Schäden mit einem Reparaturprozess, indem sie Signalwege aktivieren, die den Zellzyklus anhalten, das Transkriptionsprofil ändern und Apoptose induzieren. Diese Vorgänge sind wichtig für die zelluläre Homöostase, und sie wurden von vielen Wissenschaftlern intensiv erforscht. Wegen der komplexen Natur der Phänomene war über die biochemischen Details dieser Prozesse

jedoch kaum etwas bekannt (mit Ausnahme der Apoptose). Vor diesem Hintergrund wollten wir unsere Erfahrungen auf dem Gebiet der DNA-Reparatur anwenden, um die Biochemie der Checkpoint-Aktivierung aufzuklären. In den letzten 15 Jahren leisteten wir wichtige Beiträge zur Biochemie der DNA-Checkpoints für UV-Schäden. Wir entwickelten eine große Anzahl von In-vitro-Systemen, um spezifische Schritte im Signalweg zu lokalisieren. Unsere wohl wichtigste Errungenschaft war die Kopplung der Nukleotidexzisionsreparatur mit den Schaden-Checkpoints in vollständig definierten Systemen. Ich betrachte diese Arbeiten als einen ultimativen reduktionistischen biochemischen Ansatz, der darauf abzielt, komplexe zelluläre Phänomene in minimalistischen In-vitro-Systemen nachzustellen.

### Cryptochrome und die innere Uhr

Photolyasen sind in der biologischen Welt nicht universell verbreitet, und ihr Vorkommen im Menschen wurde nach der Entdeckung der Enzyme in Bakterien 1958 über 35 Jahre lang kontrovers diskutiert. 1993 führten wir eine umfangreiche Studie zu diesem Problem durch und publizierten eine Arbeit, in der wir kategorisch ausschlossen, dass Menschen Photolyasen besitzen. Unsere Ergebnisse beziehen sich sowohl auf die klassischen Photolyasen, die Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere reparieren, als auch auf einen anderen Typ von Photolyasen, die von T. Todo entdeckt wurden und Pyrimidin(6-4)-Pyrimidon-Addukte reparieren. 1995 veröffentlichte Human Genome Science eine Reihe von partiellen humanen cDNA-Sequenzen, darunter auch ein Gen, das als Photolyase-Homolog deklariert wurde. Wir besorgten uns sogleich die cDNA für das gesamte Gen und fanden kurz darauf noch ein zweites Gen, das ebenfalls eine hohe Sequenzhomologie zu Photolyase-Genen aufwies. Nachdem wir beide Gene kloniert und exprimiert hatten, stellten wir fest, dass weder die rekombinanten Proteine noch die Zellen, die diese Proteine überexprimieren, nachweisbare Photolyaseaktivitäten aufwiesen. Wir hatten uns noch nicht entscheiden können, was wir mit diesen Ergebnissen anfangen sollten, als „der Zufall auf den vorbereiteten Geist traf“.

Im Mai 1996 auf meinem Rückflug von einer Reise in die Türkei las ich im Bordmagazin einen Artikel von Dr. William Schwartz über die innere/zirkadiane Uhr und Jetlag. Ich fand es äußerst spannend, dass die zirkadiane Uhr durch blaues Licht gestellt wird (bei ähnlichen Wellenlängen wie jenen, die von den Photolyase-Chromophoren absorbiert werden) und dass bei blinden Mäusen und Menschen, denen die bewusste Lichtwahrnehmung fehlt, die zirkadiane Uhr trotzdem auf Lichtreize reagiert, da das „zirkadiane visuelle System“ anatomisch und physiologisch vom bildgebenden visuellen System getrennt ist. Nach dem Lesen dieses Artikels kam mir der Gedanke, dass die humanen Photolyase-Paraloge, die wir gefunden hatten, Clock-Proteine sein könnten, die auf blaues Licht ansprechen. Ich diskutierte die Idee mit meinen Mitarbeitern und schlug vor, diese Proteine Cryptochrome 1 und 2 (CRY1 und CRY2) zu nennen, in Analogie zu den pflanzlichen Blaulichtphotorezeptoren, die ebenfalls eine hohe Sequenzhomologie zu den Photolyasen aufweisen. Wir veröf-

fentlichten diese Arbeit in *Biochemistry* im November 1996, wie es aber schien, nahm die Fachwelt kaum Notiz davon.

Um unsere Hypothese überprüfen zu können, begann ich augenblicklich, so viel wie möglich über die zirkadiane Uhr und Neurowissenschaften zu lernen. Bis zum Ende des Jahres 1997 konnten wir dann zeigen, dass Cryptochrome speziell in denjenigen anatomischen Regionen hochexprimiert sind, die für die zirkadiane Uhr entscheidend sind, nämlich in den Ganglienzellen der Netzhaut und im suprachiasmatischen Nucleus (SCN) im Gehirn, der das neurologische Zentrum der zirkadianen Uhr in Mäusen und auch im Menschen darstellt. Insbesondere die *CRY1*-mRNA zeigte eine sehr hohe Amplitude täglicher Rhythmik im SCN. Das waren genügend Indizien für eine Veröffentlichung in *PNAS*, in der wir beschrieben, dass die CRYs von Säugetieren zirkadiane Photorezeptoren sind. Diese Arbeit elektrisierte die Fachwelt, doch es fehlte noch der Kausalitätsbeweis.

Um unsere Behauptung zu beweisen, mussten wir zeigen, dass Mutationen in den *CRY*-Genen die zirkadiane Uhr beeinflussen. Wir konstruierten eine *CRY2*-Mutante, und als wir sie im Laboratorium unseres Kooperationspartners Joseph Takahashi untersuchten, zeigte sich deutlich, dass die Mutation nicht nur die Sensitivität der zirkadianen Uhr auf Licht veränderte, sondern dass sie auch in kompletter Dunkelheit einen Einfluss auf die innere Uhr hatte. Wir schlossen daraus, dass *CRY2* sowohl lichtabhängige als auch lichtunabhängige Effekte auf die innere Uhr hat. In der Zwischenzeit führte unser erstes Paper zur potentiellen Funktion von *CRY* in der zirkadianen Uhr zur Identifizierung von *CRY*-Homologen in *Drosophila*. Außerdem wurde eine *CRY*-Mutante aus *Drosophila* mit signifikant reduzierter Photosensitivität isoliert. Unsere Arbeit führte auch zu einer Neubewertung der *CRY*-Mutanten aus *Arabidopsis*, und Experimente von Pflanzenbiologen bewiesen, dass *CRY* ebenfalls eine wichtige Funktion in der zirkadianen Uhr in *Arabidopsis* hat. Unsere Paper zu den *CRY2*-Mutanten der Maus sowie von *Drosophila* und *Arabidopsis* wurden innerhalb einer Woche veröffentlicht. Diese Ergebnisse, neben anderen wichtigen Fortschritten auf dem Gebiet, führten dazu, dass die zirkadiane Uhr 1998 in *Science* zum „Molekül des Jahres“ erklärt wurde.

