

Optogenetische Transkriptionskontrolle

Design und Charakterisierung lichtsensitiver T7-RNA-Polymerase-Varianten

zur Erlangung des akademischen Grades Dr. rer. nat.

vorgelegt von M.Sc. Swantje Seifert

1. Gutachter: Prof. Dr. Susanne Brakmann
2. Gutachter: Prof. Dr. Daniel Summerer

Lübeck, den 24.03.2024

Publikationen

- S. Seifert, C. Ehrh, L. Lückfeldt, M. Lubeck, F. Schramm, S. Brakmann, *ChemBioChem* **2019**, *20*, 2813-2817.
- S. Seifert, S. Brakmann, *ACS Chem Biol* **2018**, *13*, 1914-1920.

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG.....	1
1.1. DESIGN PHOTOSCHALTBARER ENZYME.....	1
1.1.1. Photocages und Photoschalter.....	2
1.1.2. Optogenetik	3
1.2. LIGHT-OXYGEN-VOLTAGE (LOV) SENSORDOMÄNE	7
1.2.1. Struktureller Aufbau von LOV-Proteinen	7
1.2.2. LOV-Sensordomäne AsLOV2.....	8
1.3. T7-RNA-POLYMERASE	11
1.3.1. Strukturelle Grundlagen.....	11
1.3.2. Enzymatische Katalyse – Die Transkription	15
1.3.3. Chemische und enzymatische Transkriptionskontrolle.....	16
1.4. SPLIT-T7-RNA-POLYMERASE	18
1.4.1. Optogenetische Split-T7RNAP-Varianten.....	20
2. ZIELSETZUNG	22
3. MATERIALIEN UND METHODEN.....	23
3.1. GERÄTE UND MATERIALIEN	23
3.1.1. Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	23
3.1.2. Chemikalien	24
3.1.3. Plasmide	24
3.1.4. Enzyme	28
3.1.5. Bakterienstämme.....	28
3.1.6. Nährmedien	29
3.1.7. Marker und Probenpuffer.....	30
3.1.8. Oligonukleotide	31
3.1.9. Genfragmente.....	32
3.1.10. Puffer und Lösungen	34
3.2. MIKROBIOLOGISCHE METHODEN	35
3.2.1. Kultivierung von Bakterien.....	35
3.2.2. Herstellung elektrokompetenter Zellen	35
3.2.3. Transformation elektrokompetenter Zellen.....	35
3.2.4. Stammkulturen.....	35
3.3. MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN.....	36
3.3.1. Polymerase-Kettenreaktion	36
3.3.2. Quick-Change-Mutagenese.....	36
3.3.3. Restriktionsfreie Klonierung.....	37

3.3.4.	Isolierung von Plasmid DNA.....	38
3.3.5.	Restriktion von DNA	38
3.3.6.	Agarose-Gelelektrophorese.....	38
3.3.7.	Heterologe Expression in Escherichia coli.....	39
3.4.	REINIGUNG VON T7RNAP-WT UND VARIANTEN	40
3.4.1.	Zellaufschluss, Polyethylenimin- und Ammoniumsulfat-Fällung.....	40
3.4.2.	Dialyse	40
3.4.3.	Affinitätschromatographie.....	40
3.5.	PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN	42
3.5.1.	SDS-Gelelektrophorese.....	42
3.5.2.	Aktivitätsbestimmung mittels in-vitro-Transkription.....	42
3.5.3.	Aktivitätsbestimmung mittels Molecular Beacon.....	43
3.6.	COMPUTERBASIERTE METHODEN.....	46
3.6.1.	Image J.....	46
3.6.2.	Molekulardynamik-Simulation.....	46
4.	ERGEBNISSE UND DISKUSSION.....	47
4.1.	EXPRESSION UND REINIGUNG VON T7RNAP-WT	47
4.2.	LICHTABHÄNGIGE KATALYTISCHE AKTIVITÄT VON T7RNAP-WT	49
4.3.	EINFLUSS DES COFAKTORS FMN UND LICHT AUF DIE KATALYTISCHE AKTIVITÄT VON T7RNAP-WT	54
4.4.	DESIGNVORBILD NATUR - T7RNAP-LOV2-KONSTRUKTE DER 1. GENERATION	56
4.4.1.	Polymeraseaktivität der Varianten JB1, PD5 und PD6.....	57
4.5.	COMPUTERBASIERTES DESIGN VON T7RNAP-LOV2.....	60
4.6.	RATIONALES DESIGN - T7RNAP-LOV2-KONSTRUKT DER 2. GENERATION	61
4.6.1.	Lichtabhängige Polymeraseaktivität von SB1	63
4.7.	SPLIT-DESIGN - T7RNAP-LOV2-KONSTRUKTE DER 3. GENERATION	65
4.7.1.	Strukturanalyse der Insertionspositionen für SB2-SB5	66
4.7.2.	Expression und Reinigung der Varianten SB2 - SB5	69
4.7.3.	Polymeraseaktivität von SB2 - SB4	70
4.7.4.	Lichtabhängige Polymeraseaktivität von SB2 - SB4	72
4.8.	STRUKTUR-AKTIVITÄTSBEZIEHUNG VON SB2 - SB4	74
4.9.	OPTIMIERUNG DER LICHTSCHALTBARKEIT DURCH MODIFIKATION DER LOV-DOMÄNE – T7RNAP-LOV2-KONSTRUKTE DER 4. GENERATION.....	78
4.9.1.	Sekundärstrukturanalyse der modifizierten α -Helices	79
4.9.2.	3D-Strukturanalyse der Sensordomänen LOV2V1-V3 mittels MD-Simulation	80
4.9.3.	Expression und Reinigung der Varianten SB3V1-SB3V3	84
4.9.4.	Polymeraseaktivität von SB3V1 - SB3V3	85

4.9.5. Lichtabhängige Polymeraseaktivität von SB3V1 - SB3V3.....	86
5. ZUSAMMENFASSUNG	88
6. SUMMARY.....	91
7. LITERATURVERZEICHNIS.....	92
8. ANHANG.....	99
8.1. PLASMIDKARTEN DER KONSTRUKTE SB2-SB5 UND SB3V1-SB3V3.....	99
8.2. AMINOSÄURESEQUENZEN T7RNAP-WT UND T7RNAP-LOV2 VARIANTEN.....	103

Abkürzungsverzeichnis

A	APS	Ammoniumperoxodisulfat
	AS	Aminosäure
	a.u.	arbitrary unit
B	bp	Basenpaare
D	DEAE	Diethylaminoethylcellulose
	dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
	DMSO	Dimethylsulfoxid
	DM-Azo	2',6'-Dimethylazobenzol
	DNA	Desoxyribonukleinsäure
	DTT	1,4-Dithiothreitol
E	EC	Elongationskomplex
	EDTA	Ethylendiamintetraacetat
	FMN	Flavin-Mononukleotid
G	GFP	Grün fluoreszierendes Protein
	GTP	Guanosintriphosphat
I	IC	Initiationskomplex
	IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
L	LB	Lysogeny Broth
	LOV	Light-Oxygen-Voltage
	lx	Lux
M	Mag	Magnets
N	nt	Nukleotide
	NTA	Nitrilotriessigsäure
O	ONB	<i>ortho</i> -Nitrobenzyl

P	PAS	Per-ARNT-Sim
	PBD	Protein bindende Domäne
	PDB	Protein Data Bank
	PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
R	rNTP	Ribonukleosidtriphosphat
	rpm	Umdrehungen pro Minute
	RFU	Relative Fluoreszenzeinheiten
	RNA	Ribonukleinsäure
S	SDS	Natriumdodecylsulfat
	SOC	Super optimal broth + Glucose
T	TAE	Tris-Acetat-EDTA
	TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
U	U	Unit
V	VVD	Vivid

1. Einleitung

Die Untersuchung biochemischer Regulationsmechanismen und katalytischer Kaskaden, vor allem in Hinblick auf die Funktion und Aktivität beteiligter Enzyme, beschäftigt die Wissenschaft schon seit mehreren Jahrzehnten, da diese sowohl ein wichtiger Grundstein des Lebens, bei Dysfunktion aber auch die Ursache für diverse Krankheiten sind.

Das umfängliche Verständnis der enzymatischen Aktivität sowie folgende Entwicklung von Methoden zur Kontrolle dieser ist somit ein wichtiger und großer Teil der Grundlagenforschung verschiedener Bereiche wie der Molekularbiologie, Biotechnologie, medizinischen Chemie und synthetischen Biologie.

Neben dem Einsatz chemischer Verbindungen, wie Inhibitoren oder Aktivatoren, liegt der Fokus in den letzten Jahren ebenfalls immer mehr auf der Nutzung von Licht, um die Aktivität von Proteinen zu kontrollieren. Die drei wichtigsten Vorteile von Licht als externes Stimuli sind dabei:

- eine hohe räumliche und zeitliche Auflösung
- der Eingriff in das System ist in der Regel nicht invasiv (wellenlängenabhängig)
- keine Einbringung von chemischen Verbindungen in das System

Um Licht als externes Signal nutzen zu können, ist in der Regel eine Modifikation des zu untersuchenden Proteins notwendig.

1.1. Design photoschaltbarer Enzyme

Natürlich vorkommende Proteine, deren Aktivität durch Licht kontrolliert wird, findet man in Form von Photorezeptoren in unterschiedlichen biologischen Prozessen wie beispielsweise der Photosynthese und -morphogenese^[1] oder der visuellen Wahrnehmung^[2].

Trotz der Diversität der Proteine, hat eine Vielzahl dieser einen vergleichbaren Aufbau im Hinblick auf die Funktionalität: Die photoaktiven Proteine lassen sich in zwei Module beziehungsweise Domänen unterteilen. Die Sensordomäne, die mit einem lichtsensitiven Liganden – dem Chromophor – wechselwirkt und die Effektordomäne, die im Wesentlichen die Funktion des Proteins und die Weiterleitung des Signals bestimmt^[3,4].

Die Basis der lichtabhängigen Aktivität von Proteinen ist das Chromophor, das durch Licht einer definierten Wellenlänge in einen elektronisch angeregten Zustand übergeht und eine photochemische Reaktion durchläuft. Dies kann zu einem Bindungsbruch- oder einer Bindungsbildung zwischen Sensordomäne und Chromophor führen oder die Isomerisierung

des Chromophors zur Folge haben. Die lichtabgängigen strukturellen Veränderungen des Liganden haben dabei direkten Einfluss auf die Struktur beziehungsweise Konformation der Sensordomäne, was sich auf die Funktion der benachbarten Effektor-domäne des Proteins und somit auf dessen Aktivität auswirkt.^[5]

Angelehnt an dieses natürliche Vorbild, wurden unterschiedliche Methoden entwickelt, um Proteine zu erhalten, die durch den Stimulus Licht in Ihrer Aktivität reguliert werden können.

1.1.1. Photocages und Photoschalter

Eine der ältesten Methoden, um Moleküle mithilfe von Licht zu kontrollieren, ist das so genannte Photocaging. Dabei werden photolabile Verbindungen, wie z.B. aromatische Ketone oder Nitrobenzyl Derivate^[6], kovalent an biologisch aktive Moleküle (Liganden oder Proteine) gebunden, um diese in eine inaktive Form zu überführen^[7]. Nach Bestrahlung mit Licht einer definierten Wellenlänge kommt es durch einen irreversiblen Bindungsbruch zum „*uncaging*“ des Zielmoleküls, das somit wieder in aktiver Form vorliegt.

Die lichtabhängige Kontrolle der enzymatischen Aktivität kann dabei indirekt mit Hilfe von Liganden, z.B. photosensitiven Inhibitoren^[8] oder Substraten^[9], beziehungsweise direkt durch die Insertion unnatürlicher, photosensitiver Aminosäuren^[10–14] erfolgen.

Das Photocaging hat jedoch zwei deutliche Nachteile:

- 1) Die Reaktion ist nicht reversibel, wodurch nur eine einmalige Aktivierung des Zielmoleküls erfolgen kann.
- 2) Die abgespaltenen Verbindungen liegen frei vor und könnten (toxische) Reaktionen mit Verbindungen des entsprechenden Systems eingehen^[15].

Sowohl Punkt 1) als auch 2) kommen bei der Nutzung von Photoschaltern nicht zum Tragen. Die Methode beruht zwar ebenfalls auf der Verwendung photolabiler Liganden, diese unterscheiden sich allerdings in Ihren strukturellen und chemischen Eigenschaften von denen der Photocages. Es werden Verbindungen wie Azobenzene, Stilbene und Hemithioindigo eingesetzt, die nach Anregung mit Licht eine *cis*-/*trans*-Isomerisierung durchlaufen oder Spiropyrane, Diarylethene und Fulgide, die intermolekular zwischen geschlossener und offener Konformation wechseln^[16].

Für die Untersuchung biologischer Systeme kommt die Gruppe der Azobenzene am häufigsten zur Anwendung^[17]. Das *trans*-Isomer ist thermodynamisch stabil; das *cis*-Isomer wird nach Bestrahlung mit UV-Licht in hohen Ausbeuten erhalten^[18]. Zudem besteht die Möglichkeit der Änderung spektraler Charakteristika durch chemische Modifikation^[19].

In der Vergangenheit wurden mithilfe von Photoschaltern diverse Proteine, wie z.B. Meerrettichperoxidase^[20], Kinesin ATPase^[21] oder auch Endonucleasen^[22,23], erhalten, deren Aktivität durch Licht kontrolliert werden konnte.

