

Kapitel 5

Bestimmung des g-Tensors des FADH[•]-Kofaktors der DNS-Photolyase

Im folgenden Kapitel werden Hochfeld-EPR- und ENDOR-Messungen am Flavinkofaktorradikal FADH[•] in der DNS-Photolyase von *Escherichia coli* bei 95 GHz und 360 GHz dargestellt. Mit Hilfe der Messungen bei 360 GHz gelang es erstmals, die g-Tensor-Hauptwerte im EPR-Pulverspektrum von FADH[•] vollständig aufzulösen und damit ihre Beträge zu bestimmen. Zusätzlich konnte die Orientierung des g-Tensors im Molekülachsensystem durch den Vergleich der Hyperfeinaufspaltung im EPR-Spektrum mit ENDOR-Messungen bei 9.5 GHz/14.4 MHz und 95 GHz/144 MHz ermittelt werden. Im ersten Abschnitt des Kapitels gebe ich einen kurzen Überblick über die Funktion des untersuchten Flavinkofaktors FADH[•] in der DNS-Photolyase. Die Präparation der Proben ist in Abschnitt 5.2 beschrieben, während in 5.3 die experimentellen Ergebnisse und ihre Interpretation dargestellt sind. Das Kapitel enthält die in [17] veröffentlichten Ergebnisse, sowie W-Band-EPR und ENDOR-Messungen an FADH[•].

5.1 Der Flavinkofaktor der DNS-Photolyase

Photolyasen sind Enzyme, die durch UV-Licht geschädigte DNS-Stränge reparieren [126]. CPD-Photolyasen reparieren Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere (CPD). CPDs entstehen durch photochemische [2+2]-Cycloaddition zweier benachbarter Pyrimidine in der DNS [127]. Die für den Reparaturprozess notwendige Energie wird durch Absorption von ultraviolettem Licht aufgebracht. CPD-Photolyasen besitzen zwei nicht kovalent gebundene Kofaktoren: das katalytisch aktive Fla-

vinadenindinukleotid (FAD) und einen Antennenkofaktor, der entweder ein 5,10-Methenyltetrahydrofolylpolyglutamat (MTHF) oder ein 8-Hydroxy-5-deazaflavin (8-HDF) ist [126, 128]. 1995 konnte von Park *et al.* die Röntgenstruktur der CPD-Photolyase von *Escherichia coli* bestimmt werden (Brookhaven Protein-datenbankeintrag: 1 DNP [129]).

Für den DNS-Reparaturmechanismus der CPD-Photolyase wird die in Abbildung 5.1 dargestellte Reaktionskette angenommen [126, 128]. Zuerst bindet die Photolyase an die DNS und lokalisiert den Schaden am Substrat. Dieser Vorgang ist lichtunabhängig. Unter Bestrahlung von UV-Licht absorbiert das Chromophor ein Lichtquant und transferiert die Energie strahlungslos mittels Förstertransfer auf das vollreduzierte, anionische FADH⁻. Das angeregte FADH⁻ gibt das Elektron an das CPD weiter, was zur Spaltung des Pyr<>Pyr^{-•}-Dimers führt und damit zu einer Reparatur des geschädigten DNS-Abschnitts. Anschließend wird das Elektron vom Substrat an das FADH[•] zurücktransferiert, wodurch wieder das katalytisch wirksame FADH⁻ entsteht [130].