1999 erzeugten wir in Zusammenarbeit mit T. Todo und J. S. Takahashi sowie einer weiteren Gruppe niederländischer und japanischer Kollegen Maus-Mutanten, in denen beide *CRY*-Proteine defekt waren, und konnten nachweisen, dass diese Mäuse keine funktionierende zirkadiane Uhr mehr besitzen. In der Folge kam es zu rasanten Fortschritten auf diesem Gebiet, und bis 2000 hatte man ein detailliertes Modell der inneren Uhr erarbeitet, demzufolge die *CRY*-Proteine als primäre Transkriptionsrepressoren in der Takt-schaltung fungieren. Neueren Hinweisen zufolge wirken die *CRY*-Proteine hauptsächlich, wenn nicht sogar ausschließlich, als Repressoren ohne Photorezeptorfunktion in Säugetieren, während es in *Drosophila* die primären zirkadianen Photorezeptoren sind. Die Entdeckung der Cryptochrome als Proteine der zirkadianen Uhr war für mich persönlich ein sehr befriedigendes Ereignis, da es mir die Möglichkeit bot, wissenschaftliche Beiträge in einem von der DNA-Reparatur weit entfernten Gebiet zu leisten und damit in Wechselwir-



kung mit völlig neuen Kollegen zu treten und völlig neue Denkweisen zu entwickeln.

### Der Kreis schließt sich

In den vergangenen 20 Jahren haben wir am Mechanismus der CRY-Proteine in der zirkadianen Uhr von Säugetieren und ihrer Photorezeptorfunktion in *Drosophila* geforscht und damit zu den derzeitigen Modellen der inneren Uhr beider Organismen beigetragen. Unsere Studien führten auch zu der Entdeckung, dass die zirkadiane Uhr die Exzisionsreparatur in Mäusen reguliert und dass die Karzinogenese durch UV-Licht einer zirkadianen Rhythmik unterliegt. Wir analysieren derzeit, wie der zirkadiane Effekt die DNA-Reparatur im Menschen beeinflusst, und es könnte sich herausstellen dass dieses Wissen von großer Bedeutung für die Optimierung von Chemotherapien sein wird. Abbildung 40 zeigt ein Bild unserer aktuellen Arbeitsgruppe.



**Abbildung 40.** Aktuelles Foto der Arbeitsgruppe (September 2015). Vordere Reihe von rechts nach links: Laura Lindsey-Boltz, Fazile Canturk, Aziz Sancar, Alana Oktay. Hintere Reihe von rechts nach links: Christopher Selby, Yanyan Yang, Yi-Ying Chiou, Jinchuan Hu, Michael Kemp, Muhammet Karaman, Wentao Li, Sheera Adar, Gulnihal Erkmen, Hiroaki Kawara.

### Abschließende Bemerkungen

Ich hatte das große Glück, Eltern zu haben, die mir den Wert von Arbeit und Lernen beibrachten. Ich hatte auch das Glück, ausgezeichnete Lehrer und Mentoren zu haben, von der Grundschule in Savur, über die höhere Schule in Mardin, dem Medizinstudium in Istanbul bis hin zur Promotion und Postdoktorat in Texas und New Haven. Ich danke meiner Familie für ihre Liebe. Mein besonderer Dank geht an meine Frau Gwen für ihre Liebe und Unterstützung – um es mit den Worten eines meiner Mentoren zu sagen: „Aziz, ich glaube ohne Gwen hättest Du es nicht durchgestanden“. Ich danke meinem Patenkind Rose Peifer, die Freude in mein Leben brachte und mir das Gefühl gibt, jung geblieben zu sein.

**Zitierweise:** *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, 55, 8502–8527  
*Angew. Chem.* **2016**, 128, 8643–8670

- [1] „Effect of Visible Light on the Recovery of *Streptomyces Griseus* Conidia from Ultra-violet Irradiation Injury“: A. Kelner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1949**, 35, 73–79.
- [2] „Photoreactivation of Ultraviolet-Irradiated *Escherichia coli*, with Special Reference to the Dose-Reduction Principle and to Ultraviolet-Induced Mutation“: A. Kelner, *J. Bacteriol.* **1949**, 58, 511–522.
- [3] „Photoreactivation in vitro of ultraviolet-inactivated *Hemophilus influenzae* transforming factor“: C. S. Rupert, S. H. Goodgal, M. R. Herriott, *J. Gen. Physiol.* **1958**, 41, 451–471.
- [4] „Photoreactivation of transforming DNA by an enzyme from bakers' yeast“: S. C. Rupert, *J. Gen. Physiol.* **1960**, 43, 573–595.
- [5] „Photoenzymatic repair of ultraviolet damage in DNA. I. Kinetics of the reaction“: S. C. Rupert, *J. Gen. Physiol.* **1962**, 45, 703–724.
- [6] „Photoenzymatic repair of ultraviolet damage in DNA. II. Formation of an enzyme-substrate complex“: S. C. Rupert, *J. Gen. Physiol.* **1962**, 45, 725–741.
- [7] „Disappearance of thymine photodimer in ultraviolet irradiated DNA upon treatment with a photoreactivating enzyme from baker's yeast“: D. L. Wulff, S. C. Rupert, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1962**, 7, 237–240.
- [8] A. Sancar, *A study of photoreactivating enzyme (DNA photolyase) of *Escherichia coli**, PhD Dissertation, University of Texas at Dallas, **1977**.
- [9] „Cloning of the phr gene and amplification of photolyase in *Escherichia coli*“: A. Sancar, S. C. Rupert, *Gene* **1978**, 4, 295–308.
- [10] „*Escherichia coli* DNA photolyase is a flavoprotein“: A. Sancar, B. G. Sancar, *J. Mol. Biol.* **1984**, 172, 223–227.
- [11] „Purification of *Escherichia coli* DNA photolyase“: A. Sancar, F. W. Smith, B. G. Sancar, *J. Biol. Chem.* **1984**, 259, 6028–6032.
- [12] „Identification of a neutral flavin radical and characterization of a second chromophore in *Escherichia coli* DNA photolyase“: M. S. Jorns, G. B. Sancar, A. Sancar, *Biochemistry* **1984**, 23, 2673–2679.
- [13] „Action mechanism of *Escherichia coli* DNA photolyase. I. Formation of the enzyme-substrate complex“: G. B. Sancar, F. W. Smith, R. Reid, G. Payne, M. Levy, A. Sancar, *J. Biol. Chem.* **1987**, 262, 478–485.
- [14] „Action mechanism of *Escherichia coli* DNA photolyase. II. Role of the chromophores in catalysis“: M. S. Jorns, E. T. Baldwin, G. B. Sancar, A. Sancar, *J. Biol. Chem.* **1987**, 262, 486–491.
- [15] „Action mechanism of *Escherichia coli* DNA photolyase. III. Photolysis of the enzyme-substrate complex and the absolute action spectrum“: G. B. Sancar, M. S. Jorns, G. Payne, D. J. Fluke, C. S. Rupert, A. Sancar, *J. Biol. Chem.* **1987**, 262, 492–498.
- [16] „Photochemical properties of *Escherichia coli* DNA photolyase: selective photodecomposition of the second chromophore“: P. F. Heelis, G. Payne, A. Sancar, *Biochemistry* **1987**, 26, 4634–4640.
- [17] „The active form of *Escherichia coli* DNA photolyase contains a fully reduced flavin and not a flavin radical, both in vivo and in vitro“: G. Payne, P. F. Heelis, B. R. Rohrs, A. Sancar, *Biochemistry* **1987**, 26, 7121–7127.
- [18] „Mechanism of damage recognition by *Escherichia coli* DNA photolyase“: I. Husain, G. B. Sancar, S. R. Holbrook, A. Sancar, *J. Biol. Chem.* **1987**, 262, 13188–13197.
- [19] „Identification of the second chromophore of *Escherichia coli* and yeast DNA photolyases as 5,10-methenyltetrahydrofolate“: J. L. Johnson, S. Hamm-Alvarez, G. Payne, G. B. Sancar,