Allerdings ist, wie auch bei der Methode des Photocagings, das Einbringen des posttranslational veränderten Zielproteins oder eines Liganden in die Zelle eher komplex^[24]. Das alternative Verfahren, die Insertion der photolabilen Gruppen mittels unnatürlicher Aminosäuren, ist ebenfalls aufwendig, da es eine Erweiterung des genetischen Codes beziehungsweise des Translationssystems voraussetzt^[15].

1.1.2. Optogenetik

Während es sich bei der Verwendung von Photocages und Photoschaltern eher um einen chemischen Ansatz handelt, ist die Optogenetik im Feld der Molekularbiologie einzuordnen und basiert ausschließlich auf der Veränderung des Zielproteins auf DNA-Ebene. Die Methode orientiert sich an dem modularen Aufbau der natürlich vorkommenden photoschaltbaren Proteine aus Sensor- und Effektor-domäne. Als lichtsensitiver Sensor bzw. Input-Modul dient ein photoschaltbares Protein, während das Zielprotein in diesem Fall den Effektor bzw. das Output-Modul darstellt. Zur Generierung eines solchen Sensor-Effektor-Paares können, basierend auf den jeweiligen Eigenschaften der Proteine, unterschiedliche Strategien eingesetzt werden (siehe **Abbildung 1**).

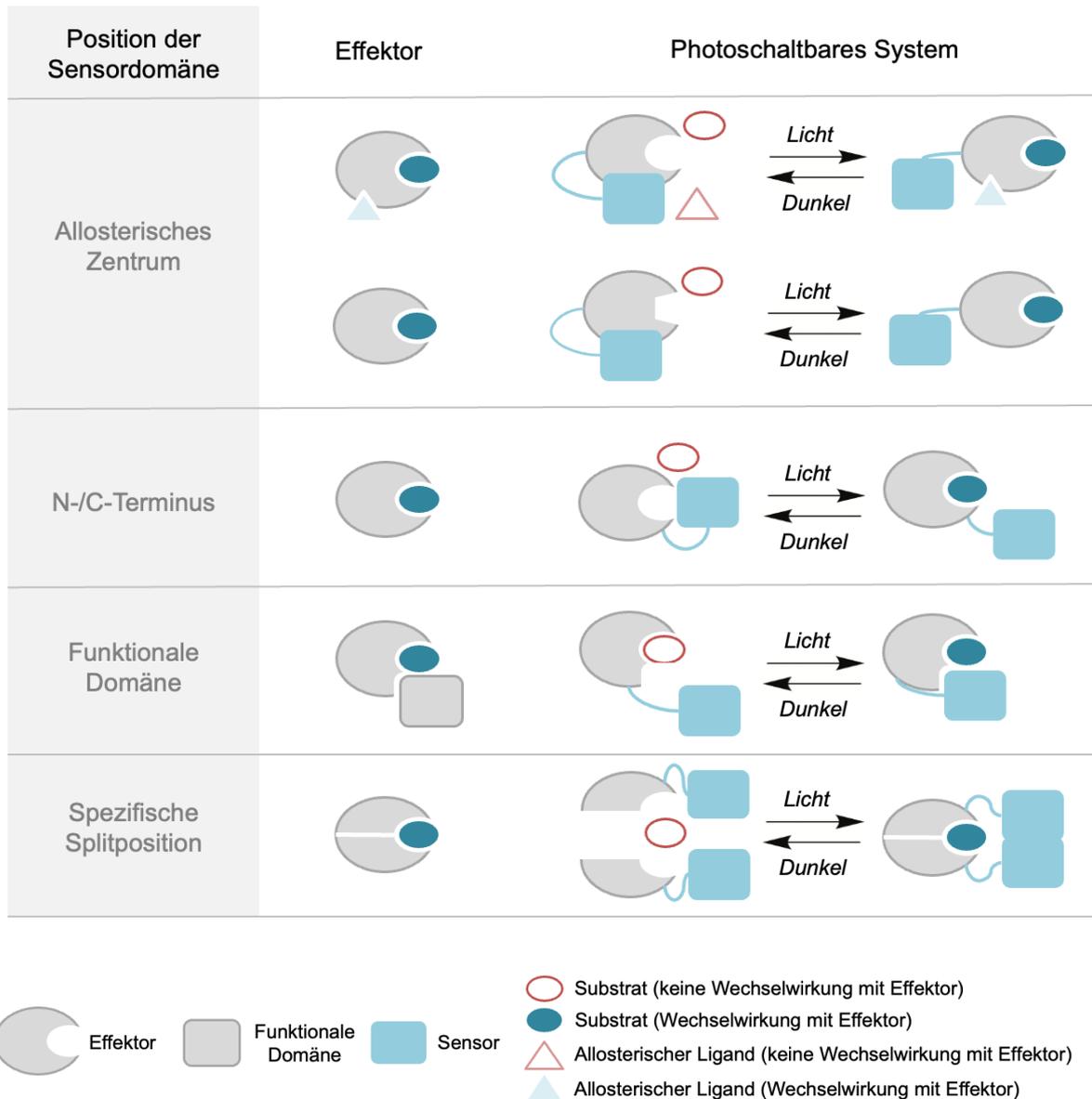


Abbildung 1: Strategien zur Generierung eines photoschaltbaren Proteins.^[25]

Wie **Abbildung 1** zeigt, wird in den meisten Fällen ein lichtschtbares System generiert, das aus jeweils einer Sensor- und einer Effektordomäne besteht. Die lichtabhängige Kontrolle kann dabei entweder durch allosterischen oder sterischen Hinderungen durch die Sensordomäne erreicht werden^[26,27].

Ist in dem gewünschten Effektor eine bekanntes allosterisches Zentrum vorhanden, bietet dies die Möglichkeit durch eine nahe Positionierung der Sensordomäne die lichtabhängige Kontrolle über die Wechselwirkung mit einem entsprechenden allosterischem Liganden des Effektors zu erhalten. Das allosterische Zentrum des Proteins wird photoabhängig und reversibel durch die Sensordomäne blockiert.

Des Weiteren kann auch ohne Bindungsstelle eines regulatorischen Liganden eine lichtabhängige allosterische Kontrolle erreicht werden. Durch die Insertion des Sensors innerhalb einer geeigneten flexiblen und oberflächenexponierten Position, wird die 3D-Struktur des Effektors verändert, wodurch ein allosterischer Signalweg entstehen kann.

Unter Einsatz von computerbasierten Methoden, wie der statistischen Kopplungsanalyse (*statistical coupling analysis*, SCA) sowie molekulardynamischen Simulationen, konnte so in der Vergangenheit für verschiedene Proteine, darunter die Dihydrofolatreduktase (DHFR)^[28], Src Kinase^{[29][30]}, N-Acyltransferase (NAT)^[31] und Pyruvat Kinase^[32], die Aktivitätskontrolle mit Licht erreicht werden.

Die Insertion von (lichtschaltbaren) Sensordomänen mit dem Ziel der Kontrolle eines Effektorproteins ist jedoch immer noch sehr komplex und aufwendig. Um die funktionale 3D-Struktur sowie das allosterische Netzwerk zu erhalten bzw. dieses durch Insertion zu generieren, sind in der Regel umfangreiche computerbasierte Strukturuntersuchungen nötig.

Anders als das Prinzip der Insertion von Sensordomänen, das so in der Natur nicht zu finden ist, ist die Fusion von Sensor und Effektor dem natürlichen Vorbild lichtschaltbarer Proteine nachempfunden. Als Fusionsposition können gemeinsame Strukturelemente genutzt werden, um beispielsweise eine exklusive Faltung und somit die Kontrolle über die Aktivität der jeweiligen Domäne zu erreichen. Bei der lichtschaltbaren Variante des Trp-Repressors LOV-TAP wurde jeweils die N- bzw. C-terminale Helix verbunden, um eine verlängerte Struktur zu erhalten, die durch die exklusive Wechselwirkung mit Sensor oder Effektor die Kontrolle durch Licht ermöglicht^[33]. Liegt das aktive Zentrum des Effektors nahe einer terminalen Position ist ebenfalls eine Aktivitätskontrolle durch sterische Hinderungen möglich. Durch die Fusion von der GTPase Rac1 mit dem Sensor LOV2 konnte eine photoabhängige Variante PA-Rac1 generiert werden, in der das aktive Zentrum erst nach Bestrahlung mit Licht zugänglich ist^[34,35].

Ist das Zielprotein bzw. der Effektor aus mehreren Domänen aufgebaut, besteht bei vergleichbarem Aufbau und Größe die Möglichkeit einzelne Einheiten durch eine Sensordomäne zu ersetzen. Dieses Prinzip würde z.B. genutzt, um die Histidin-Kinase FixL anstatt mit Sauerstoff durch Licht zu regulieren. Dazu wurde die enthaltene Hämoglobin-bindende PAS-Domäne der Kinase durch die photosensitive LOV-Domäne des Photorezeptors YtvA ausgetauscht.^[36]

Im Folgenden besteht die Möglichkeit die durch das so genannte „*Domain swapping*“ eingebrachten Sensordomänen ebenfalls gegeneinander auszutauschen, um das Zielprotein bzw. den Effektor mit verschiedenen lichtabhängigen Eigenschaften zu erhalten.^[37,38]

Das Prinzip der Spaltung von Proteinen ist vor allem aus dem Bereich der Untersuchung von Protein-Protein-Wechselwirkungen bekannt. Hier werden Reporterproteine, wie z.B. Luciferase, GFP, Ubiquitin, β -Galactosidase, Dihydrofolatreduktase (DHFR) oder β -Lactamase, in zwei Fragmente gespalten, die mit den jeweiligen Zielproteinen fusioniert werden. Kommt es zu Protein-Protein-Interaktion, assoziiert das fragmentierte Reporterprotein und liegt in aktiver Form vor.^[39]

Neben Protein-Protein-Interaktionen können auch spezifische Liganden^[40], RNA- sowie DNA-Sequenzen^[41] oder Licht einer bestimmten Wellenlänge zu der Assoziation eines Zielproteins führen. Für eine photoabhängige Kontrolle der Interaktion zwischen den Split-Fragmenten des Zielproteins werden sowohl hetero- als auch homodimerisierende Sensordomänen eingesetzt, die an die jeweiligen Proteinfragmente gebunden werden.

Mit Hilfe der dimerisierenden Domänen Phytochrom B (PhyB) und *Phytochrome interacting factor 3* (PIF3), gekoppelt an Split-Intein, konnte so beispielsweise eine lichtabhängige Kontrolle des Proteinspleißens erreicht werden^[42,43].

Die Methode der Aktivitätskontrolle von Proteinen durch Fragmentierung setzt jedoch die Kenntnis von tolerierten Split-Positionen innerhalb des Zielproteins voraus. Die Identifikation dieser spezifischen Positionen kann basierend auf weitreichenden Informationen über die Struktur-Aktivitätsbeziehung eines Proteins erfolgen^[44] oder durch Hochdurchsatzmethoden, wie z.B. zirkuläre Permutation (CP)^[45,46] oder gerichtete Evolution^[47,48] erzielt werden.

1.2. Light-Oxygen-Voltage (LOV) Sensordomäne

LOV basierte, lichtsensitive Proteine sind in Bakterien, Pilzen und Pflanzen weit verbreitet und regulieren Funktionen wie z.B. Phototropismus, Chloroplastenbewegungen, den zirkadianen Rhythmus und die Pigmentsynthese^[49–51]. In der heutigen Forschung sind, beispielsweise zur näheren Untersuchung von Funktion und Struktur sowie zur Generierung photoschaltbarer Systeme, LOV-Proteine aus allen drei Reichen vertreten. Zu den bekanntesten gehören NPH1-1 aus *Avena sativa*, ADO3 (FKF1) aus *Arabidodopsis thaliana*, YtvA aus *Bacillus subtilis*, EL222 aus *Erythrobacter litoralis* und Vivid (VVD) aus *Neurospora crassa*.

1.2.1. Struktureller Aufbau von LOV-Proteinen

Der Aufbau der LOV-Proteine ist in der Regel modular: Die LOV-Sensordomäne ist N-terminal an die jeweilige Effektor-domänen gebunden (siehe **Abbildung 2**). Das pflanzliche Phototropin NPH1-1 enthält dabei zwei LOV-Domänen (AsLOV1 und AsLOV2), die beide jeweils einen Photocyclus durchlaufen.^[52,53] Im Fall des Photorezeptors Vivid (VVD) befindet sich der Effektor als separater Interaktionspartner (zunächst) räumlich entfernt.^[54] Eine Insertion des Sensors in das Effektorprotein wurde in natürlichen Photosystemen bis zu diesem Zeitpunkt nicht beobachtet.