Im Rahmen meiner Arbeit habe ich das stabile Radikal FADH[•] untersucht

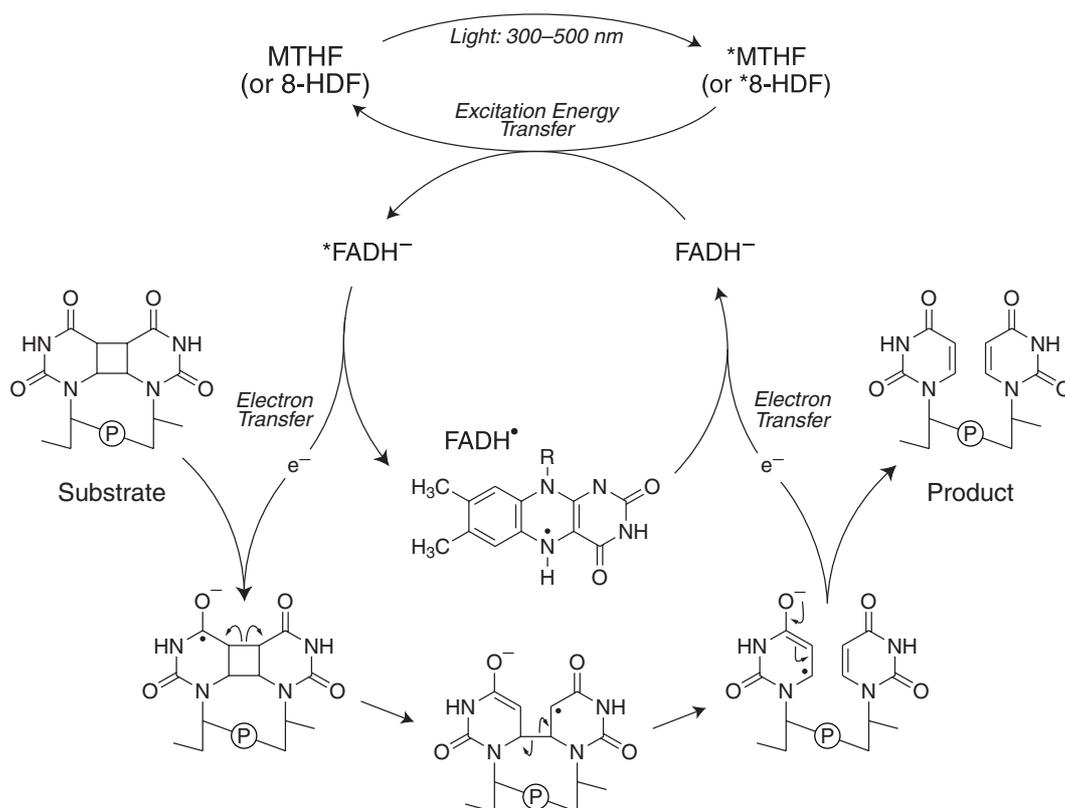


Abbildung 5.1: Angenommener Reaktionsmechanismus der CPD-Photolyase [130, 131]

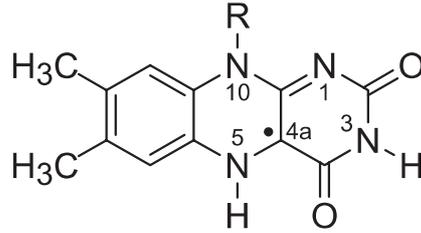


Abbildung 5.2: Molekulare Struktur und IUPAC Nummerierung der 7,8-Dimethyl Isolloxazin Hälfte eines Flavins-Semichinon

(siehe Abb. 5.2). FADH^\bullet ist eine natürliche Spinprobe im aktiven Zentrum der Photolyase, die mit Hilfe von EPR- und ENDOR-Methoden untersucht werden kann. Durch die Bestimmung der elektronischen Struktur des Kofaktors lassen sich wichtige Informationen über seine Wechselwirkungen mit der Proteinumgebung und anderen Kofaktoren gewinnen [131, 132]. Die physikalischen Größen zur Untersuchung der elektronischen Struktur sind die Hyperfeinstruktur und der g-Tensor. Die Kenntnis des g-Tensors ist darüberhinaus von entscheidender Bedeutung bei der Interpretation transienter Radikalpaarspektren, wie sie in Photolyasen nach Lichtanregung auftreten [132, 133]. Aus Simulationen von Radikalpaarspektren kann der Abstand und die Orientierung der das Radikalpaar bildenden Spezies gewonnen werden (siehe z.B. [109, 134]). Dafür ist die Kenntnis der g-Tensoren und der Hyperfeinstruktur der beteiligten Radikale notwendig, um die Anzahl der freien Parameter bei der Simulation der Spektren auf ein handhabbares Maß zu reduzieren.

Im Vergleich zu den im letzten Kapitel untersuchten photosynthetischen Reaktionszentren existieren für FADH^\bullet und andere Flavine nur sehr wenige g-Tensor-Untersuchungen. In einer 94.5-GHz-Studie wurde der isotrope g-Wert von FADH^\bullet bestimmt [131], allerdings gelang es bei dieser Frequenz nicht, die Hauptwerte aufzulösen. Im Rahmen meiner Arbeit konnte ich zeigen, dass für eine vollständige Auflösung der g-Tensor-Hauptwerte Felder von mehr als 10 T notwendig sind.