- K. V. Rajagopalan, A. Sancar, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1988**, 85, 2046–2050.
- [20] „Active site of *Escherichia coli* DNA photolyase: mutations at Trp277 alter the selectivity of the enzyme without affecting the quantum yield of photorepair“: Y. F. Li, A. Sancar, *Biochemistry* **1990**, 29, 5698–5706.
- [21] „Active site of DNA photolyase: tryptophan-306 is the intrinsic hydrogen atom donor essential for flavin radical photoreduction and DNA repair in vitro“: Y. F. Li, P. F. Heelis, A. Sancar, *Biochemistry* **1991**, 30, 6322–6329.
- [22] „Determination of rates and yields of interchromophore (folate-flavin) energy transfer and intermolecular (flavin-DNA) electron transfer in *Escherichia coli* photolyase by time-resolved fluorescence and absorption spectroscopy“: S. T. Kim, P. F. Heelis, T. Okamura, Y. Hirata, N. Mataga, A. Sancar, *Biochemistry* **1991**, 30, 11262–11270.
- [23] „Substrate and temperature dependence of DNA Photolyase repair activity examined with ultrafast spectroscopy“: T. Langenbacher, X. D. Zhao, G. Bieser, P. F. Heelis, A. Sancar, E. M. Michel-Beyerle, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 10532–10536.
- [24] „Absolute action spectrum of E-FADH2 and E-FADH2-MTHF forms of *Escherichia coli* DNA photolyase“: G. Payne, A. Sancar, *Biochemistry* **1990**, 29, 7715–7727.
- [25] „Picosecond Laser Photolysis Studies on the Photorepair of Pyrimidine Dimers by DNA Photolyase.1. Laser Photolysis of Photolyase-2-Deoxyuridine Dinucleotide Photodimer Complex“: T. Okamura, A. Sancar, P. F. Heelis, T. P. Begley, Y. Hirata, N. Mataga, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 3143–3145.
- [26] „Analysis of the role of intraprotein electron transfer in photoreactivation by DNA photolyase in vivo“: I. H. Kavakli, A. Sancar, *Biochemistry* **2004**, 43, 15103–15110.
- [27] „Structure and function of DNA photolyase and cryptochrome blue-light photoreceptors“: A. Sancar, *Chem. Rev.* **2003**, 103, 2203–2237.
- [28] „Structure and function of photolyase and in vivo enzymology: 50th anniversary“: A. Sancar, *J. Biol. Chem.* **2008**, 283, 32153–32157.
- [29] „Direct determination of resonance energy transfer in photolyase: structural alignment for the functional state“: C. Tan, L. Guo, Y. Ai, J. Li, L. Wang, A. Sancar, Y. Luo, D. Zhong, *J. Phys. Chem. A* **2014**, 118, 10522–10530.
- [30] „Crystal structure of DNA photolyase from *Escherichia coli*“: H. W. Park, S. T. Kim, A. Sancar, J. Deisenhofer, *Science* **1995**, 268, 1866–1872.
- [31] „Electron Transfer Mechanisms of DNA Repair by Photolyase“: P. D. Zhong, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2015**, 66, 691–715.
- [32] „Direct observation of thymine dimer repair in DNA by photolyase“: Y. T. Kao, C. Saxena, L. Wang, A. Sancar, D. Zhong, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, 102, 16128–16132.
- [33] „Dynamics and mechanism of cyclobutane pyrimidine dimer repair by DNA photolyase“: Z. Liu, C. Tan, X. Guo, Y. T. Kao, J. Li, L. Wang, A. Sancar, D. Zhong, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, 108, 14831–14836.
- [34] „The molecular origin of high DNA-repair efficiency by photolyase“: C. Tan, Z. Y. Liu, J. Li, X. M. Guo, L. J. Wang, A. Sancar, P. D. Zhong, *Nat. Commun.* **2015**, 6, 7302.
- [35] „Structure and function of DNA photolyase“: A. Sancar, *Biochemistry* **1994**, 33, 2–9.
- [36] „Release of Ultraviolet Light-Induced Thymine Dimers from DNA in *E. coli* K-12“: R. P. Boyce, P. Howard-Flanders, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1964**, 51, 293–300.
- [37] „Disappearance of Thymine Dimers from DNA. Error-Correcting Mechanism“: R. B. Setlow, L. W. Carrier, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1964**, 51, 226–231.