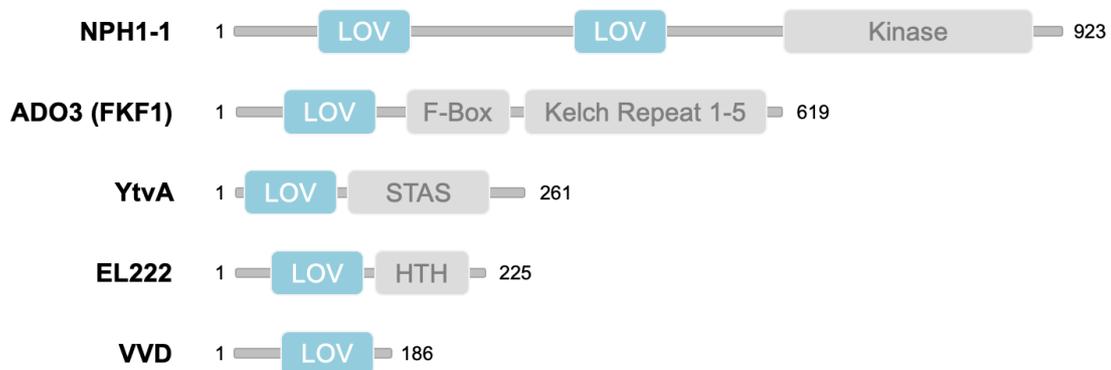


Abbildung 2: Schematische Darstellung einer Auswahl an Photorezeptoren aus Sensor- (blau) und Effektor-domäne (grau). LOV: Light-Oxygen-Voltage, STAS: Sulfat Transporter und anti-Sigmafaktor Antagonist, HTH: Helix-Turn-Helix-Motiv.

Die LOV-Sensordomänen gehören zu der Familie der Per-ARNT-Sim(PAS)-Domänen und teilen den gemeinsamen strukturellen Aufbau aus fünf antiparallelen β -Faltblattmotiven ($A\beta$, $B\beta$, $G\beta$, $H\beta$, $I\beta$) sowie vier α -helikalen Einheiten ($C\alpha$, $D\alpha$, $E\alpha$, $F\alpha$).^[27,49] Die enthaltenen α -Helixstrukturen $C\alpha$, $D\alpha$, $E\alpha$, $F\alpha$ bilden dabei den Konformationsraum für das enthaltene Chromophor FMN, FAD oder Riboflavin, das während des Photozyklus mit dem Cysteinrest der Konsensussequenz GXNCRFLQ in der Helix $E\alpha$ wechselwirkt.^[55,56]

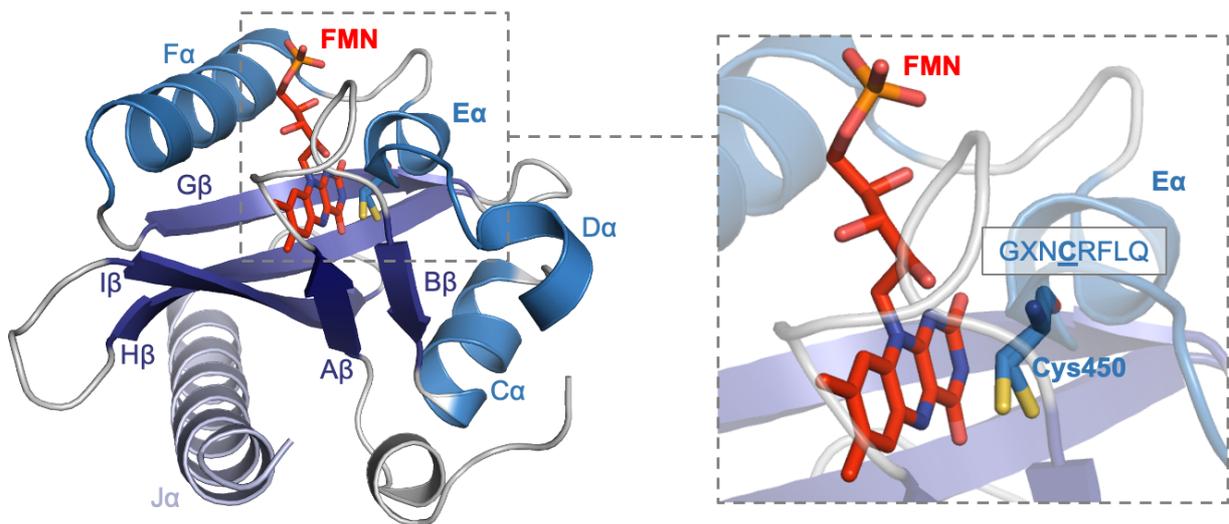


Abbildung 3: LOV-Sensordomäne AsLOV2 aus NPH1-1 mit den charakteristischen helikalen Einheiten (blau) und β -Faltblattmotiven (dunkelblau) inklusive des Chromophors FMN (rot) sowie der für AsLOV2 spezifischen $J\alpha$ -Helix (hellblau); Konsensussequenz GXNCRFLQ mit dem hochkonservierten Cystein 450 (Nummerierung bezogen auf NPH1-1); PDB: 2V1A^[57].

Die C-terminale helikale Struktur ($J\alpha$ -Helix) übernimmt in den meisten Fällen die Funktion als Linker zum jeweiligen Effektorprotein und durchläuft während des Photozyklus abhängig von der jeweiligen LOV-Domäne unterschiedliche Konformationsänderungen. Diese umfassen beispielsweise eine Rotation der Helix wie in YtvA^[58] oder auch eine Entfaltung und Dissoziation, die in AsLOV2^[34] zu beobachten ist und bilden die Grundlage der sterischen und allosterischen Aktivitätskontrolle von Effektorproteinen.^[15]

1.2.2. LOV-Sensordomäne AsLOV2

Das Phototropin NPH1-1 aus *Avena sativa*, das die Sensordomäne AsLOV2 enthält, wird von der Pflanze genutzt, um sich in Richtung des Lichtes auszurichten^[59]. Die strukturelle Dynamik von AsLOV2 während der Photoaktivierung ist dabei noch nicht vollständig aufgeklärt^[60]. Aufgrund des globulären Aufbaus sowie der geringe Größe von 16,5 kDa^[61], wird die Photodomäne häufig als Werkzeug für die Generierung künstlicher, lichtschaltbarer Sensor-Effektor-Proteine eingesetzt.

Die Basis der Lichtschaltbarkeit von AsLOV2 ist das enthaltene Chromophor FMN, das Licht im Wellenlängenbereich von 300 nm bis 500 nm, mit einem Maximum bei 450 nm, absorbiert.^[62] Trifft Licht dieses Bereiches auf die Sensordomäne, wird eine mehrstufige Reaktion zwischen FMN und der konservierten Aminosäure Cys450 der Helix E α initiiert.^[63]

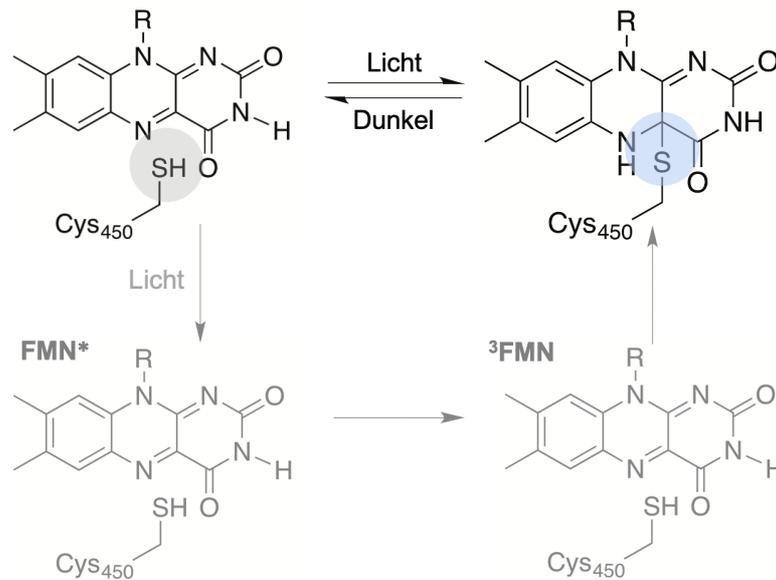


Abbildung 4: Wechselwirkung des Chromophors FMN mit Cys450 in AsLOV2 während des Photozyklus. Grau hinterlegt: Thiolrest des Cys450 im Dunkelzustand; Blau hinterlegt: Thioetherbindung zwischen Cys450 und FMN.

Das Chromophor FMN geht nach der Absorption eines Photons zunächst in einen angeregten Singulettzustand FMN* über. Der angeregte Zustand FMN* wird innerhalb von Nanosekunden in den Tripletzustand ^3FMN umgewandelt. ^3FMN reagiert schließlich mit dem Cysteinrest des AsLOV2 indem sich eine Thioetherbindung mit C4a des Isoalloxazinrings ausbildet.^[64]

Diese metastabile Form des AsLOV2 wird mit einer Halbwertszeit von unter 1 Minute wieder in den ursprünglichen Zustand überführt, in dem FMN nicht kovalent gebunden vorliegt.^[65]

Die Wechselwirkung mit FMN hat dabei großen Einfluss auf die Struktur von AsLOV2: Durch die Ausbildung der kovalenten Thioetherbindung wird eine Konformationsänderung innerhalb der Sensordomäne hervorgerufen, die schließlich zu einer Umorientierung und Entfaltung der C-terminalen α -Helix führt.^[34]

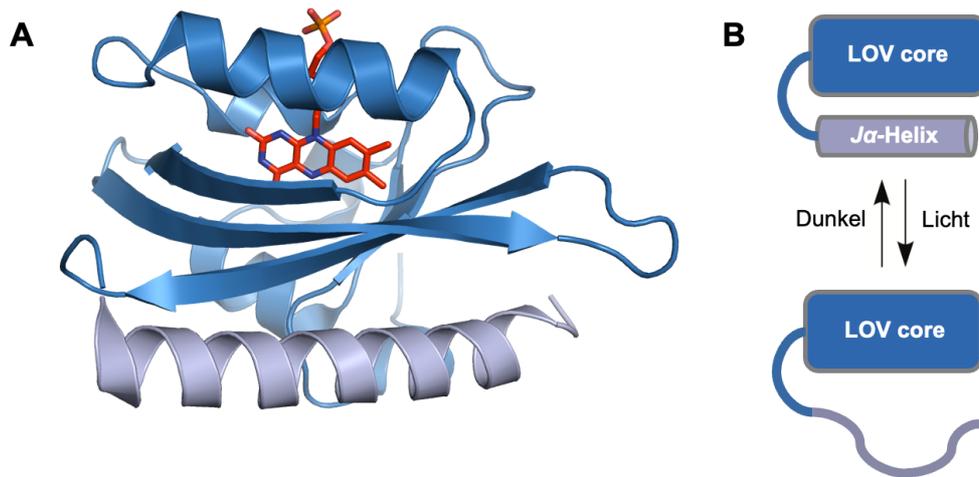


Abbildung 5: (A) Struktur der LOV-Sensordomäne AsLOV2 aus NPH1-1 inklusive des Chromophors FMN (rot) sowie der für AsLOV2 spezifischen J α -Helix (hellblau) unter Lichtausschluss; PDB: 2V1A^[57]. (B) Schematische Darstellung der lichtabhängigen Änderung der Proteinstruktur von AsLOV2.

Diese lichtbasierte sowie reversible Änderung der der Proteinstruktur eignet sich ideal, um – wie innerhalb des natürlichen Vorbilds NPH1-1 – die Aktivität eines fusionierten Effektorproteins sterisch oder/und allosterisch zu kontrollieren.

1.3. T7-RNA-Polymerase

Für das in dieser Arbeit beschriebene optogenetische Transkriptionssystem wurde die licht-sensitive LOV-Domäne AsLOV2 (Sensor) mit der T7-RNA-Polymerase, die als Effektor dient, kombiniert.

Basierend auf grundlegenden Anwendungsgebieten, wie der heterologen Expression und *in-vitro* Transkription, der langjährig untersuchten Struktur und Charakteristika sowie Aktivität, stellt die T7-RNA-Polymerase ein optimales Modellsystem für die Forschung dar.

1.3.1. Strukturelle Grundlagen

Die T7-RNA-Polymerase ist ursprünglich auf dem Genom des Phagen T7 codiert und wird von diesem genutzt, um den Replikationsmechanismus des infizierten Wirts zu assimilieren. Nachdem das Enzym 1970 erstmals aus befallenen *E. coli* Zellen isoliert werden konnte,^[66] wurde 1984 mit der Aufklärung der Primärstruktur, bestehend aus 883 AS,^[67] sowie der Klonierung und folgender heterologen Expression^[68], der Grundstein für die Strukturaufklärung der Polymerase gelegt. Beginnend mit der 1993 ersten publizierten Kristallstruktur (PDB: 4RNP) von R. Sousa *et al.*^[69], wurden bis 2024 19 Strukturen für die T7-RNA-Polymerase^[70] in der PDB hinterlegt.

Im Vergleich zu anderen RNA-Polymerasen, wie z.B. der *E. coli* eigenen RNAP (MW = 400 kDa), die aus fünf Untereinheiten aufgebaut ist^[71], besteht die T7RNAP lediglich aus einer Untereinheit und zählt, mit einem Molekulargewicht von 98,9 kDa^[67], zu den RNAPs geringerer Größe. Die Struktur der T7-RNA-Polymerase wird dabei in verschiedene Domänen unterteilt, die das aktive Zentrum des Enzyms, ähnlich wie eine rechte Hand, umschließen. Neben der N-terminalen Domäne, werden die übrigen Bereiche daher als Daumen-, Handflächen- und Finger-Domäne bezeichnet. Zudem befinden sich innerhalb des aktiven Zentrums zwei für die Katalyse essenzielle Magnesiumionen, die mit den hoch konservierten Resten Asp537 und Asp812 der Handflächen-Domäne wechselwirken^[72] (siehe **Abbildung 6**).