5.2 Probenpräparation

Alle Experimente in dieser Arbeit wurden an der E109A Mutante der DNS-Photolyase von *Escherichia coli* durchgeführt. Die Ersetzung der Glutaminsäure E109 durch Alanin führt zu einem Enzym ohne den Antennenkofaktor (MTHF). Die Mutante hat die gleichen EPR-spektroskopischen Eigenschaften wie der Wildtyp [131, 132]. Herstellung der E109-Mutante und ihre Reinigung wurden in [130] beschrieben. Die Enzymkonzentration von 1.5 mM wurde mit Hilfe der Absorp-

tion von FADH• bei 580 nm ($\epsilon_{580} = 4800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [135]) errechnet. Mit einem Shimadzu UV-1600PC (ShimadzuTM, Columbia, MD) Spektrophotometer wurden bei Raumtemperatur Absorptionsspektren aufgenommen. Die Proben wurden durch wiederholtes Verdünnen mit anschliessendem Zentrifugieren durch C30 Mikrokonzentratoren (MilliporeTM, Billerica, MA) bei 4°C in den Puffer (50 mM Hepes in H₂O/ Glyzerin (pH 7.0) oder 50 mM Hepes in D₂O/ Glyzerin D₃ (pD 7.0)) eingebracht. Dieser Zyklus wurde fünfmal wiederholt, bis eine Puffer- bzw. D₂O-Anreicherung von 95 - 99 % erreicht war.

5.3 Ergebnisse und Diskussion

5.3.1 Bestimmung der g-Tensor-Hauptwerte

Abbildung 5.3 zeigt 95-GHz-EPR-Spektren des FADH[•]-Kofaktors der DNS-Photolyase in *Escherichia coli*. Dargestellt ist sowohl das cw-Spektrum (unten) als auch das gepulste Spektrum (oben) bei 145 K. Beide Spektren zeigen die Charakteristika eines durch einen nahezu axialen g-Tensor verbreiterten EPR-Pulverspektrums ($g_{xx} \approx g_{yy}$), die Hauptwerte sind im 95-GHz-Spektrum nicht voneinander zu trennen, weil die anisotrope Verbreiterung der Linien größer ist als die Aufspaltung durch die Elektron-Zeeman-Wechselwirkung. Im cw-Spektrum sind neben dem Photolyasespektrum noch die durch Sterne gekennzeichneten Linien des Manganstandards zu erkennen. Die Linienform des gepulsten Spektrums unter-