- [38] „Overlap of Photoreactivation + Liquid Holding Recovery in *Escherichia coli*“: B. Castellani, J. Jagger, R. B. Setlow, *Science* **1964**, 143, 1170–1171.
- [39] „Evidence for Repair of Ultra-Violet Damaged Deoxyribonucleic Acid in Cultured Mammalian Cells“: R. E. Rasmussen, B. R. Painter, *Nature* **1964**, 203, 1360–1362.
- [40] „Evidence for Excision of Ultraviolet-Induced Pyrimidine Dimers from DNA of Human Cells in Vitro“: J. D. Regan, J. E. Trosko, L. W. Carrier, *Biophys. J.* **1968**, 8, 319–325.
- [41] „In vivo Excision of Pyrimidine Dimers Is Mediated by a DNA N-Glycosylase in *Micrococcus-Luteus* but Not in Human-Fibroblasts“: M. La Belle, S. Linn, *Photochem. Photobiol.* **1982**, 36, 319–324.
- [42] „Photoreversal-Dependent Release of Thymidine and Thymidine Monophosphate from Pyrimidine Dimer-Containing DNA Excision Fragments Isolated from Ultraviolet-Damaged Human-Fibroblasts“: M. Weinfeld, N. E. Gentner, L. D. Johnson, C. M. Paterson, *Biochemistry* **1986**, 25, 2656–2664.
- [43] „Three Loci in *Escherichia coli* K-12 That Control Excision of Pyrimidine Dimers and Certain Other Mutagen Products from DNA“: P. Howard-Flanders, R. P. Boyce, L. Theriot, *Genetics* **1966**, 53, 1119–1136.
- [44] „Defective Repair Replication of DNA in *Xeroderma Pigmentosum*“: E. J. Cleaver, *Nature* **1968**, 218, 652–656.
- [45] „*Xeroderma Pigmentosum* – Biochemical and Genetic Characteristics“: J. E. Cleaver, D. Bootsma, *Annu. Rev. Genet.* **1975**, 9, 19–38.
- [46] „Evidence for Repair-Replication of Ultraviolet Damaged DNA in Bacteria“: D. E. Pettijohn, P. Hanawalt, *J. Mol. Biol.* **1964**, 9, 395–410.
- [47] „Ultraviolet-Light Repair and Mutagenesis Revisited“: A. W. Haseltine, *Cell* **1983**, 33, 13–17.
- [48] „Simple Method for Identification of Plasmid-Coded Proteins“: A. Sancar, A. M. Hack, D. W. Rupp, *J. Bacteriol.* **1979**, 137, 692–693.
- [49] „Identification of the UvrA-Gene Product“: A. Sancar, R. P. Wharton, S. Seltzer, B. M. Kacinski, N. D. Clarke, D. W. Rupp, *J. Mol. Biol.* **1981**, 148, 45–62.
- [50] „Identification of the UvrB-Gene Product“: A. Sancar, N. D. Clarke, J. Griswold, W. J. Kennedy, D. W. Rupp, *J. Mol. Biol.* **1981**, 148, 63–76.
- [51] „Identification of the UvrC-Gene Product“: A. Sancar, B. M. Kacinski, D. L. Mott, D. W. Rupp, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1981**, 78, 5450–5454.
- [52] „A Novel Repair Enzyme – UvrABC Excision Nuclease of *Escherichia coli* Cuts a DNA Strand on Both Sides of the Damaged Region“: A. Sancar, D. W. Rupp, *Cell* **1983**, 33, 249–260.
- [53] „Amplification and Purification of UvrA, UvrB, and UvrC Proteins of *Escherichia coli*“: D. C. Thomas, M. Levy, A. Sancar, *J. Biol. Chem.* **1985**, 260, 9875–9883.
- [54] „Effect of DNA Polymerase I and DNA Helicase II on the Turnover Rate of UvrABC Excision Nuclease“: I. Husain, B. Van Houten, D. C. Thomas, M. Abdelmonem, A. Sancar, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1985**, 82, 6774–6778.
- [55] „Construction of DNA Substrates Modified with Psoralen at a Unique Site and Study of the Action Mechanism of ABC Excinuclease on These Uniformly Modified Substrates“: B. Van Houten, H. Gamper, J. E. Hearst, A. Sancar, *J. Biol. Chem.* **1986**, 261, 14135–14141.
- [56] „Action Mechanism of ABC Excision Nuclease on a DNA Substrate Containing a Psoralen Cross-Link at a Defined Position“: B. Van Houten, H. Gamper, S. R. Holbrook, J. E. Hearst, A. Sancar, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1986**, 83, 8077–8081.
- [57] „Dnase-I Footprint of ABC Excinuclease“: B. Van Houten, H. Gamper, A. Sancar, E. J. Hearst, *J. Biol. Chem.* **1987**, 262, 13180–13187.
- [58] „Analysis of sequential steps of nucleotide excision repair in *Escherichia coli* using synthetic substrates containing single