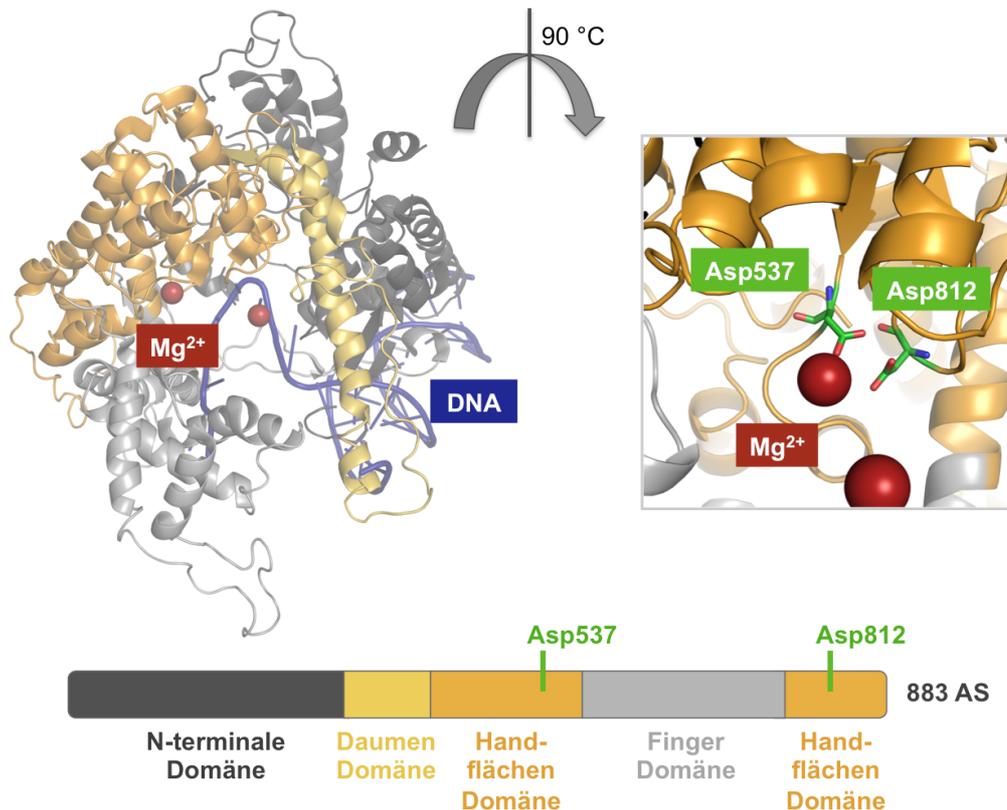


Abbildung 6: Struktur der T7-RNA-Polymerase (PDB: 2PI4^[73]) mit N-terminaler-, Daumen-, Handflächen- und Finger-Domäne sowie der Templat-DNA (dunkelblau), den essentiellen Magnesiumionen (dunkelrot) und hoch konservierten AS-Resten Asp537 und Asp812 (grün).

Während vergleichbare Strukturelemente wie Finger-, Daumen- und Handflächen-Domäne ebenfalls in verwandten Polymerasen der Pol I Familie zu finden sind, ist für die N-terminale Domäne keine strukturelle oder sequenzbasierte Identität zu anderen Proteinen beschrieben. Dies kann auf enthaltene Sequenzabschnitte (C1- und C2-Helix, Protein bindende Domäne PBD; **Tabelle 1**) zurückgeführt werden, welche, gemeinsam mit der in der Finger-Domäne lokalisierten Spezifitätsschleife, die hoch spezifische Bindung des T7-Promotors und die folgende Transkription der Templat-DNA ermöglichen. Die N-terminale-Domäne unterliegt dabei weitreichenden dynamischen Konformationsänderungen.^[74] Daher wird grundlegend zwischen dem Initiationskomplex (IC) und dem stabileren Elongationskomplex (EC) der T7RNAP differenziert (siehe **Abbildung 7**). Innerhalb des IC liegen optimale strukturelle Bedingungen für Promotorbindung vor, im EC ist Konformationsraum für die Templat-DNA und RNA sowie das benötigte Substrat (rNTPs) gegeben.

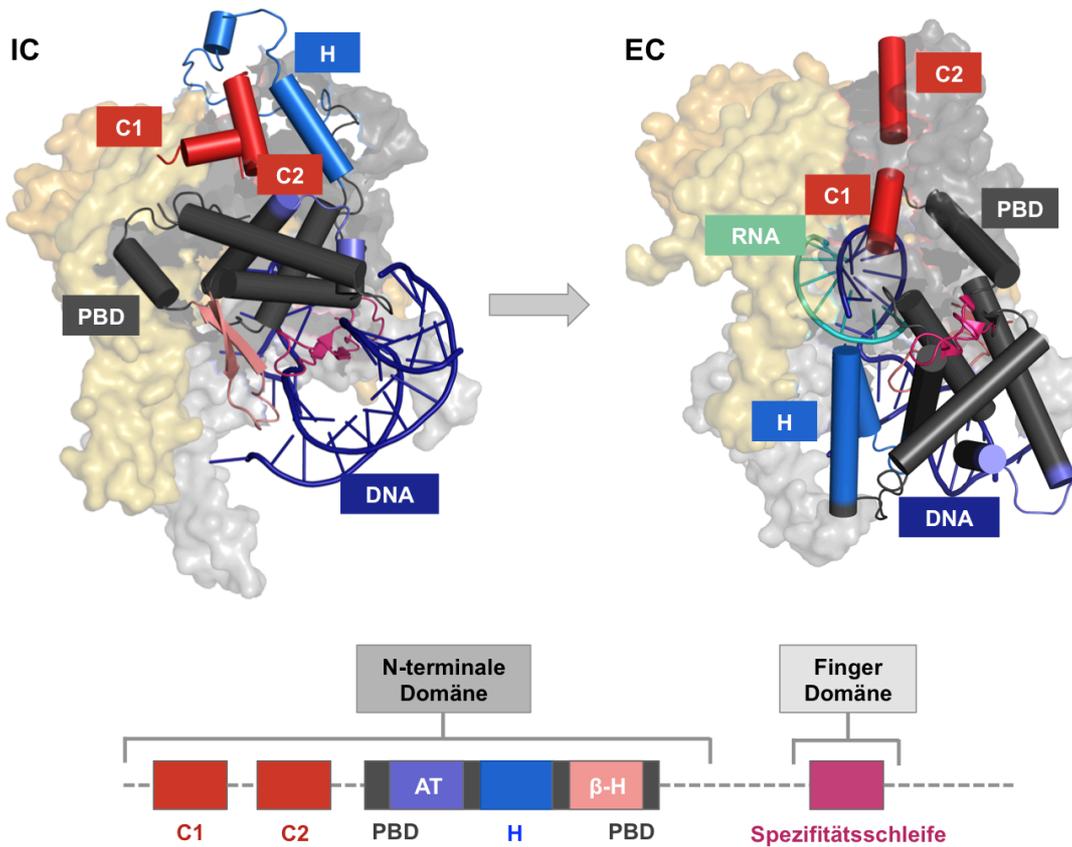


Abbildung 7: Initiationskomplex (IC; PDB: 2PI4^[73]) und Elongationskomplex (EC; PDB: 1H38^[74]) der T7-RNA-Polymerase. Rot, C1- und C2-Helix; Grau, PBD mit der AT-reichen Schleife (violett) und der β -Haarnadelschleife (rosa); Blau, Subdomäne H; Magenta, Spezifitätsschleife; Dunkelblau, Templat-DNA; Hellgrün, RNA.

Tabelle 1: Domänen und Subdomänen der T7-RNA-Polymerase inklusive der Position entsprechender Aminosäurereste.^[75-77]

Domäne	AS-Rest	Subdomäne	AS-Rest
N-Terminus	1-324	C1-Helix	28-41
		C2-Helix	46-55
		PBD	72-150, 191-267
		- AT-reiche Schleife	93-101
		- β -Haarnadelschleife	230-245
		H	151-190
Daumen	325-411	/	/
Handfläche	412-565, 785-883	/	/
Finger	566-784	Spezifitätsschleife	739-769

Durch die Positionsänderung der N-terminalen C-Helices (C1 und C2) wird die Schleifen-Region zwischen diesen gestreckt, was eine Stabilisierung des EC zur Folge hat; das aktive Zentrum der Polymerase wird vergrößert und ein Austrittstunnel für die RNA generiert^[78]. Die Promotor bindende Domäne (PBD) wird durch die Subdomäne H, die aus zwei Helices und einer Schleifen-Region aufgebaut ist, getrennt. Dies ermöglicht die Umfaltung der PBD unter Erhalt des 6-Helix-Bundles. In dieser Region sind die AT-reiche Schleife, welche mit dem T7-Promotor wechselwirkt, und die β -Haarnadelschleife, die für das Aufschmelzen des DNA-Templats verantwortlich ist, lokalisiert.^[75]

Die Daumen-Domäne der T7RNAP, die primär α -helical aufgebaut ist, bestimmt die Prozessivität der Transkription. Dies ist auf die Affinität der Daumen-Domäne zur Templat-DNA zurückzuführen, die diese während der Katalyse umschließt, die Dissoziation der Polymerase verhindert und somit den EC stabilisiert^[79].

Innerhalb der Handflächen-Domäne, die die Finger-Domäne einschließt, befinden sich die hoch konservierten AS-Reste Asp537 und Asp812, die die katalytisch wichtigen Magnesiumionen im aktiven Zentrum der Polymerase koordinieren und mit den Substratnukleotiden (rNTPs) wechselwirken^[72]. Die Präferenz gegenüber den Desoxyribonukleotiden (dNTPs) ist durch den AS-Rest Gly542 gegeben, der ausreichend Konformationsraum für die Wechselwirkung der 2'OH-Gruppe der rNTPs mit His784 der Finger-Domäne schafft^[75,80]. Zudem konnte gezeigt werden, dass der AS-Rest His811 sowie der C-Terminus (Phe880-Ala883), der sich nahe des Asp537 und der Mg^{2+} befindet, essenziell für die enzymatische Aktivität der T7RNAP sind^[81-83].

Die Spezifitätsschleife innerhalb der Finger-Domäne der Polymerase ist zusätzlich ein wichtiges funktionales Strukturmerkmal für die T7-Promotorinteraktion. Diese bindet den Promotor während der Initiation der Transkription sequenzspezifisch.^[75] Nach der Transkription von 8 nt-9 nt wird diese Wechselwirkung durch eine Konformationsänderung unterbrochen und ist im EC nicht mehr nachweisbar^[77]. Studien belegen außerdem, dass durch eine Mutation des AS-Restes Lys631 der Finger-Domäne eine verringerte Polymeraseaktivität vorliegt^[81].

1.3.2. Enzymatische Katalyse – Die Transkription

Die T7RNAP ist eine DNA-abhängige RNA-Polymerase und, anders als humane oder bakterielle RNA-Polymerasen, benötigt diese keine Transkriptionsfaktoren für die enzymatische Aktivität. Aufgrund der Struktur ist eine hohe Spezifität gegenüber des T7-Promotors gegeben, was eine gezielte Transkription folgender Gene und einen, für die heterologe Expression oder *in-vitro* Transkription, orthogonalen Einsatz ermöglicht. Grundsätzlich kann die Transkription der Templat-DNA durch die T7RNAP in die drei Phasen Initiation, Elongation und Termination unterteilt werden^[76]:

1) Initiation:

In der Initiationsphase wird der T7-Promotor gebunden und die doppelsträngige Templat-DNA aufgetrennt, um eine Interaktion mit den Substratnucleotiden (rNTPs) zu ermöglichen.

Der T7-Promotor besteht aus 17 nt bis 23 nt (Position -17 bis +6, **Abbildung 8**), von denen zunächst 6 nt, initiiert durch GTP, eine DNA-RNA-Hybridduplex ausbilden.^[84]

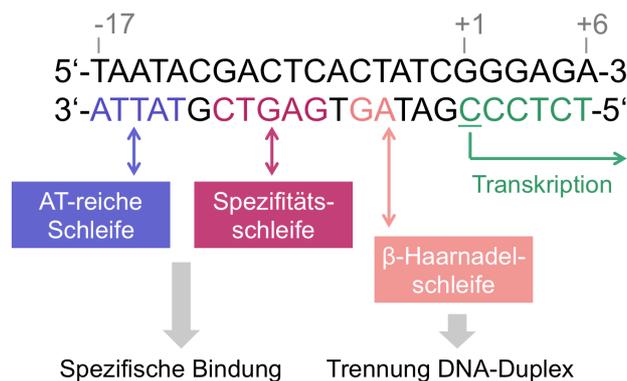


Abbildung 8: T7-Promotorsequenz (Position -17 bis +6) inklusive Interaktion mit der T7RNAP. AT-reiche Schleife (violett); Spezifitätsschleife (magenta); β-Haarnadelschleife (rosa); Transkriptionsstart (grün unterstrichen).

Die AT-reiche Schleife der T7RNAP wechselwirkt dabei mit der Region von Position -17 bis -13 des Promotors, während die Spezifitätsschleife die Region -11 bis -7 bindet. Die Trennung des doppelsträngigen DNA-Templats wird durch die Interkalation mit der β-Haarnadelschleife an Position -5 und -4 des T7-Promotors hervorgerufen.^[85] Zunächst werden RNA-Stränge einer Länge von 8 nt - 9 nt synthetisiert, bevor die T7RNAP-Promotor-Bindung ausgehend vom 5'-Ende der RNA gelöst wird und die Polymerase in den stabileren EC übergeht^[78,86].