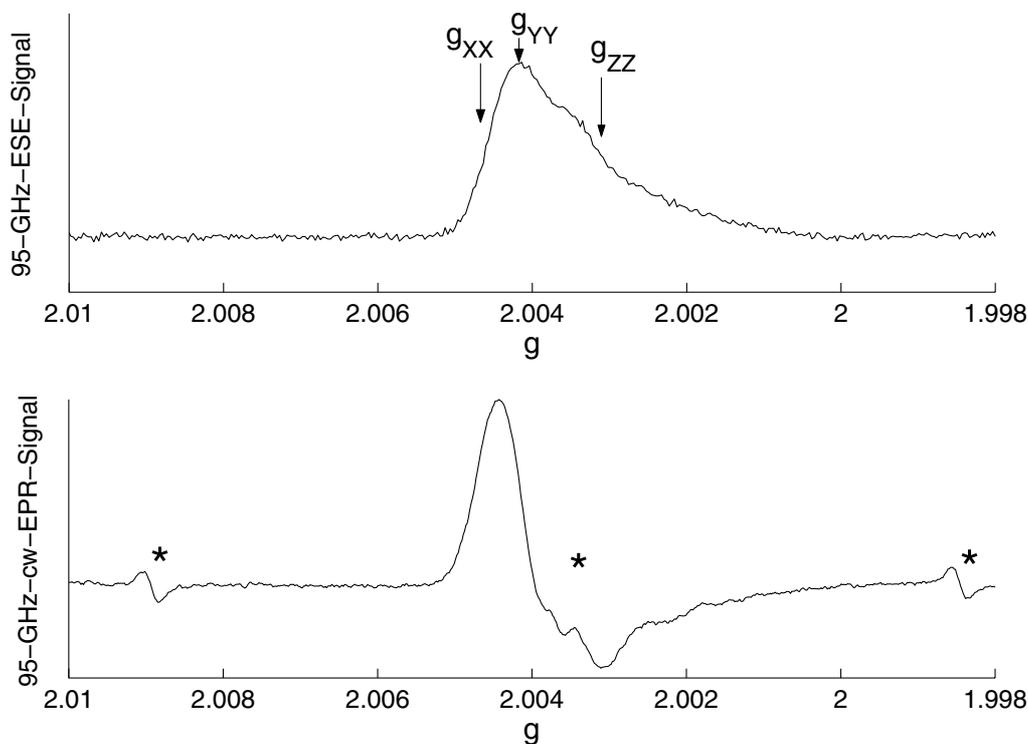


Abbildung 5.3: Gepulst(oben) und cw(unten) detektierte 95-GHz-EPR-Spektren des neutralen Flavinradikal-Kofaktors FADH[•] aus der DNS-Photolyase von *Escherichia coli* bei $T = 145$ K. Die Resonanzpositionen des zur Eichung der cw-Spektren verwendeten Manganstandards sind mit Sternchen gekennzeichnet. Messparameter der cw-Messung: Modulationsamplitude = 0.2 mT, Modulationsfrequenz = 3 kHz; Messparameter der gepulsten Messung: Pulssequenz $2 \times 2/3\pi$, $\tau_{\text{Puls}} = 190$ ns, $\tau = 400$ ns.

scheidet sich vom Integral des cw-detektierten Spektrums. Der Grund für diese Abweichung ist eine orientierungsabhängige Relaxation des gepulsten Spektrums (siehe auch Kapitel 6).

Um eine Auflösung der g -Tensor-Hauptwerte zu erreichen, haben wir Experimente bei 360.03 GHz durchgeführt. In Abbildung 5.4 ist das 360-GHz-EPR-Spektrum von FADH^\bullet zusammen mit einer mit dem Programm `fxfitx/fn-p*` [17] gefitteten Simulation des Spektrums (gepunktete Linie) abgebildet. Das Spektrum zeigt das charakteristische Pulverspektrum eines Radikals mit rhombischer g -Tensor-Anisotropie ($g_{ZZ} \neq g_{YY} \neq g_{XX}$). Die Simulation des Spektrums ergab $g_{XX} = 2.00431(5)$, $g_{YY} = 2.00360(5)$ und $g_{ZZ} = 2.00217(7)$ und somit $g_{\text{iso}} = 2.00336(5)$. Die Abweichung gegenüber früheren Messungen bei 95 GHz [131] lässt sich auf die schlechte Auflösung der Hauptwerte im 95-GHz-Spektrum zurückführen (siehe Abbildung 5.3).

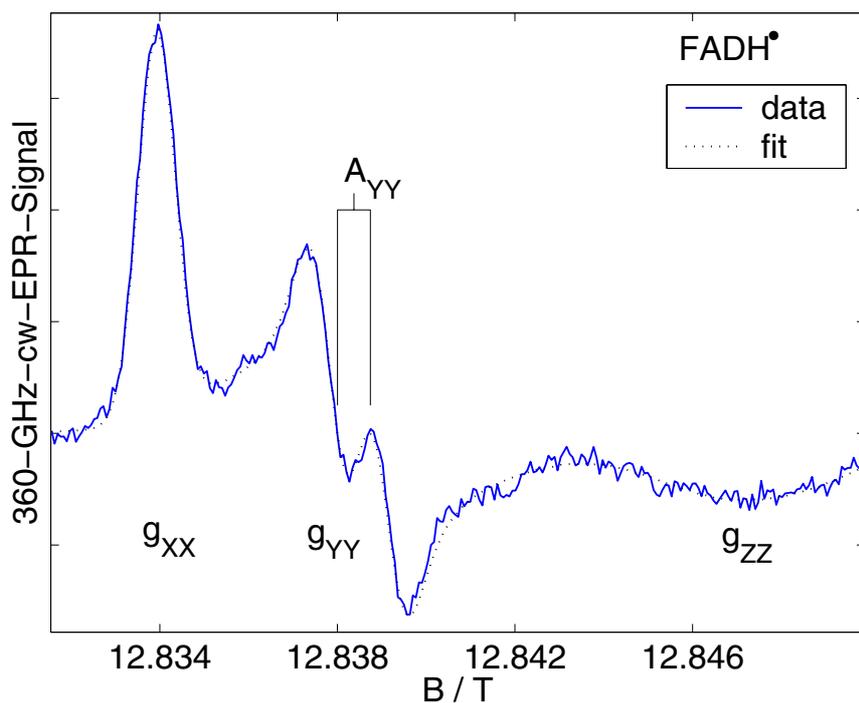


Abbildung 5.4: 360-GHz-cw-EPR-Spektrum des FADH^\bullet (gemessenes Spektrum: durchgezogene Linie, simuliertes Spektrum: gepunktete Linie). Messparameter: Modulationsamplitude = 0.4 mT, Modulationsfrequenz = 1.8 kHz. Die Simulationsparameter sind in Tabelle 5.3.1 wiedergegeben.