- psoralen adducts": B. Van Houten, H. Gamper, J. E. Hearst, A. Sancar, *J. Biol. Chem.* **1988**, 263, 16553–16560.
- [59] „The (A)BC Excinuclease of *Escherichia coli* Has Only the UvrB and UvrC Subunits in the Incision Complex": D. K. Orren, A. Sancar, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, 86, 5237–5241.
- [60] „Formation and enzymatic properties of the UvrB-DNA complex": D. K. Orren, A. Sancar, *J. Biol. Chem.* **1990**, 265, 15796–15803.
- [61] „Post-Incision Steps of Nucleotide Excision Repair in *Escherichia coli* Disassembly of the UvrBC-DNA Complex by Helicase II and DNA Polymerase-I": D. K. Orren, C. P. Selby, J. E. Hearst, A. Sancar, *J. Biol. Chem.* **1992**, 267, 780–788.
- [62] „A New Mechanism for Repairing Oxidative Damage to DNA – (A)BC Excinuclease Removes AP Sites and Thymine Glycols from DNA": J. J. Lin, A. Sancar, *Biochemistry* **1989**, 28, 7979–7984.
- [63] „Active-Site of (A)BC Excinuclease. 1. Evidence for 5' Incision by UvrC through a Catalytic Site Involving Asp399, Asp438, Asp466, and His538 Residues": J. J. Lin, A. Sancar, *J. Biol. Chem.* **1992**, 267, 17688–17692.
- [64] „Active-Site of (A)BC Excinuclease. 2. Binding, Bending, and Catalysis Mutants of UvrB Reveal a Direct Role in 3' and an Indirect Role in 5' Incision": J. J. Lin, A. M. Phillips, J. E. Hearst, A. Sancar, *J. Biol. Chem.* **1992**, 267, 17693–17700.
- [65] „(A)BC Excinuclease – the *Escherichia coli* Nucleotide Excision Repair Enzyme": J. J. Lin, A. Sancar, *Mol. Microbiol.* **1992**, 6, 2219–2224.
- [66] „Molecular Matchmakers": A. Sancar, E. J. Hearst, *Science* **1993**, 259, 1415–1420.
- [67] „The repair patch of *E. coli* (A)BC excinuclease": Sibghat-Ullah, A. Sancar, E. J. Hearst, *Nucleic Acids Res.* **1990**, 18, 5051–5053.
- [68] „DNA-Repair Enzymes": A. Sancar, B. G. Sancar, *Annu. Rev. Biochem.* **1988**, 57, 29–67.
- [69] „Catalytic sites for 3' and 5' incision of *Escherichia coli* nucleotide excision repair are both located in UvrC": E. E. A. Verhoeven, M. van Kesteren, G. F. Moolenaar, R. Visse, N. Goosen, *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 5120–5123.
- [70] „Conserved domains in DNA repair proteins and evolution of repair systems": L. Aravind, D. R. Walker, V. E. Koonin, *Nucleic Acids Res.* **1999**, 27, 1223–1242.
- [71] „DNA-Repair in an Active Gene – Removal of Pyrimidine Dimers from the Dhfr Gene of Cho Cells Is Much More Efficient Than in the Genome Overall": V. A. Bohr, C. A. Smith, D. S. Okumoto, C. P. Hanawalt, *Cell* **1985**, 40, 359–369.
- [72] „Selective Removal of Transcription-Blocking DNA Damage from the Transcribed Strand of the Mammalian Dhfr Gene": I. Mellon, G. Spivak, C. P. Hanawalt, *Cell* **1987**, 51, 241–249.
- [73] „Induction of the *Escherichia coli* Lactose Operon Selectively Increases Repair of Its Transcribed DNA Strand": I. Mellon, C. P. Hanawalt, *Nature* **1989**, 342, 95–98.
- [74] „Transcription preferentially inhibits nucleotide excision repair of the template DNA strand in vitro": C. P. Selby, A. Sancar, *J. Biol. Chem.* **1990**, 265, 21330–21336.
- [75] „Gene- and strand-specific repair in vitro: partial purification of a transcription-repair coupling factor": C. P. Selby, A. Sancar, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, 88, 8232–8236.
- [76] „*Escherichia coli* mfd mutant deficient in "mutation frequency decline", lacks strand-specific repair: in vitro complementation with purified coupling factor": C. P. Selby, E. M. Witkin, A. Sancar, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, 88, 11574–11578.
- [77] „Molecular Mechanism of Transcription-Repair Coupling": C. P. Selby, A. Sancar, *Science* **1993**, 260, 53–58.
- [78] „Mechanisms of transcription-repair coupling and mutation frequency decline": C. P. Selby, A. Sancar, *Microbiol. Rev.* **1994**, 58, 317–329.
- [79] „Structure and Function of Transcription-Repair Coupling Factor. 1. Structural Domains and Binding Properties": C. P. Selby, A. Sancar, *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, 4882–4889.
- [80] „Structure and Function of Transcription-Repair Coupling Factor. 2. Catalytic Properties": C. P. Selby, A. Sancar, *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, 4890–4895.
- [81] „RNA polymerase II, stalled at a thymine dimer: footprint and effect on excision repair": C. P. Selby, R. Drapkin, D. Reinberg, A. Sancar, *Nucleic Acids Res.* **1997**, 25, 787–793.
- [82] „Mechanisms of DNA excision repair": A. Sancar, *Science* **1994**, 266, 1954–1956.
- [83] „Nucleotide Excision Repair": A. Sancar, S. M. Tang, *Photochem. Photobiol.* **1993**, 57, 905–921.
- [84] „Radiation-Induced Mutations and Their Repair": M. E. Witkin, *Science* **1966**, 152, 1345–1353.
- [85] „Human Nucleotide Excision Repair In vitro – Repair of Pyrimidine Dimers, Psoralen and Cisplatin Adducts by Hela Cell-Free Extract": Sibghat-Ullah, I. Husain, W. Carlton, A. Sancar, *Nucleic Acids Res.* **1989**, 17, 4471–4484.
- [86] „Human nucleotide excision nuclease removes thymine dimers from DNA by incising the 22nd phosphodiester bond 5' and the 6th phosphodiester bond 3' to the photodimer": J. C. Huang, D. L. Svoboda, J. T. Reardon, A. Sancar, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, 89, 3664–3668.
- [87] „Purification of PCNA as a Nucleotide Excision Repair Protein": A. F. Nichols, A. Sancar, *Nucleic Acids Res.* **1992**, 20, 2441–2446.
- [88] „Excision Repair in Man and the Molecular Basis of Xeroderma Pigmentosum Syndrome": J. T. Reardon, L. H. Thompson, A. Sancar, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **1993**, 58, 605–617.
- [89] „DNA Repair by Eukaryotic Nucleotide Excision Nuclease – Removal of Thymine Dimer and Psoralen Monoadduct by Hela Cell-Free Extract and of Thymine Dimer by *Xenopus laevis* Oocytes": D. L. Svoboda, J. S. Taylor, J. E. Hearst, A. Sancar, *J. Biol. Chem.* **1993**, 268, 1931–1936.
- [90] „HMG-domain proteins specifically inhibit the repair of the major DNA adduct of the anticancer drug cisplatin by human excision nuclease": J. C. Huang, D. B. Zamble, J. T. Reardon, S. J. Lippard, A. Sancar, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, 91, 10394–10398.
- [91] „Substrate spectrum of human excinuclease: repair of abasic sites, methylated bases, mismatches, and bulky adducts": J. C. Huang, D. S. Hsu, A. Kazantsev, A. Sancar, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, 91, 12213–12217.
- [92] „Dual role of TFIIH in DNA excision repair and in transcription by RNA polymerase II": R. Drapkin, J. T. Reardon, A. Ansari, J. C. Huang, L. Zawel, K. Ahn, A. Sancar, D. Reinberg, *Nature* **1994**, 368, 769–772.
- [93] „Reconstitution of human DNA repair excision nuclease in a highly defined system": D. Mu, C. H. Park, T. Matsunaga, D. S. Hsu, J. T. Reardon, A. Sancar, *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, 2415–2418.
- [94] „Formation of a ternary complex by human XPA, ERCC1, and ERCC4(XPF) excision repair proteins": C. H. Park, A. Sancar, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, 91, 5017–5021.
- [95] „Human DNA-Repair Excision Nuclease – Analysis of the Roles of the Subunits Involved in Dual Incisions by Using Anti-XPG and Anti-ERCC1 Antibodies": T. Matsunaga, D. Mu, C. H. Park, J. T. Reardon, A. Sancar, *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, 20862–20869.
- [96] „Purification and Characterization of the XPF ERCC1 Complex of Human DNA Repair Excision Nuclease": C. H. Park, T. Bessho, T. Matsunaga, A. Sancar, *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, 22657–22660.