2) Elongation:

Durch den Übergang vom IC in den EC wird ein RNA-Exit-Tunnel und somit ausreichend Raum für die DNA-RNA-Hybridduplex geschaffen. Der RNA-Exit-Tunnel besteht hauptsächlich aus positiv geladenen Resten und wird durch die Umfaltung der Spezifitätsschleife und des N-Terminus generiert.^[74] Nach der Synthese von 10 nt - 14 nt erreicht die RNA die Proteinoberfläche und der EC liegt in seiner stabilen Form vor. Mutationen in diesem Bereich führen dementsprechend zu einer Abnahme der Stabilität des EC und einer vermehrten Synthese kurzer RNA-Stränge (11 nt - 13 nt)^[87]. Unter optimalen Reaktionsbedingungen erreicht die T7RNAP so eine Prozessivität von 230 nt/s^[88], was ca. dem bis zu 10-fachem der *E. coli* eigenen RNAP^[89] entspricht.

3) Termination:

Die Transkription kann durch zwei Klassen von Terminatoren beendet werden. Die meistgenutzte Klasse I (T7-T ϕ) entspricht strukturell denen der *rho*-unabhängigen Terminatoren der RNAP in *E. coli*. Wird die zugehörige Sequenz erreicht, bildet die synthetisierte RNA eine Stamm-Schleifenstruktur mit sechs endständigen Uracil-Resten aus.^[90] Dies führt zu einer veränderten Bindung zwischen T7RNAP und RNA und schließlich zur Termination der Transkription^[90,91]. Klasse II-Terminatoren beinhalten die konservierte Sequenz 5'-ATCTGTT-3', gefolgt von endständigen Uracil-Resten. Durch diese wird die DNA-RNA-Hybridduplex destabilisiert und es kommt zum Abbruch der RNA-Synthese.^[91]

Durch die Untersuchung und das Verständnis der Struktur und der enzymatischen Aktivität der T7RNAP, war es möglich unterschiedliche Regulationsmechanismen für die Polymerase zu entwickeln.

1.3.3. Chemische und enzymatische Transkriptionskontrolle

Die T7RNAP kommt primär bei der heterologen Expression von Proteinen zum Einsatz, die für biochemische oder auch kristallographische Studien in großen Mengen gebraucht werden. Die Expression dieser Zielproteine muss dabei zunächst reguliert werden, um ein optimales Zellwachstum des Wirtsorganismus zu gewährleisten.

Die meist genutzte und etablierte Methode ist die Verwendung des T7-Expressionssystems. Das T7 gene I, das die T7RNAP codiert, steht dabei unter der Kontrolle des lacUV5-Promotors; das Zielprotein ist auf einem zweiten Plasmid hinter dem T7-Promotor codiert. Die Expression der T7RNAP wird zunächst durch die Wechselwirkung des Lac-Repressors (LacI) mit dem Lac-Operator (LacO), der zwischen lacUV5-Promotors und T7 gene I liegt, inhibiert. Ist ausreichend Zellmasse vorhanden, wird LacI mittels Zugabe des Laktose-Derivats Isopropyl-

β -D-thiogalctopyranosid (IPTG) verdrängt. Die Bindung der *E. coli* eigene RNAP an den *lacUV5*-Promotor führt zur Transkription des T7 *gene I*. Die T7RNAP bindet den T7-Promotor, was schließlich zur Transkription, Translation und Überexpression des Zielproteins führt.^[89,92] Unter Verwendung der entsprechenden Promotoren *araBAD*, *rhaBAD* oder *tetA* können alternativ auch L-Arabinose, L-Rhamnose oder Anhydrotetracyclin (aTc) als Induktormoleküle eingesetzt werden.^[93] Diese sind jedoch im Vergleich zu IPTG deutlich kostenintensiver. Eine weitere Möglichkeit die Transkription mit T7RNAP zu beeinflussen, ist die Modifikation des T7-Promotors mit dem Chromophor 2',6'-Dimethylazobenzol (DM-Azo) an Position -9 und -3. Die Eigenschaft der Photoisomerisierung dieser Verbindung ermöglicht die lichtabhängige Regulation der Polymeraseaktivität basierend auf der Interaktion zwischen T7RNAP und T7-Promotor.^[94]

Neben diesen indirekten Mechanismen kann die Regulation der Transkription auch durch Protein-Protein-Wechselwirkung oder Modifikation der T7RNAP erreicht werden.

So wird der natürliche allosterische Inhibitor T7-Lysozym eingesetzt, um die Aktivität der Polymerase zu kontrollieren.^[95-97] Dieser bildet mit der T7RNAP einen spezifischen Komplex und inhibiert somit die Initiation der Transkription und den Übergang in den Elongationskomplex.^[98]

Aufwendiger und daher deutlich wenig genutzt, ist die Modifikation der Polymerase mit einer photolabilen Schutzgruppe. Dabei wird Tyr639 mit einer *ortho*-Nitrobenzyl-(ONB)-Gruppe modifiziert, wodurch die Interaktion der Substratnukleotide mit dem aktiven Zentrum der T7RNAP verhindert wird und diese damit inaktiv vorliegt. Durch Bestrahlung mit Licht einer definierten Wellenlänge, wird die ONB-Schutzgruppe abgespalten und die Polymerase in aktiver Form erhalten.^[5,99]

Der Nachteil dieser Methoden ist, dass diese entweder nicht reversibel sind und/oder den Zusatz von oder Modifikation mit chemischen Molekülen benötigen. Durch Versuche mit Split-Varianten der T7RNAP wurden daher in den letzten Jahren neue Möglichkeiten für die lichtabhängige reversible Regulation der Transkription auf genetischer Ebene evaluiert.

1.4. Split-T7-RNA-Polymerase

Schon während der ersten Versuche die T7RNAP aus *E. coli* zu isolieren, fiel auf, dass diese nach der Zellyse in ungleich großen Fragmenten vorliegt.^[68] Dabei handelte es sich hauptsächlich um Teilstücke mit einem Molekulargewicht von ca. 75 kDa und 23 kDa.^[100] Nach genauerer Untersuchung wurde deutlich, dass die T7RNAP durch die *E. coli* eigene Proteasen OmpT zwischen Lys179 und Lys180 gespalten wird.^[101] Durch Aktivitätstests konnte festgestellt werden, dass die Polymerase enzymatisch aktiv ist, sodass von einer Reassoziaton der Proteinfragmente ausgegangen wurde.^[102,103] Diese Eigenschaft wurde lange nicht weiter untersucht. Für die heterologe Expression werden jedoch seitdem genetisch modifizierte *E. coli*-Stämme mit dem Genotyp *ompT* eingesetzt, die die entsprechende Protease nicht codieren.

In den letzten Jahren wurde das Potential der Fragmentierung (*Splitting*) und der Reassoziaton im Hinblick auf die Transkriptionskontrolle auf genetischer Ebene erkannt. 2014 wurden, unter Verwendung eines spezifischen Transposons ("Splitposon"), 36 Split-Positionen der T7RNAP identifiziert, die sich in fünf Bereichen ("seams") der Polymerase konzentrieren (siehe **Abbildung 9**). Es konnte gezeigt werden, dass sich die T7RNAP hauptsächlich in drei Fragmente spaltet: das α -Fragment (AS 1-67), den β -Kern (AS 68-600) und das σ -Fragment (AS 601-883), wobei sich der β -Kern aufgrund der "nativen" Split-Position Lys179/Lys180 nochmals teilen lässt.^[104]

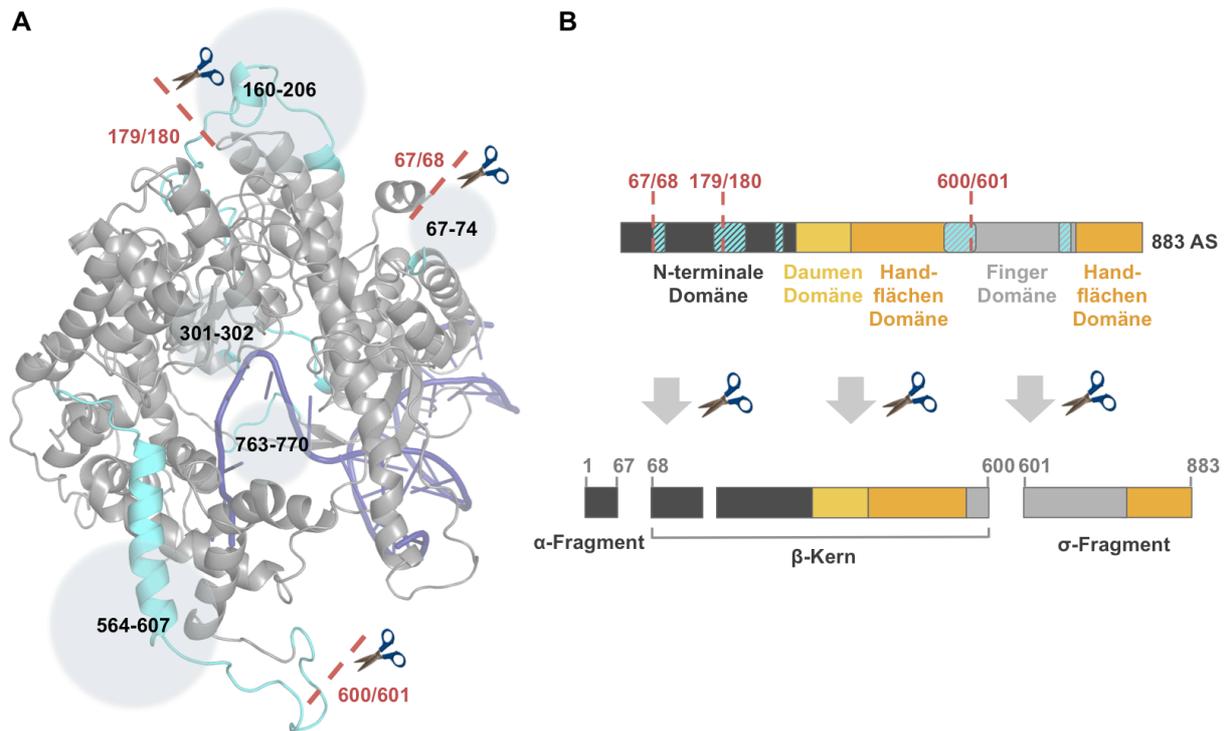


Abbildung 9: Split-Bereiche ("seams") und -Positionen in T7RNAP. A) IC (PDB: 2PI4^[73]) mit "seams" (cyan) und Split-Positionen (rot). B) Schematische Darstellung der Split-Bereiche (cyan) und -Positionen (rot) innerhalb der Polymerasedomänen sowie der entstehenden Split-T7RNAP-Fragmente.

Auffällig ist, dass sich alle Split-Positionen oberflächenexponiert und innerhalb von ungeordneten Schleifenstrukturen befinden und daher ausreichend Raum für das Einbringen eines weiteren regulatorischen Elements schaffen. Basierend auf dieser Eigenschaft wurde die Position 600/601 zwischen β -Kern und σ -Fragment genutzt, um einen Leucin-Zipper zu fusionieren und die Reassoziierung so positiv zu beeinflussen. Das Ergebnis war eine Zusammenlagerung zur aktiven T7RNAP nach der Fragmentierung in drei bzw. vier Teile, was zuvor für kein anderes Protein beobachtet werden konnte.^[104]

1.4.1. Optogenetische Split-T7RNAP-Varianten

Das *Splitting* in zwei Fragmente und die Reassoziierung zum aktiven Enzym wird in der Regel für Reporterproteine, wie GFP^[105], Luciferase^[106] und β -Lactamase^[107] genutzt, um z.B. Protein-Protein-Wechselwirkungen zu studieren oder die Expression spezifischer Proteine zu untersuchen. Ein ähnlicher Ansatz ist, die T7RNAP durch Fusion mit dimerisierenden, lichtsensitiven Domänen an Split-Positionen zu modifizieren. Das Ziel ist dabei die Reassoziierung der Polymerase mit Licht zu regulieren und somit die Transkription zu kontrollieren. Die optogenetische Kontrolle der Transkription hat den Vorteil, dass kein Zusatz von Inhibitoren notwendig ist. Zudem ist diese Methode temporär gut kontrollierbar, kostenmindernd, nicht invasiv und eine nachträgliche Modifikation der Polymerase ist nicht nötig.

Auf der Grundlage der bekannten Split-Positionen innerhalb der T7-RNA-Polymerase sowie der Möglichkeit der Fusion von weiteren Proteinen unter Erhalt der Aktivität, wurden 2017 erste optogenetische Split-T7RNAP-Varianten generiert (siehe **Tabelle 2**).^[108,109] Neben den zuvor bestimmten Split-Stellen, wurden auch weitere, ebenfalls oberflächenexponierte und ungeordnete Positionen außerhalb der "seams" genutzt. Als lichtschtbares Sensorprotein diente dabei die homodimerisierende Domäne Vivid (VVD) bzw, die heterodimerisierende Domäne Magnets (Mag), die über einen kurzen Linker jeweils C- bzw. N-terminal an die entsprechende Split-Position fusioniert wurde (siehe **Abbildung 10**).