**Simulationsparameter der 360-GHz-EPR-Spektren
des neutralen FADH[•]-Kofaktors**

g - Tensor	$g_{XX} = 2.00431(5)$ $g_{YY} = 2.00360(5)$ $g_{ZZ} = 2.00217(7)$
orientierungsabhängige Linienbreite	$\Gamma_{XX} = 0.73(4)\text{mT}$ $\Gamma_{YY} = 0.94(4)\text{mT}$ $\Gamma_{ZZ} = 1.2(1)\text{mT}$
Hyperfein-Kopplung $^{14}\text{N}(5)^b$	$A_{\perp} = -0.06\text{mT}$ $A_{\parallel} = 1.53\text{mT}$
Hyperfein-Kopplung $^{14}\text{N}(10)^b$	$A_{\perp} = 0.04\text{mT}$ $A_{\parallel} = 0.83\text{mT}$
Hyperfein-Kopplung $^1\text{H}(5)^c$	$A_{XX} = -0.30(1)\text{mT}$ $A_{YY} = -1.33(1)\text{mT}$ $A_{ZZ} = -0.89(1)\text{mT}$

^b Daten aus [131]

^c Daten aus [17]

5.3.2 Orientierung des g-Tensors

Aus einem EPR-Pulverspektrum lassen sich nur die Hauptwerte des g-Tensors bestimmen. Um die Orientierung eines g-Tensors im Molekülachsensystem zu bestimmen, benutzt man in der Regel Kristalle, die man im EPR-Resonator gegen die Achse des äußeren Feldes rotiert. Dies ist im Moment aus apparativen Gründen bei 360 GHz noch nicht möglich. Deshalb haben wir die Orientierung des g-Tensors durch einen Vergleich mit ENDOR-Daten und Erkenntnissen über g-Tensoren ähnlicher Moleküle wie z.B. Chinonen ermittelt. In Chinonen zeigte sich aus Experimenten [136] und quantenchemischen Rechnungen [137], dass der kleinste g-Wert, g_{ZZ} , in der Regel sehr nahe beim Wert des freien Elektrons $g_E = 2.002319$ liegt und senkrecht zur Molekülebene steht. Der von uns gemessene Wert, $g_{ZZ} = 2.00217(7)$, liegt sehr nahe bei g_E . Deutlicher positiv gegen g_E verschoben sind die in der Molekülebene liegenden g_{XX} - und g_{YY} -Komponenten des Tensors. Die Gleichungen 2.5 und 2.6 in Abschnitt 2.1.1 enthalten den allgemeinen Ausdruck für die durch die Spin-Bahn-Kopplung verursachte g-Tensor-Anisotropie. Für π -Radikale mit Schweratomen wie Stickstoff oder Sauerstoff ist die g-Tensor-Anisotropie nach Stone [138] vor allem eine Folge von Anregungen von Elektronen in den nicht bindenden *lone-pair*-Orbitalen in die halb gefüll-

ten π^* -Orbitale. Das *lone-pair*-Orbital Ψ kann durch eine Linearkombination des s -Orbitals und der p -Orbitale in X- und Y-Richtung beschrieben werden:

$$\Psi = c_s s + c_X p_X + c_Y p_Y \quad (5.1)$$

Auf Grund dieser Näherung können $\Delta g_{XX} = g_{XX} - g_E$ und $\Delta g_{YY} = g_{YY} - g_E$ mit folgenden Gleichungen abgeschätzt werden:

$$\begin{aligned} \Delta g_{XX} &= 2 \sum_i \frac{\xi_i \rho_i^\pi c_{iY}^2}{\Delta E_{in\pi^*}} \\ \Delta g_{YY} &= 2 \sum_i \frac{\xi_i \rho_i^\pi c_{iX}^2}{\Delta E_{in\pi^*}} \end{aligned} \quad (5.2)$$

ξ_i ist der Spin-Bahn-Kopplungsparameter des i -ten Kerns des π -Systems, ρ_i^π seine Spindichte und $c_{iY,X}$ sind die Koeffizienten der Linearkombination in Gleichung 5.1, $\Delta E_{in\pi^*}$ ist die Anregungsenergie zwischen dem *lone-pair*-Orbital und dem halb gefüllten π -Orbital, π^* . Die Spin-Bahn-Kopplungsparameter der als Träger der Spindichte in Frage kommenden Atome, Kohlenstoff, Stickstoff und Sauerstoff sind: $\xi = 28 \text{ cm}^{-1}$, 76 cm^{-1} und 151 cm^{-1} (siehe [139] Kapitel 9.4). Das heisst, die Anisotropie wird umso größer, je mehr Spindichte auf den Sauerstoffatomen lokalisiert ist. Da im neutralen FADH \bullet -Radikal die Spindichte vor allem auf C(4a) und etwas weniger auf N(5) und N(10) konzentriert ist [140], ist die g-Tensor-Anisotropie des FADH \bullet kleiner als in Chinonen (siehe z.B. Abbildung 6.2), wo die Spindichte hauptsächlich auf den Sauerstoffen der Carbonylbindung konzentriert ist. Durch diese allgemeinen Überlegungen lässt sich die Orientierung des g-Tensors aber nur näherungsweise abschätzen.