- [97] „Reaction mechanism of human DNA repair excision nuclease“: D. Mu, D. S. Hsu, A. Sancar, *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 8285–8294.
- [98] „Replication protein A confers structure-specific endonuclease activities to the XPF-ERCC1 and XPG subunits of human DNA repair excision nucleases“: T. Matsunaga, C. H. Park, T. Bessho, D. Mu, A. Sancar, *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 11047–11050.
- [99] „Overproduction, purification, and characterization of the XPC subunit of the human DNA repair excision nuclease“: J. T. Reardon, D. Mu, A. Sancar, *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 19451–19456.
- [100] „Recognition and repair of compound DNA lesions (base damage and mismatch) by human mismatch repair and excision repair systems“: D. Mu, M. Tursun, D. R. Duckett, J. T. Drummond, P. Modrich, A. Sancar, *Mol. Cell. Biol.* **1997**, 17, 760–769.
- [101] „Reconstitution of human excision nuclease with recombinant XPF-ERCC1 complex“: T. Bessho, A. Sancar, L. H. Thompson, P. M. Thelen, *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 3833–3837.
- [102] „Rodent UV-sensitive mutant cell lines in complementation groups 6–10 have normal general excision repair activity“: J. T. Reardon, L. H. Thompson, A. Sancar, *Nucleic Acids Res.* **1997**, 25, 1015–1021.
- [103] „Characterization of reaction intermediates of human excision repair nuclease“: D. Mu, M. Wakasugi, D. S. Hsu, A. Sancar, *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 28971–28979.
- [104] „The non-catalytic function of XPG protein human nucleotide excision repair“: M. Wakasugi, J. T. Reardon, A. Sancar, *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 16030–16034.
- [105] „Assembly, subunit composition, and footprint of human DNA repair excision nuclease“: M. Wakasugi, A. Sancar, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, 95, 6669–6674.
- [106] „Order of assembly of human DNA repair excision nuclease“: M. Wakasugi, A. Sancar, *J. Biol. Chem.* **1999**, 274, 18759–18768.
- [107] „Efficient nucleotide excision repair of cisplatin, oxaliplatin, and Bis-aceto-ammine-dichloro-cyclohexylamine-platinum-(IV) (JM216) platinum intrastrand DNA diadducts“: J. T. Reardon, A. Vaisman, S. G. Chaney, A. Sancar, *Cancer Res.* **1999**, 59, 3968–3971.
- [108] „Initiation of DNA interstrand cross-link repair in humans: the nucleotide excision repair system makes dual incisions 5' to the cross-linked base and removes a 22- to 28-nucleotide-long damage-free strand“: T. Bessho, D. Mu, A. Sancar, *Mol. Cell. Biol.* **1997**, 17, 6822–6830.
- [109] „DNA interstrand cross-links induce futile repair synthesis in mammalian cell extracts“: D. Mu, T. Bessho, L. V. Nechev, D. J. Chen, T. M. Harris, J. E. Hearst, A. Sancar, *Mol. Cell. Biol.* **2000**, 20, 2446–2454.
- [110] „DNA damage in the nucleosome core is refractory to repair by human excision nuclease“: R. Hara, J. Y. Mo, A. Sancar, *Mol. Cell. Biol.* **2000**, 20, 9173–9181.
- [111] „The SWI/SNF chromatin-remodeling factor stimulates repair by human excision nuclease in the mononucleosome core particle“: R. Hara, A. Sancar, *Mol. Cell. Biol.* **2002**, 22, 6779–6787.
- [112] „Effect of damage type on stimulation of human excision nuclease by SWI/SNF chromatin remodeling factor“: R. Hara, A. Sancar, *Mol. Cell. Biol.* **2003**, 23, 4121–4125.
- [113] „Nucleotide excision repair from site-specifically platinum-modified nucleosomes“: D. Wang, R. Hara, G. Singh, A. Sancar, J. S. Lippard, *Biochemistry* **2003**, 42, 6747–6753.
- [114] „DNA repair excision nuclease attacks undamaged DNA – A potential source of spontaneous mutations“: M. E. Branum, J. T. Reardon, A. Sancar, *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 25421–25426.
- [115] „Recognition and repair of the cyclobutane thymine dimer, a major cause of skin cancers, by the human excision nuclease“: J. T. Reardon, A. Sancar, *Genes Dev.* **2003**, 17, 2539–2551.
- [116] „Thermodynamic cooperativity and kinetic proofreading in DNA damage recognition and repair“: J. T. Reardon, A. Sancar, *Cell Cycle* **2004**, 3, 141–144.
- [117] „A mathematical model for human nucleotide excision repair: damage recognition by random order assembly and kinetic proofreading“: K. J. Kessler, W. K. Kaufmann, J. T. Reardon, T. C. Elston, A. Sancar, *J. Theor. Biol.* **2007**, 249, 361–375.
- [118] „Xeroderma pigmentosum complementation group E protein (XPE/DDB2): Purification of various complexes of XPE and analyses of their damaged DNA binding and putative DNA repair properties“: G. Kulaksiz, J. T. Reardon, A. Sancar, *Mol. Cell. Biol.* **2005**, 25, 9784–9792.
- [119] „Characterization of transcription-repair coupling factors in *E. coli* and humans“: C. P. Selby, A. Sancar, *Methods Enzymol.* **2003**, 371, 300–324.
- [120] „DNA excision repair“: A. Sancar, *Annu. Rev. Biochem.* **1996**, 65, 43–81.
- [121] „Nucleotide excision repair: From *E. coli* to man“: C. Petit, A. Sancar, *Biochimie* **1999**, 81, 15–25.
- [122] „Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints“: A. Sancar, L. A. Lindsey-Boltz, K. Unsal-Kacmaz, S. Linn, *Annu. Rev. Biochem.* **2004**, 73, 39–85.
- [123] „Nucleotide excision repair in *E. coli* and man“: A. Sancar, J. T. Reardon, *DNA Repair Replication* **2004**, 69, 43–71.
- [124] „Nucleotide excision repair“: J. T. Reardon, A. Sancar, *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **2005**, 79, 183–235.
- [125] „Purification and characterization of *Escherichia coli* and human nucleotide excision repair enzyme systems“: J. T. Reardon, A. Sancar, *DNA Repair Part A* **2006**, 408, 189–213.
- [126] „Repair of DNA-polypeptide crosslinks by human excision nuclease“: J. T. Reardon, A. Sancar, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, 103, 4056–4061.
- [127] „Purification and characterization of human DNA damage checkpoint Rad complexes“: L. A. Lindsey-Boltz, V. P. Bermudez, J. Hurwitz, A. Sancar, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, 98, 11236–11241.
- [128] „Loading of the human 9-1-1 checkpoint complex onto DNA by the checkpoint clamp loader hRad17-replication factor C complex in vitro“: V. P. Bermudez, L. A. Lindsey-Boltz, A. J. Cesare, Y. Maniwa, J. D. Griffith, J. Hurwitz, A. Sancar, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, 100, 1633–1638.
- [129] „Reconstitution of RPA-covered single-stranded DNA-activated ATR-Chk1 signaling“: J. H. Choi, L. A. Lindsey-Boltz, M. Kemp, A. C. Mason, M. S. Wold, A. Sancar, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, 107, 13660–13665.
- [130] „Coupling of human DNA excision repair and the DNA damage checkpoint in a defined in vitro system“: L. A. Lindsey-Boltz, M. G. Kemp, J. T. Reardon, V. DeRocco, R. R. Iyer, P. Modrich, A. Sancar, *J. Biol. Chem.* **2014**, 289, 5074–5082.
- [131] „Mechanism of release and fate of excised oligonucleotides during nucleotide excision repair“: M. G. Kemp, J. T. Reardon, L. A. Lindsey-Boltz, A. Sancar, *J. Biol. Chem.* **2012**, 287, 22889–22899.
- [132] „DNA excision repair: where do all the dimers go?“: M. G. Kemp, A. Sancar, *Cell Cycle* **2012**, 11, 2997–3002.
- [133] „Nucleotide excision repair in human cells: fate of the excised oligonucleotide carrying DNA damage in vivo“: J. Hu, J. H. Choi, S. Gaddameedhi, M. G. Kemp, J. T. Reardon, A. Sancar, *J. Biol. Chem.* **2013**, 288, 20918–20926.
- [134] „Highly specific and sensitive method for measuring nucleotide excision repair kinetics of ultraviolet photoproducts in human cells“: J. H. Choi, S. Gaddameedhi, S. Y. Kim, J. Hu, M. G. Kemp, A. Sancar, *Nucleic Acids Res.* **2014**, 42, e29.