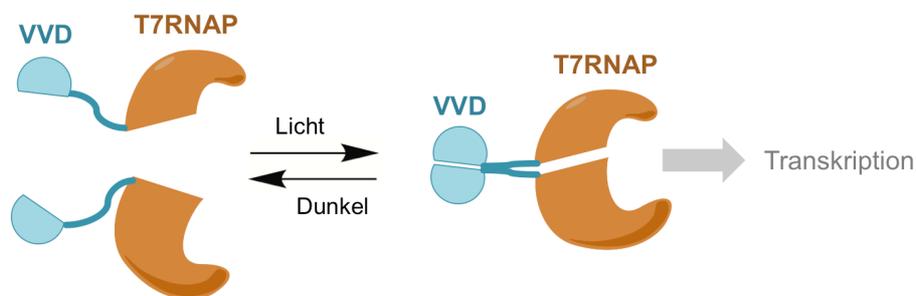


Abbildung 10: Mechanismus der lichtabhängigen Transkriptionskontrolle durch die homodimerisierende Domäne VVD.

Tabelle 2: Lichtabhängige Regulation der Transkription mit VVD-Split-T7RNAP^[109] und Mag-Split-T7RNAP^[108].

T7RNAP/ Domäne	Split-Position/ AS-Rest	Lichtabhängige Transkriptionskontrolle mit	
		VVD-Split-T7RNAP	Mag-Split-T7RNAP
N-Terminus	69/70*	n.a.	++++
	167/168	+++	n.a.
	179/180	+++	+++
	302/303	n.a.	+
	309/310*	+	n.a.
Daumen	357/358*	+	n.a.
Handfläche	498/499*	/	n.a.
	563/564	n.a.	+
	564/565	++++	n.a.
Finger	600/601	+	++
	663/664*	++	n.a.
	716/717	/	n.a.

*Split-Positionen außerhalb der "seams"

Die optogenetische Regulation der Transkription ist für einige dieser T7RNAP-Varianten gegeben, es wird jedoch ein getrenntes Zwei-Fragment-System benötigt, das coexpressiert werden muss. Durch T7RNAP-Varianten, die ein entsprechendes Sensorprotein fusioniert oder insertiert codieren, kann dies umgangen werden.

2. Zielsetzung

Die T7-RNA-Polymerase zählt aufgrund ihrer Funktion und des weitreichenden Nutzens, vor allem innerhalb des T7-Expressionssystems, zu den meist verwendeten und untersuchten Enzymen im Bereich der Proteinbiochemie, Biotechnologie und medizinischen Biologie. Da vor allem in der Wirkstoffforschung eine große Menge an zu untersuchenden Proteinen benötigt wird, wird eine kostengünstige und schnelle Herstellung (Expression) dieser in großem Maßstab immer wichtiger. Der Fokus liegt dabei überwiegend auf für die Medizin interessanten humanen Proteinen, die in dem einfachen und häufig verwendeten Bakterium *E. coli*, aufgrund ihrer toxischen Wirkung auf das Wachstum der Bakterien nur schwer überexprimiert werden können und somit häufig auf zeit- und kostenintensive Zelllinien zurückgegriffen werden muss.

Das Ziel dieser Arbeit war durch die Kombination der T7-RNA-Polymerase und der lichtsensitiven LOV2-Domäne ein optogenetisches Transkriptionssystem zu generieren, das die Regulation der Polymeraseaktivität durch Licht einer definierten Wellenlänge ermöglicht. Der Vorteil gegenüber vorhandenen Regulationsmechanismen, wie z.B. der Induktion durch Zusatz von Molekülen wie IPTG^[92], Einbringen von unnatürlichen Aminosäuren^[99] oder auch der Kombination der T7-RNAP mit Lysozym^[97], ist die definiert temporäre, nicht invasive und kostengünstige Kontrolle der Transkription, die auf genetischer Ebene basiert. Im Vergleich zum 2017 untersuchten optogenetischen Zwei-Fragment-System mit den lichtsensitiven, dimerisierenden Domänen VVD oder Mag, ist mit den hier beschriebenen LOV2-T7RNAP-Varianten eine Coexpression nicht mehr nötig.

Dazu sollte zunächst der Einfluss des benötigten Cofaktors FMN sowie der Beleuchtungsstärke auf die Aktivität von T7RNAP analysiert werden. Es folgte die Auswahl passender Fusions-/Insertionsstellen für LOV2 und die Klonierung, Expression und Reinigung der Konstrukte. Die erhaltenen Polymerasevarianten LOV2-T7RNAP sollten hinsichtlich ihrer (lichtabhängigen) Transkriptionsaktivität untersucht und die optogenetische Regulation der Variante mit der höchsten Lichtsensitivität abschließend durch Modifikation der LOV2 Domäne optimiert werden.

3. Materialien und Methoden

3.1. Geräte und Materialien

3.1.1. Geräte und Gebrauchsmaterialien

Die innerhalb dieses Projektes genutzten Geräte und Gebrauchsmaterialien sowie die entsprechenden Hersteller sind in **Tabelle 3** und **Tabelle 4** aufgeführt. Verwendete Standardverbrauchsmaterialien wurden von Biozym (Hessisch Oldendorf), Carl Roth (Karlsruhe), VWR (Langenfeld), Brand (Wertheim) und neoLab (Heidelberg) bezogen. Reaktionsgefäße und Pipettenspitzen wurden vor Gebrauch für 20 min bei 121 °C autoklaviert.

Tabelle 3: Verzeichnis der verwendeten Geräte.

Gerät	Modell	Hersteller
Brutschrank	INE300	Memmert
Elektroporator	2510	Eppendorf
Geldokumentationsanlage	Alpha Imager	Alpha Innotec
Kühlzentrifuge	Centrifuge 5804 R	Eppendorf
Luxmeter	MS-1300	Voltcraft
Photometer	Evolution 201	Thermo Scientific
Plattenlesegerät	Infinite M1000	Tecan
	Synergy 2	BioTek
Proteinreinigungs-System	ÄktaPurifier	Amersham
Tischzentrifuge	MiniSpin	Eppendorf
Schüttler	MTS 4	IKA
Schüttelinkubator	Minitron	InforsHT
Spannungsquelle	250/100, Power Pac	Roth, Bio-Rad
Thermoblock	TSC	Biometra
Thermocycler	Mastercycler	Eppendorf
Thermomixer	Comfort	Eppendorf
Ultraschallgerät	Digital Sonifier	Branson

Tabelle 4: Verzeichnis der verwendeten Gebrauchsmaterialien.

Material	Hersteller
Amicon Ultra Zentrifugeneinheiten (30 K, 50 K)	Merck Milipore
Dialyseschlauch (34 mm; 14 K)	Roth
Elektroporationsküvetten 1mm	VWR, Kisker Biotech
LED 5 mm blau 470 nm	Avago
Mikrotiterplatten 96 well, PS, flat bottom, schwarz	Greiner BioOne
Reaktionsgefäße, 1,5 mL, PP, schwarz	Roth, Kisker Biotech
Sterilfilter, 0,22 µm, PES	Merck Milipore

3.1.2. Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden in höchster Reinheit erworben und stammten, soweit nicht anders angegeben, von Sigma-Aldrich (Steinheim), Carl Roth (Karlsruhe) und Biozym (Hessisch Oldendorf).

3.1.3. Plasmide

Die für diese Arbeit genutzten Plasmide für Klonierung und Aktivitätsassays sind im Folgenden aufgeführt. Die Plasmidkarten der klonierten Polymerasekonstrukte sind im Anhang unter 8.1 zu finden.

pQET7WT

Das Plasmid pQET7WT (siehe **Abbildung 11**, bereitgestellt von P. Dollinger, Fakultät Chemie und Chemische Biologie, TU Dortmund) enthält das für die T7RNAP-WT codierende Gen unter der Kontrolle eines T5-Promotors und diente der Klonierung aller weiteren T7RNAP-LOV2-Konstrukte. Zusätzlich sind Gene vorhanden, die β -Lactamase sowie Chloramphenicol-Acetyltransferase codieren und die Resistenz der Transformanden gegenüber den Antibiotika Ampicillin beziehungsweise Chloramphenicol bewirken.

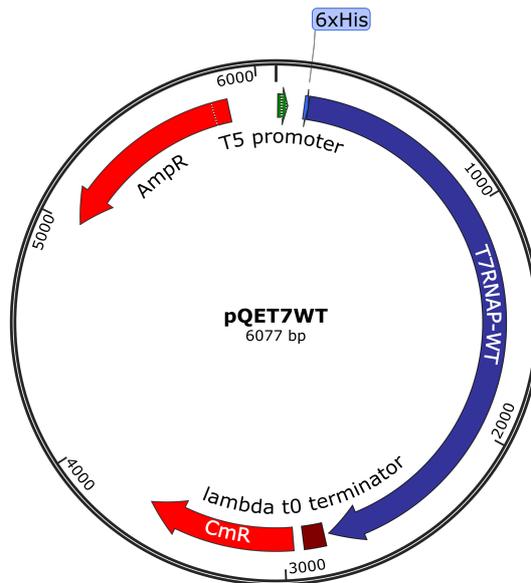


Abbildung 11: Plasmidkarte von pQET7WT (6077 bp). Blau: T7RNAP-WT inklusive His₆-Tag; Rot: Resistenzgene Chloramphenicol-Acetyltransferase (CmR) und β -Lactamase (AmpR); Dunkelrot: Lambda-Terminator; Grün: T5-Promotor.

Nach Abschluss der experimentellen Arbeiten wurden in dem T7RNAP-WT codierenden Gen die Mutationen F55S und A234V identifiziert, welche sich ebenfalls in denen daraus resultierenden Varianten finden lassen. Die Vergleichbarkeit des gesamten Systems bleibt somit erhalten.

pCR2.1-LOV2

Das Plasmid pCR2.1-LOV2 (siehe **Abbildung 12**) wurde von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) bezogen und wurde als Template für die Amplifikation des LOV-Fragmentes eingesetzt. Neben dem LOV2-codierenden Gen (Codon-optimiert für *E. coli*) sind ebenfalls Abschnitte enthalten, die die Enzyme β -Lactamase und Aminoglykosid-Phosphotransferase codieren. Die entsprechenden Transformanten weisen somit eine Resistenz gegenüber den Antibiotika Ampicillin und Kanamycin auf.

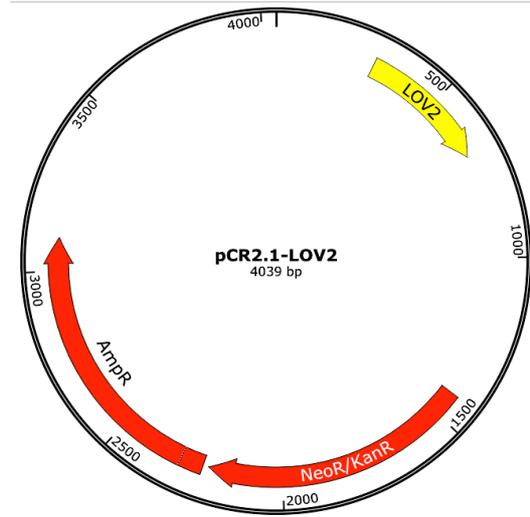


Abbildung 12: Plasmidkarte von pCR2.1-LOV2 (4039 bp). Gelb: LOV2; Rot: Resistenzgene β -Lactamase (AmpR) und Aminoglykosid-Phosphotransferase (KanR).

pAlterGC

Das Plasmid pAlterGC^[110] (siehe **Abbildung 13**) trägt das Gen des grün fluoreszierenden Proteins (GFP), welches unter der Kontrolle des T7-Promotors als Template für die *in-vitro*-Transkription verwendet wurde. Das Tetracyclin-Resistenzgen, das das Tetracyclin-Efflux-Protein codiert, diene als Selektionsmarker.

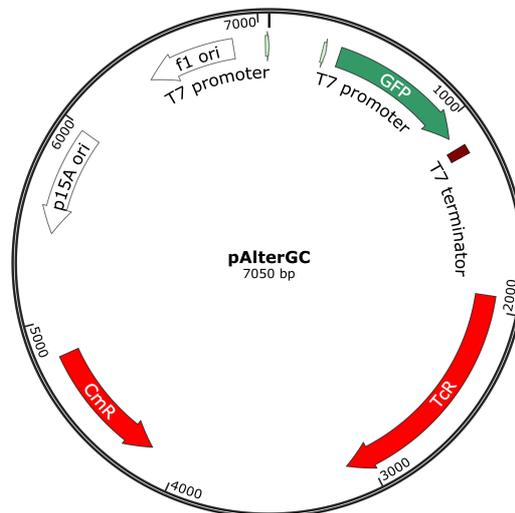


Abbildung 13: Plasmidkarte von pAlterGC (7050 bp). Weiß: Replikationsursprünge p15A und f1; Hellgrün: T7-Promotor; Grün: GFP; Rot: Resistenzgen Chloramphenicol-Acetyltransferase (CmR) und Tetracyclin-Efflux-Protein (TcR); Dunkelrot: T7-Terminator.

pREP4

Das Plasmid pREP4 (siehe Abbildung 14) codiert das Gen des LacI-Repressors unter der Kontrolle des LacI-Promotors und wurde zur Regulation der Expression klonierter T7RNAP-LOV2-Varianten genutzt. Als Selektionsmarker diente die durch das Protein Aminoglykosid-Phosphotransferase codierte Resistenz gegenüber Kanamycin.