Für eine genauere Bestimmung der Orientierung des g-Tensors haben wir Informationen über die Hyperfeinstruktur und deren relative Orientierung zum g-Tensor genutzt. Die Orientierung der g_{ZZ} -Komponente kann aus orientierungsselektiven gepulsten ENDOR-Messungen bei 95 GHz/144 MHz gewonnen werden.

In Abbildung 5.5 sind 95-GHz-'Davies'-ENDOR-Spektren von FADH \bullet abgebildet. Das obere Spektrum wurde bei g_{YY} auf dem Maximum des gepulsten 95-GHz-EPR-Spektrums aufgenommen und das untere auf g_{ZZ} (siehe Abbildung 5.3). Wegen der Orientierungsselektion durch den g-Tensor tragen zum unteren ENDOR-Spektrum nur die Moleküle bei, deren g_{ZZ} -Achse parallel zum Feld \mathbf{B}_0 steht, während zu dem auf dem Maximum des EPR-Spektrums aufgenommenen ENDOR-Spektrum eine Vielzahl von Orientierungen beitragen (siehe auch Abbildung 2.3). Kay *et al.* [131] konnten in einer X-Band-cw-ENDOR Studie die Protonen-ENDOR-Linien mit einer Aufspaltung von 6.97 MHz und 8.52 MHz jeweils den A_\perp und A_\parallel Komponenten des Hyperfeintensors der Methylgruppe C(8

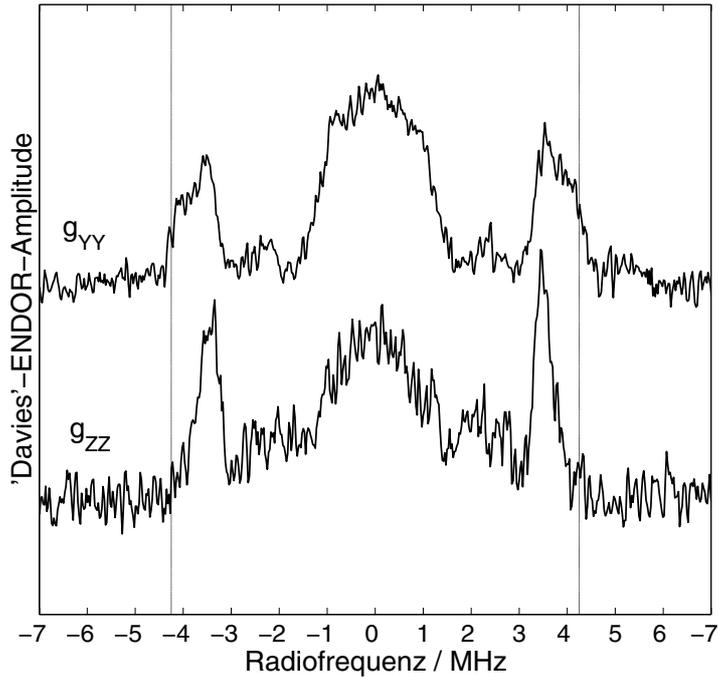


Abbildung 5.5: 95-GHz-'Davies'-ENDOR-Spektrum von FADH^\bullet . Die Spektren sind jeweils auf den Positionen g_{ZZ} (untere Linie) und g_{YY} (obere Linie) aufgenommen (siehe Abbildung 5.3). Die Frequenzachsen beider Spektren sind mit ihrer jeweiligen Protonen-Larmorfrequenz normiert. Die senkrechten Linien bei ± 4.26 MHz markieren die Resonanzpositionen von A_{\parallel} der Methylgruppe $\text{C}(8\alpha)\text{H}_3$. Messparameter: $\tau_{\pi/2\text{-MW}} = 200$ ns, $\tau_{\text{RF}} = 4$ μs , $T = 130$ K.