- [135] „DNA repair synthesis and ligation affect the processing of excised oligonucleotides generated by human nucleotide excision repair“: M. G. Kemp, S. Gaddameedhi, J. H. Choi, J. Hu, A. Sancar, *J. Biol. Chem.* **2014**, *289*, 26574–26583.
- [136] „An Integrated Approach for Analysis of the DNA Damage Response in Mammalian Cells: Nucleotide Excision Repair, DNA Damage Checkpoint, and Apoptosis“: J. H. Choi, S. Y. Kim, S. K. Kim, M. G. Kemp, A. Sancar, *J. Biol. Chem.* **2015**, *290*, 28812–28821.
- [137] „Analysis of Ribonucleotide Removal from DNA by Human Nucleotide Excision Repair“: L. A. Lindsey-Boltz, M. G. Kemp, J. Hu, A. Sancar, *J. Biol. Chem.* **2015**, *290*, 29801–29807.
- [138] „Genome-wide analysis of human global and transcription-coupled excision repair of UV damage at single-nucleotide resolution“: J. Hu, S. Adar, C. P. Selby, J. D. Lieb, A. Sancar, *Genes Dev.* **2015**, *29*, 948–960.
- [139] „Evidence for lack of DNA photoreactivating enzyme in humans“: Y. F. Li, S. T. Kim, A. Sancar, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 4389–4393.
- [140] „Photoreactivating enzyme from human leukocytes“: M. B. Sutherland, *Nature* **1974**, *248*, 109–112.
- [141] „Initial assessment of human gene diversity and expression patterns based upon 83 million nucleotides of cDNA sequence“: M. D. Adams, A. R. Kerlavage, R. D. Fleischmann, R. A. Fuldner, C. J. Bult, N. H. Lee, E. F. Kirkness, K. G. Weinstock, J. D. Gocayne, O. White, et al., *Nature* **1995**, *377*, 3–174.
- [142] „Internal timekeeping“: J. W. Schwartz, *Sci. Med.* **1996**, *3*, 44–53.
- [143] „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“: K. Malhotra, S. T. Kim, A. Batschauer, L. Dawut, A. Sancar, *Biochemistry* **1995**, *34*, 6892–6899.
- [144] „Putative human blue-light photoreceptors hCRY1 and hCRY2 are flavoproteins“: D. S. Hsu, X. Zhao, S. Zhao, A. Kazantsev, R. P. Wang, T. Todo, Y. F. Wei, A. Sancar, *Biochemistry* **1996**, *35*, 13871–13877.
- [145] „Vitamin B2-based blue-light photoreceptors in the retinohypothalamic tract as the photoactive pigments for setting the circadian clock in mammals“: Y. Miyamoto, A. Sancar, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 6097–6102.
- [146] „A web of circadian pacemakers“: U. Schibler, P. Sassone-Corsi, *Cell* **2002**, *111*, 919–922.
- [147] „Coordination of circadian timing in mammals“: S. M. Reppert, R. D. Weaver, *Nature* **2002**, *418*, 935–941.
- [148] „A clockwork web: circadian timing in brain and periphery, in health and disease“: M. H. Hastings, A. B. Reddy, S. E. Maywood, *Nat. Rev. Neurosci.* **2003**, *4*, 649–661.
- [149] „Molecular architecture of the mammalian circadian clock“: C. L. Partch, C. B. Green, S. J. Takahashi, *Trends Cell Biol.* **2014**, *24*, 90–99.
- [150] „Role of mouse cryptochrome blue-light photoreceptor in circadian photoresponses“: R. J. Thresher, M. H. Vitaterna, Y. Miyamoto, A. Kazantsev, D. S. Hsu, C. Petit, C. P. Selby, L. Dawut, O. Smithies, J. S. Takahashi, A. Sancar, *Science* **1998**, *282*, 1490–1494.
- [151] „Differential regulation of mammalian period genes and circadian rhythmicity by cryptochromes 1 and 2“: M. H. Vitaterna, C. P. Selby, T. Todo, H. Niwa, C. Thompson, E. M. Fruechte, K. Hitomi, R. J. Thresher, T. Ishikawa, J. Miyazaki, J. S. Takahashi, A. Sancar, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 12114–12119.
- [152] „Circadian regulation of cryptochrome genes in the mouse“: Y. Miyamoto, A. Sancar, *Mol. Brain Res.* **1999**, *71*, 238–243.
- [153] „Cryptochrome: the second photoactive pigment in the eye and its role in circadian photoreception“: A. Sancar, *Annu. Rev. Biochem.* **2000**, *69*, 31–67.
- [154] „Functional redundancy of cryptochromes and classical photoreceptors for nonvisual ocular photoreception in mice“: C. P. Selby, C. Thompson, T. M. Schmitz, R. N. Van Gelder, A. Sancar, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 14697–14702.
- [155] „Photolyase/cryptochrome family blue-light photoreceptors use light energy to repair DNA or set the circadian clock“: A. Sancar, C. Thompson, R. J. Thresher, F. Araujo, J. Mo, S. Ozgur, E. Vagas, L. Dawut, P. C. Selby, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **2000**, *65*, 157–171.
- [156] „Expression of the blue-light receptor cryptochrome in the human retina“: C. L. Thompson, C. Bowes Rickman, S. J. Shaw, J. N. Ebright, U. Kelly, A. Sancar, W. D. Rickman, *Invest. Ophthalmol. Visual Sci.* **2003**, *44*, 4515–4521.
- [157] „Further evidence for the role of cryptochromes in retinohypothalamic photoreception/phototransduction“: C. L. Thompson, C. P. Selby, C. L. Partch, D. T. Plante, R. J. Thresher, F. Araujo, A. Sancar, *Mol. Brain Res.* **2004**, *122*, 158–166.
- [158] „Regulation of the mammalian circadian clock by cryptochrome“: A. Sancar, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 34079–34082.
- [159] „Effect of vitamin A depletion on nonvisual phototransduction pathways in cryptochromeless mice“: C. L. Thompson, C. P. Selby, R. N. Van Gelder, W. S. Blanner, J. Lee, L. Quadro, K. Lai, M. E. Gottesman, A. Sancar, *J. Biol. Rhythms* **2004**, *19*, 504–517.
- [160] „Role of structural plasticity in signal transduction by the cryptochrome blue-light photoreceptor“: C. L. Partch, M. W. Clarkson, S. Ozgur, A. L. Lee, A. Sancar, *Biochemistry* **2005**, *44*, 3795–3805.
- [161] „Cryptochromes and circadian photoreception in animals“: C. L. Partch, A. Sancar, *Methods Enzymol.* **2005**, *393*, 726–745.
- [162] „Cryptochrome, circadian cycle, cell cycle checkpoints, and cancer“: M. A. Gauger, A. Sancar, *Cancer Res.* **2005**, *65*, 6828–6834.
- [163] „Analysis of autophosphorylating kinase activities of *Arabidopsis* and human cryptochromes“: S. Özgür, A. Sancar, *Biochemistry* **2006**, *45*, 13369–13374.
- [164] „Formation and function of flavin anion radical in cryptochrome 1 blue-light photoreceptor of monarch butterfly“: S. H. Song, N. Ozturk, T. R. Denaro, N. O. Arat, Y. T. Kao, H. Zhu, D. Zhong, S. M. Reppert, A. Sancar, *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 17608–17612.
- [165] „Structure and function of animal cryptochromes“: N. Öztürk, S. H. Song, S. Özgür, C. P. Selby, L. Morrison, C. Partch, D. Zhong, A. Sancar, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **2007**, *72*, 119–131.
- [166] „Reaction mechanism of *Drosophila* cryptochrome“: N. Ozturk, C. P. Selby, Y. Annayev, D. Zhong, A. Sancar, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 516–521.
- [167] „Loss of cryptochrome reduces cancer risk in p53 mutant mice“: N. Ozturk, J. H. Lee, S. Gaddameedhi, A. Sancar, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 2841–2846.
- [168] „Circadian clock disruption improves the efficacy of chemotherapy through p73-mediated apoptosis“: J. H. Lee, A. Sancar, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 10668–10672.
- [169] „Circadian clock, cancer, and chemotherapy“: A. Sancar, L. A. Lindsey-Boltz, S. Gaddameedhi, C. P. Selby, R. Ye, Y. Y. Chiou, M. G. Kemp, J. Hu, J. H. Lee, N. Ozturk, *Biochemistry* **2015**, *54*, 110–123.
- [170] „Circadian clock control of the cellular response to DNA damage“: A. Sancar, L. A. Lindsey-Boltz, T. H. Kang, J. T. Reardon, J. H. Lee, N. Ozturk, *FEBS Lett.* **2010**, *584*, 2618–2625.
- [171] „Biochemical analysis of the canonical model for the mammalian circadian clock“: R. Ye, C. P. Selby, N. Ozturk, Y. Annayev, A. Sancar, *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 25891–25902.
- [172] „Dual modes of CLOCK:BMAL1 inhibition mediated by Cryptochrome and Period proteins in the mammalian circadian