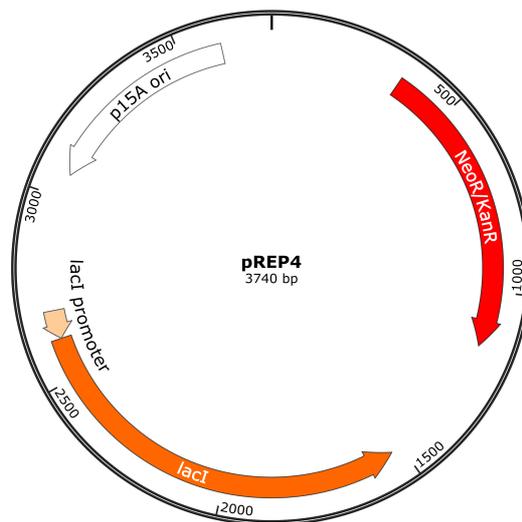


Abbildung 14: Plasmidkarte von pREP4 (3740 bp). Weiß: Replikationsursprung p15A; Hellorange: lacI-Promotor; Orange: lacI; Rot: Resistenzgen Aminoglykosid-Phosphotransferase (KanR).

3.1.4. Enzyme

Die für die Restriktion, Reinigung und Klonierung genutzten Enzyme sowie die zugehörigen Reaktionspuffer sind in **Tabelle 5** zu finden.

Tabelle 5: Verzeichnis der eingesetzten Enzyme.

Enzym	Reaktionspuffer	Hersteller
Apal	Puffer Tango	Thermo
DpnI	-	Fermentas
Eco91I (BstEII)	Puffer Tango	Thermo
EcoRI	Puffer Tango	Fermentas
HindIII	Puffer R	Fermentas
SmaI	Puffer Tango	Fermentas
Lysozym	-	Merck
<i>Pfu</i> -Turbo Polymerase	<i>Pfu</i> -Reaktionspuffer	Agilent
<i>Phusion</i> -Polymerase	<i>Phusion</i> -Reaktionspuffer	Laborpräparation
<i>Taq</i> -Polymerase	<i>Taq</i> -Reaktionspuffer	Se genetic

3.1.5. Bakterienstämme

Die für die Klonierung der Zielproteine und die heterologe Proteinexpression verwendeten Bakterienstämme sind in **Tabelle 6** aufgeführt.

Tabelle 6: Verwendete Bakterienstämme und Definition des zugehörigen Genotyps.

Bakterienstamm	Genotyp ^[111]
<i>E. coli</i> XL1-Blue	recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacI ^q ZΔM15Tn10(Tet ^r)]
<i>E. coli</i> BL21	F ⁻ dcm ompT hsdS(rB ⁻ mB ⁻)gal
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	F ⁻ dcm ompT hsdS(rB ⁻ mB ⁻)galλ(DE3)

3.1.6. Nährmedien

Die Kultivierung von Bakterien erfolgte mittels der in Tabelle 7 aufgelisteten Nährmedien. Vor der Verwendung wurden die Nährmedien bei 121 °C für 20 Minuten autoklaviert. Die zur Selektion der Bakterien eingesetzten Antibiotika sind in Tabelle 8 aufgeführt.

Tabelle 7: Zusammensetzung der genutzten Nährmedien.

Medium	Zusammensetzung
LB	10 g/L Trypton, 5 g/L Hefeextrakt, 10 g/L NaCl, pH 7
LB-Agar	10 g/L Trypton, 5 g/L Hefeextrakt, 10 g/L NaCl, 15 g/L Agar
SOC	20 g/L Trypton, 5 g/L Hefeextrakt, 0,5 g/L NaCl, 0,1 M MgCl ₂ , 0,1 M MgSO ₄ , 20 mM Glucose, pH 7

Tabelle 8: Übersicht über die verwendeten Antibiotika sowie die entsprechenden Endkonzentrationen im Medium.

Antibiotika	c [µg/mL]
Ampicillin	100
Chloramphenicol	35
Kanamycin	50
Tetracyclin	5

3.1.7. Marker und Probenpuffer

Die in dieser Arbeit verwendeten Größenstandards sowie die entsprechenden Probenpuffer sind in **Tabelle 9** und **Tabelle 10** zusammengefasst.

Tabelle 9: Verzeichnis der genutzten DNA- und Protein-Größenstandards.

Marker	Hersteller
Gene Ruler 1 kb DNA Ladder	Thermo Scientific
PageRuler Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific

Tabelle 10: Zusammensetzung der genutzten Probenpuffer.

Probenpuffer	Zusammensetzung
6x DNA-Probenpuffer	0,25 % (w/v) Bromphenolblau, 0,25 % (w/v) Xylencyanol FF, 30 % (v/v) Glycerol
5x RNA-Probenpuffer	0,25 % (w/v) Bromphenolblau, 0,25 % (w/v) Xylencyanol FF, 30 % (v/v) Glycerol, 70 % (v/v) Formamid
5x SDS-Probenpuffer	0,25 M Tris-HCl, 10 % (w/v) SDS, 50 % (v/v) Glycerol, 1 % (w/v) Bromphenolblau, 25 % (v/v) β -Mercaptoethanol

3.1.8. Oligonukleotide

Die zur Klonierung und Sequenzierung verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg) bezogen (**Tabelle 11** und **Tabelle 12**).

Tabelle 11: Sequenzen der für die Klonierung eingesetzten Oligonukleotide. Rot: *Sma*-Erkennungssequenz; Blau: Komplementär zu LOV2; Schwarz: Komplementär zu T7RNAP.

Bezeichnung	Sequenz 5'→3'
FW_QC2_SB2	GGTGAGGTTGCGGATCCCGGGGCCGCAAGCCTCTC
RV_QC2_SB2	GAGAGGCTTGCGGGCCCGGGATCCGCAACCTCACC
FW_RFC_SB2	CAACTTAAAGCTGGTGAGGTTGCGGATAAGCTGGCCACCACTCTA GAGC
RV_RFC_SB2	AGGCTTGCGGGCAGCGTTCCTCGGGGTCTTCTTGATCAGCATCAC
FW_QC2_SB3	GGGCACGTCTACCCCGGGGCATTTATGCAAG
RV_QC2_SB3	CTTGATAAATGCCTCGGGGTAGACGTGCC
FW_RFC_SB3	GCGCGTAGGGCACGTCTACAAGAAGCTGGCCACCACTCTAGAGC
RV_RFC_SB3	CAGCCTCGACAACCTTGATAAATGCTTTCTCGGGCGGTCTTCTTGAT CAGCATCAC
RV_RFC_SB3V1	CAGCCTCGACAACCTTGATAAATGCTTTCAATTCTTTTGCAGCTTC ATCGATATTCTCGGC
RV_RFC_SB3V2	CATGTCAGCCTCGACAACCTTGATAAATGCTTTTTTGCAGCTTCA TCGATATTTTCCGCGG
FW_QC2_SB4	CCGTGACCGATGAGCCCGGGGGTGAAATCTCTGAG
RV_QC2_SB4	CTCAGAGATTTACCCCGGGCTCATCGGTCACGG
FW_RFC_SB4	CGAAGTAGTTACCGTGACCGATGAGAAGCTGGCCACCACTCTAGA GC
RV_RFC_SB4	GCTTGACTTTCTCAGAGATTTACCAAGTGTCTCGGGCGGTCTTCTT GATCAGCATCAC
FW_QC_SB5	GTAACTTGCTTCCTCCCGGGACCGTTCAGGACATC
RV_QC_SB5	GATGTCCTGAACGGTCCCGGGAGGAAGCAAGTTAAC
FW_RFC_SB5	GCGCGGTTAACTTGCTTCCTAGTTCTCTGGCCACCACTCTAGAGC
RV_RFC_SB5	CCCGTAGATGTCCTGAACGGTTTCTCGGGCGGTCTTCTTGATCAG C

Tabelle 12: Auflistung der für die Sequenzierung genutzten Oligonukleotide.

Bezeichnung	Sequenz 5'→3'
pQE30 PROM	CCCGAAAAGTGCCACCTG
pQE30 REV	GTTCTGAGGTCATTACTGG
TaLo3	CAGTCATGACGCTGGC
TaLo4	GCGTTCTGCTTTGAGTAC
TaLo5	CCGCTGCTGTGTACC
TaLo6	CGCTGAGGCTATCGCA
TaLo7	GCAAGAAATCAAGCCG
TaUp2	CCGTCTTGGCTGTGTA
TaUp3	CGGAATCAATAGCTGGC
TaUp4	GAAGGGAGCAGTTATAGC
TaUp5	CGGCGAGACTTGCGA
TaUp6	GGTTGGAACATCGGAG
TaUp7	TTGTCAGCACTGGTTAGG

Die Sequenzierung erfolgte durch die Firma MWG Eurofins Genomics (Ebersberg, Köln).

3.1.9. Genfragmente

Die für die Klonierung der Konstrukte SB3V1, SB3V2 und SB3V3 genutzten Genfragmente (*gBlocks*®) gB_AsLOV2, gB_AsLOV2_V2 und gB_AsLOV2_V3 wurden von der Firma Integrated DNA Technologies (IDT, Leuven, Belgien) bezogen.

Tabelle 13: Gensequenzen für die Generierung der Konstrukte SB3V1, SB3V2 und SB3V3 verwendeten gBlocks® gB_AsLOV2, gB_AsLOV2_V2 und gB_AsLOV2_V3. Orange: *attC*-Sequenz; Türkis: C-terminale Verlängerung von LOV2.

Bezeichnung	Sequenz 5'→3'
gB_AsLOV2	<p>GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCGATCTGGCGAC CACCTGGAACGCATTGAAAAAACTTTGTGATTACCGATCCG CGCCTGCCGGATAACCCGATTATTTTTGCGAGCGATAGCTTT CTGCAGCTGACCGAATATAGCCGCGAAGAAATTCTGGGCCGC AACTGCCGCTTTCTGCAGGGCCCGGAAACCGATCGCGCGAC CGTGCGCAAATTCGCGATGCGATTGATAACCAGACCGAAGT GACCGTGCAGCTGATTA ACTATAACCAAAGCGGCAAAAATTT TGGAACCTGTTTCATCTGCAGCCGATGCGCGATCAGAAAGGC GATGTGCAGTATTTTATTGGCGTGCAGCTGGATGGCACCGAA CATGTGCGCGATGCGGCGGAACGCGAAGGCGTGATGCTGAT TAAAAAACCGCGGAAATATCGATGAAGCTGCAAAGAATTG CACCCAGCTTTCTTGTACAAAGTGGTCCCC</p>
gB_AsLOV2_V2	<p>GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCGATCTGGCCAC CACTCTAGAGCGCATTGAAAAAACTTTGTGATTACCGATCCG CGCCTGCCGGATAACCCGATTATTTTTGCGAGCGATAGCTTT CTGCAGCTGACCGAATATAGCCGCGAAGAAATTCTGGGCCGC AACTGCCGCTTTCTGCAGGGCCCGGAAACCGATCGCGCGAC CGTGCGCAAATTCGCGATGCGATTGATAACCAGACCGAAGT GACCGTGCAGCTGATTA ACTATAACCAAAGCGGCAAAAATTT TGGAACCTGTTTCATCTGCAGCCGATGCGCGATCAGAAAGGC GATGTGCAGTATTTTATTGGCGTGCAGCTGGATGGCACCGAA CATGTGCGCGATGCGGCGGAACGCGAAGGCGTGATGCTTAT CAAGAAGACTGCTGAGAACATTGACGAGGCGGCAAAGACCG CGGAAAATATCGATGAAGCTGCAAAAACCCAGCTTTCTTGT CAAAGTGGTCCCC</p>
gB_AsLOV2_V3	<p>GATCTGGCCACCACTCTAGAGCGCATTGAAAAAACTTTGTGA TTACCGATCCGCGCCTGCCGGATAACCCGATTATTTTTGCGA GCGATAGCTTTCTGCAGCTGACCGAATATAGCCGCGAAGAAA TTCTGGGCCGCAACTGCCGCTTTCTGCAGGGCCCGGAAACC GATCGCGCGACCGTGCGCAAATTCGCGATGCGATTGATAAC CAGACCGAAGTGACCGTGCAGCTGATTA ACTATAACCAAAGC GGCAAAAATTTTGGAACTGTTTCATCTGCAGCCGATGCGC GATCAGAAAGGCGATGTGCAGTATTTTATTGGCGTGCAGCTG GATGGCACCGAACATGTGCGCGATGCGGCGGAACGCGAAGG CGTGATGCTTATCAAGAAGACTGCTGAGAACATTGACGAGGC GGCAAAGCGCGAAGGCGTGATGCTGATTA AAAAACCGCGG AAAATATCGATGAAGCTGCAAAA</p>

3.1.10. Puffer und Lösungen

Die in dieser Arbeit eingesetzten Puffer und Lösungen sind in **Tabelle 14** zu finden. Die für die Reinigung durch Säulenchromatographie verwendeten Puffer wurden vor der Verwendung mittels Flaschenaufsatzfilter (0,2 µm, SFCA) steril filtriert und ca. 30 min entgast.

Tabelle 14: Übersicht über die Zusammensetzungen der verwendeten Puffer und Lösungen.