$\alpha)\text{H}_3$ zuordnen (siehe Abbildung 5.2 und 5.4). Die A_{\parallel} -Komponente wird zudem von der A_{XX} -Komponente des α -Protons an Position 5 überlagert [17]. Im normierten 95-GHz-'Davies'-ENDOR-Spektrum entsprechen die ENDOR-Linien bei ± 3.485 MHz der A_{\perp} -Komponente, ± 4.26 MHz A_{\parallel} und ± 4.25 MHz A_{XX} (siehe gestrichelte Linie in Abbildung 5.5). Bei g_{ZZ} ist im ENDOR-Spektrum A_{\perp} des Methyltensors sichtbar. Das bedeutet, dass g_{ZZ} sowohl zu A_{XX} als auch zu A_{\parallel} senkrecht steht. Für Methylgruppen gilt, dass A_{\parallel} parallel zu ihrer C-C-Verbindungsline liegt [131]. Im Fall des FADH^\bullet heißt das: A_{\parallel} liegt in der Molekülebene. Auf Grund dieser Befunde steht g_{ZZ} , wie in den verwandten Chinonen, senkrecht zur Molekülebene.

Das 360-GHz-Spektrum zeigt auf der g_{YY} -Komponente eine Aufspaltung von 36.4 MHz, die bei einer Deuterierung der Pufferlösung verschwindet (siehe Abbildung 5.7). Deuterierung des Puffers führt zu einem Austausch der Protonen bei N(3) und N(5) gegen Deuteronen. Deuteronen haben ein 6.5 mal kleineres magnetisches Moment; deshalb führt der Austausch zu einer entsprechenden Verkleinerung der

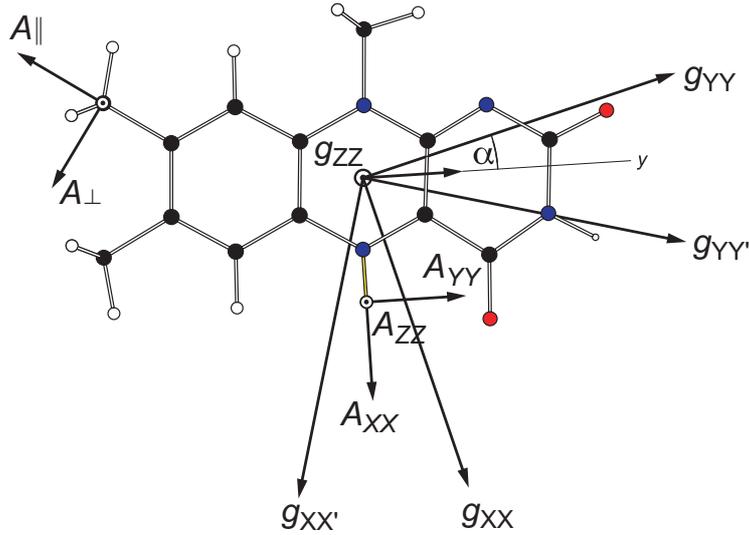


Abbildung 5.6: Draufsicht auf die molekulare Struktur des planaren FADH[•]-Kofaktors, sowie die Orientierungen der Hyperfeintensoren des α -Protons H(5), der Methylgruppe C(8 α)H₃ und der beiden, aus den EPR-Simulationen gewonnen, möglichen Orientierungen des g-Tensors. g_{XX} , g_{YY} , g_{ZZ} und $g_{XX'}$, $g_{YY'}$, $g_{ZZ'}$ sind jeweils die Achsen des g-Tensors, für $\alpha = +16.2^\circ$ und $\alpha = -16.2^\circ$, α ist der Winkel zwischen g_{YY} und y (Achse des Molekülachsensystems), A_{XX} , A_{YY} , A_{ZZ} sind die Koordinatenachsen des Hyperfeintensors von H(5) und A_{\perp} und A_{\parallel} die Komponenten des axialsymmetrischen Hyperfeintensors von C(8 α)H₃ [17].