- clock“: R. Ye, C. P. Selby, Y. Y. Chiou, I. Ozkan-Dagliyan, S. Gaddameedhi, A. Sancar, *Genes Dev.* **2014**, 28, 1989–1998.
- [173] „Circadian oscillation of nucleotide excision repair in mammalian brain“: T. H. Kang, J. T. Reardon, M. Kemp, A. Sancar, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, 106, 2864–2867.
- [174] „Circadian control of XPA and excision repair of cisplatin-DNA damage by cryptochrome and HERC2 ubiquitin ligase“: T. H. Kang, L. A. Lindsey-Boltz, J. T. Reardon, A. Sancar, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, 107, 4890–4895.
- [175] „Regulation of nucleotide excision repair activity by transcriptional and post-transcriptional control of the XPA protein“: T. H. Kang, J. T. Reardon, A. Sancar, *Nucleic Acids Res.* **2011**, 39, 3176–3187.
- [176] „Control of skin cancer by the circadian rhythm“: S. Gaddameedhi, C. P. Selby, W. K. Kaufmann, R. C. Smart, A. Sancar, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, 108, 18790–18795.
- [177] „The circadian clock controls sunburn apoptosis and erythema in mouse skin“: S. Gaddameedhi, C. P. Selby, M. G. Kemp, R. Ye, A. Sancar, *J. Invest. Dermatol.* **2015**, 135, 1119–1127.
- [178] J. Buckingham, *Chasing the Molecule*, Sutton Publishing, England, **2004**.
- [179] „Watching DNA repair in real time“: A. Stuchebrukhov, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, 108, 19445–19446.

Eingegangen am 12. Februar 2016

Online veröffentlicht am 23. Juni 2016

Übersetzt von Prof. Dr. Thomas Carell und Dr. Dorothea Matschkal, München