Hyperfeinaufspaltung. Dadurch wird die Aufspaltung kleiner als die inhomogene Linienbreite und kann im EPR-Spektrum nicht mehr aufgelöst werden. ENDOR-Untersuchungen an Flavinen zeigten, dass die Hyperfeinkopplungen von H(3) wesentlich kleiner sind als die von H(5) [141], weshalb die – für Protonen sehr große – Aufspaltung auf g_{YY} einer Hyperfeinkomponente von H(5) zugeordnet werden kann. Für α -Protonen wie H(5) liegt entsprechend einer qualitativen Abschätzung von Gosh und Whiffen [142] die kleinste Komponente des Hyperfeintensors A_{YY} in der Molekülebene, senkrecht zur C-N-Verbindungsline, der größte Wert des Tensors A_{XX} liegt parallel zur C-N-Verbindungsline und der A_{ZZ} -Wert, der am nächsten am isotropen Wert liegt, steht senkrecht zur Molekülebene (in Abbildung 5.6 ist die Lage des A-Tensors des α -Protons im Molekülkoordinatensystem eingezeichnet). 'Davies'-ENDOR-Messungen am FADH[•] bei 9 GHz [17] ergaben die Hauptwerte des H(5)-Hyperfeintensors ($A_{XX} = -8.5$ MHz, $A_{YY} = -37.3$ MHz, $A_{ZZ} = -25$ MHz und $A_{\text{iso}} = -23.4$ MHz). Das bedeutet, der größte Wert ist A_{XX} , der somit parallel zur N-H-Verbindungsline in der Molekülebene liegt. Aus diesen Überlegungen folgt, dass g_{YY} annähernd parallel zu A_{YY} liegt, die etwas

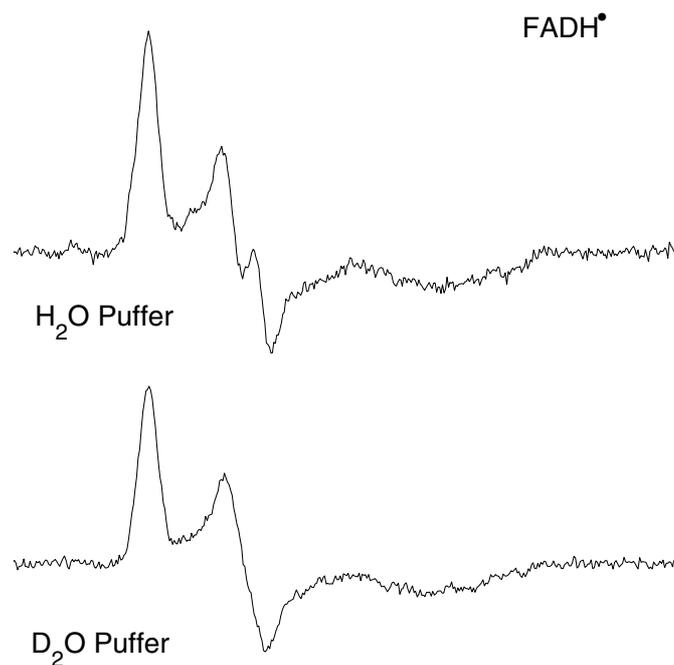


Abbildung 5.7: 360-GHz-cw-EPR Spektren von FADH^\bullet in protonierter (obere Linie) und deuterierter Pufferlösung (untere Linie), $T = 200$ K. Durch die Deuterierung verschwindet die Aufspaltung auf der g_{YY} -Komponente des Spektrums. Mikrowellenleistung $\approx 1 \mu\text{W}$, Modulationsamplitude = 0.4 mT, Modulationsfrequenz = 1.8 kHz.

kleinere Aufspaltung im EPR-Spektrum kommt durch eine Verdrehung der Koordinatensysteme von $\hat{\mathbf{A}}$ und $\hat{\mathbf{g}}$ um die Normale der Molekülebene zustande (siehe Abbildung 5.6). Der Winkel dieser Verdrehung wurde mit Hilfe der Simulationen zu $|\alpha| = (16 \pm 2)^\circ$ bestimmt. Das Vorzeichen kann nicht aus den Simulationen gewonnen werden. Die in [17] dokumentierten DFT- und AM1-Berechnungen des g-Tensors führten zu widersprüchlichen Ergebnissen bezüglich der Orientierung des Winkels. Beide Ansätze ergaben eine Orientierung von g_{ZZ} senkrecht zur Molekülebene, allerdings ergaben die AM1-Rechnungen für die Orientierung von g_{XX} und g_{YY} in der Ebene $\alpha = 17^\circ$ während die DFT-Rechnungen $\alpha = -14^\circ$ ergab. Folgt man der oben dargestellten Argumentation von Stone [138], ist ein negatives α plausibler. Demnach wird die Abweichung des g-Werts von g_E in Chinonen und verwandeten Molekülen in erster Linie durch Spindichten auf den Sauerstoffatomen verursacht. Somit ist die g_{XX} -Komponente näherungsweise entlang der Verbindungslinie der Sauerstoffe orientiert. Der negative Wert für α stimmt mit dieser Orientierung besser überein.