Bezeichnung	Zusammensetzung
50x TAE-Puffer	2 M Tris, 50 mM EDTA, 1 M Essigsäure
1x TE-Puffer	10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8
10x SDS-Laufpuffer	250 mM Tris, 520 mM Glycin, 35 mM SDS
10x Transkriptionspuffer	400 mM Tris-HCl, 110 mM MgCl ₂ , 20 mM Spermidin, 300 mM DTT
Coomassie-Färbelösung	0,2 % (m/v) Coomassie, 10 % (v/v) Eisessig, 45 % (v/v) Ethanol
Entfärbelösung	20 % (v/v) Ethanol, 10 % (v/v) Essigsäure
Lysepuffer	50 mM Tris-HCl, 20 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1 mM DTT, pH 8
Resuspendierungspuffer	100 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 10 mM Imidazol, pH 8
Waschpuffer	100 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 35 mM Imidazol, pH 8
Elutionspuffer	100 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 250 mM Imidazol, pH 8
Dialysepuffer	100 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, 1 mM DTT, pH 8,9
Lagerpuffer	50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 50 % (v/v) Glycerol, 10 mM DTT, pH 8,9

3.2. Mikrobiologische Methoden

3.2.1. Kultivierung von Bakterien

Die Kultivierung von Bakterien erfolgte mittels Inkubation bei einer Temperatur von 37 °C über Nacht. Flüssigkulturen wurden in einem Schüttelinkubator mit einer Drehzahl von 160 pm inkubiert, Agarplatten in einem Brutschrank.

3.2.2. Herstellung elektrokompetenter Zellen

Zunächst wurden 125 mL LB-Medium in einem Verhältnis von 1:50 mit einer Vorkultur (Übernachtskultur) des entsprechenden Stamms angeimpft und bei 37 °C und 160 rpm inkubiert. Nach Erreichen einer optischen Dichte bei 600 nm von 0,3 wurde die Bakterienkultur 30 min auf Eis gekühlt. Die Trennung von Zellen und Medium erfolgte mittels Zentrifugation bei 4 °C und 4000 rpm für 15 min verteilt auf vier 50-mL-Reaktionsgefäße. Die erhaltenen Zellpellets wurden jeweils in 15 mL 10 %igem Glycerin aufgenommen, vereinigt und dann auf zwei 50-mL-Reaktionsgefäße (jeweils mit 30 mL Suspension) verteilt und erneut zentrifugiert (4 °C und 4000 rpm für 15 min). Im Folgenden wurden die Zellpellets in 1,5 mL sterilem 10 %igem Glycerin resuspendiert und in 100-µL-Aliquots bei -80 °C gelagert.

3.2.3. Transformation elektrokompetenter Zellen

Die Transformation von Zellen mit Fremd-DNA wurde mit 100 µL elektrokompetenter Zellen und ca. 25 ng Plasmid-DNA in einer gekühlten Elektroporationsküvette (1mm) durchgeführt. Die Transformation erfolgte durch Anlegen eines Spannungspulses von 1800 V für ca. 5 ms. Anschließend wurden die Zellen in 900 µL, auf 37 °C vorgewärmtem SOC-Medium aufgenommen, 60 min bei 350 pm und einer Temperatur von 37 °C inkubiert und danach, basierend auf der spezifischen Antibiotikaresistenz, auf LB-Agar selektiert.

3.2.4. Stammkulturen

Die Stammkulturen dienten der Konservierung verschiedener gentechnisch veränderter Bakterien. Dazu wurden 500 µL einer Übernachtskultur im Verhältnis von 1:1 mit 100 %igem Glycerin versetzt und bei einer Temperatur von -80 °C gelagert.

3.3. Molekularbiologische Methoden

3.3.1. Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde zur spezifischen Amplifikation von DNA-Fragmenten durchgeführt. Im Rahmen dieser Arbeit betraf dies die Amplifikation von LOV2 mit T7-RNA-Polymerase-komplementären Überhängen. Der Reaktionsansatz sowie die genutzten PCR-Parameter sind in **Tabelle 15** aufgeführt. Eine Übersicht über die verwendeten Oligonukleotide ist unter 3.1.8 zu finden.

Tabelle 15: Reaktionsparameter und Zusammensetzung des Reaktionsansatzes zur Amplifikation des LOV2-Genfragments.

Zyklen	T [°C]	t [s]	Komponente	V [μL]	Endkonzentration
1	95	120	10x <i>Taq</i> -Reaktionspuffer	5,0	1x
30	95	30	pCR2.1-LOV (100 ng/μL)	1,0	0,7 nM
	58	60	Fw-Primer (10 pmol/μL)	2,5	0,5 mM
	68	30	Rv-Primer (10 pmol/μL)	2,5	0,5 mM
1	68	300	dNTP-Mix (je 10 mM/dNTP)	1,0	0,2 mM
∞	4	∞	<i>Taq</i> -Polymerase (2,5 U/μL)	0,5	1,25 U
ddH ₂ O				auf 50 μL	

3.3.2. Quick-Change-Mutagenese

Um die Insertion der LOV-codierenden Sequenz in den Zielvektor pQET7WT zu ermöglichen, musste eine *Sma*I-Erkennungssequenz an der gewünschten Insertionsposition des Vektors durch *Quick-Change*-Mutagenese erzeugt werden. Diese Methode basiert auf der Amplifikation der Zielsequenz mit einem Primerpaar, das die gewünschte Mutation (Deletion oder Insertion) umfasst. Um eine Dimerisierung der Primer zu vermeiden, wurden partiell komplementäre Oligonukleotide genutzt.^[112] Die entsprechenden Sequenzen sind unter 3.1.8 zu finden. Der Reaktionsansatz sowie die Reaktionsbedingungen sind in **Tabelle 16** aufgeführt.

Tabelle 16: Reaktionsparameter und Zusammensetzung des Reaktionsansatzes zur Insertion der *Sma*I-Erkennungsequenz in pQET7WT.

Zyklen	T [°C]	t [s]	Komponente	V [µL]	Endkonzentration
1	95	300	10x <i>Pfu</i> -Reaktionspuffer	5,0	1x
18	95	30	pQET7WT (50 ng/µL)	1,0	0,3 nM
	55	60	Fw-Primer (10 pmol/µL)	1,1	0,22 mM
	68	360	Rv-Primer (10 pmol/µL)	1,1	0,22 mM
∞	4	∞	dNTP-Mix (je 10 mM/dNTP)	1,0	0,2 mM
			DMSO	1,5	3 % (v/v)
			<i>Pfu</i> -Polymerase (2,5 U/µL)	1,0	2,5 U
			ddH ₂ O		auf 50 µL

Im Anschluss an die PCR wurde die Template-DNA pQET7WT mit *Dpn*I abgebaut, das Produkt pQET7SBX-*Sma*I (X = 2, 3, 4, 5, 3V1, 3V2 und 3V3) für die Transformation von *E. coli* XL1-Blue verwendet und basierend auf der entsprechenden Antibiotikaresistenz selektiert. Erhaltenes Plasmid wurde durch Restriktionsanalyse mit *Sma*I auf das Vorhandensein der Restriktionserkennungsstelle hin analysiert. Die positiven Klone pQET7SBX-*Sma*I (X = 2, 3, 4, 5, 3V1, 3V2 und 3V3) wurden im Weiteren für die restriktionsfreie Klonierung zur Generierung der jeweiligen Polymerasekonstrukte genutzt.

3.3.3. Restriktionsfreie Klonierung

Die restriktionsfreie Klonierung (RF-Klonierung) ist eine PCR-basierte Methode, mit der DNA-Fragmente bis zu einer Größe von 1,1 kb in Zielvektoren eingebracht werden können.^[113,114]

Die Insertion des LOV2-Gens in pQET7WT erfolgte mit dem Vektor pQET7SBX-*Sma*I (X = 2, 3, 4, 5, 3V1, 3V2 und 3V3) als Template. Als sog. Mega-Primer diente das durch PCR amplifizierte LOV2-Fragment. Um eine effiziente Anlagerung des Primers zu gewährleisten, wurde der Vektor pQET7SBX-*Sma*I (X = 2, 3, 4, 5, 3V1, 3V2 und 3V3) zuvor mit Hilfe des Restriktionsenzym *Sma*I linearisiert. Die Reaktionsbedingungen und der entsprechende Reaktionsansatz sind in **Tabelle 17** zu finden.

Tabelle 17: Reaktionsparameter und Zusammensetzung des Reaktionsansatzes zur Insertion des LOV-Inserts in den Zielvektor pQET7WT.

Zyklen	T [°C]	t [s]	Komponente	V [µL]	Endkonzentration
1	98	30	10x <i>Phusion</i> -Reaktionspuffer	5,0	1x
30	98	8	pQET7SBX- <i>Sma</i> I/ <i>Sma</i> I (40 ng/µL)	2,5	0,6 nM
	55	20	LOV-Insert (40 ng/µL)	7,4	24 nM
	72	180	dNTP-Mix (je 10 mM/dNTP)	0,4	0,08 mM
1	72	300	DMSO	1,5	3 % (v/v)
∞	4	∞	<i>Phusion</i> -Polymerase	0,5	
ddH ₂ O				auf 50 µL	

Der Abbau der Template-DNA pQET7SBX-*Sma*I/*Sma*I erfolgte mit *Dpn*I. Das Produkt pQET7SBX (X = 2, 3, 4, 5, 3V1, 3V2 und 3V3) wurde anschließend zur Transformation von *E. coli* XL1-Blue verwendet und entsprechend der vorhandenen Antibiotikaresistenzen selektiert.

3.3.4. Isolierung von Plasmid DNA

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus Zellen wurde mit Hilfe des Plasmid Miniprep Kits (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Herstellerangaben durchgeführt.

3.3.5. Restriktion von DNA

Die Linearisierung von Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe von Restriktionsenzymen. Die verwendeten Enzyme sind unter 3.1.4 zu finden. Es wurden nach Herstellerangaben jeweils 1-10 U/µg DNA eingesetzt. Die Inkubation erfolgte, je nach eingesetztem Enzym, für 1 - 2 h bei einer Temperatur von 30 °C für *Sma*I beziehungsweise bei 37 °C für alle weiteren Enzyme. Enzyme, die für den präoperativen Verdau verwendet wurden, wurden bei 80 °C für 20 min inaktiviert. Die folgende Analyse wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt.

3.3.6. Agarose-Gelelektrophorese

Für die Analyse von DNA- sowie RNA-Fragmenten wurde die Agarose-Gelelektrophorese verwendet, wobei eine Konzentration von 1 % (w/v) Agarose in 1x TAE-Puffer genutzt wurde. Die RNA-Analytik erfolgte nach P. S. Aranda^[15] unter Zusatz von 0,07 % (v/v) Natriumhypochlorit, um erstens eine mögliche RNase-Aktivität zu inhibieren sowie zweitens die Ausbildung von Sekundärstrukturen zu verhindern. Die DNA-Proben wurden vor Auftragen auf

das Gel mit 1x DNA-Probenpuffer, die RNA-Proben mit 1x RNA-Probenpuffer versetzt. Das eingesetzte Probenvolumen entsprach dabei einer Masse von ca. 50 - 500 ng. Die Trennung der Nukleinsäurefragmente wurde in 1x TAE-Puffer bei einer konstanten Stromstärke von 50 mA für DNA-Proben und 60 mA für RNA-Proben über einen Zeitraum von ca. 50 min durchgeführt. Die Visualisierung der Proben erfolgte, nach einer Inkubation in einer Ethidiumbromidlösung (20 µg/mL) und ddH₂O für jeweils 1 min, mittels Geldokumentationsanlage.

3.3.7. Heterologe Expression in *Escherichia coli*

Um ausreichend Zielprotein für folgende Aktivitätstests zu erhalten, wurden T7RNAP-WT sowie T7RNAP-LOV2-Varianten heterolog in *E. coli* BL21[pRep4] exprimiert. Die Hauptkultur wurde dazu in einem Verhältnis von 1:50 aus einer Vorkultur angeimpft und bei 37 °C und 160 rpm inkubiert, bis die optische Dichte bei 600 nm einen Wert von 0,6 - 1,0 aufwies. Die Expression des entsprechenden Zielproteins wurde im Folgenden durch Zugabe von 0,4 mM IPTG induziert und die Zellen für weitere 4 h bei 37 °C und 160 rpm inkubiert. Die Zellernte erfolgte durch Zentrifugation bei 10000 g und 4 °C. Das erhaltene Zellpellet aus 500 mL Kultur wurde abschließend in 10 mL Lysepuffer suspendiert und bei -20 °C gelagert.

3.4. Reinigung von T7RNAP-WT und Varianten

3.4.1. Zellaufschluss, Polyethylenimin- und Ammoniumsulfat-Fällung

Die Zielproteine T7RNAP-WT und Varianten wurden zur Abtrennung von zelleigenen Nucleinsäuren nach einem modifizierten Protokoll von Grodberg und Dunn^[101] behandelt, bei dem auf den Zellaufschluss zwei Fällungen folgen, zuerst mit Polyethylenimin und anschließend mit Ammoniumsulfat. Dazu wurde das in 10 mL Lysepuffer resuspendierte Zellpellet aus 500 mL Kultur langsam auf Eis aufgetaut, mit weiteren 14 mL Lysepuffer sowie 6 mL Lysozymlösung (1,5 mg/mL in 1x TE-Puffer), 50 µL PMSF (20 mg/mL in *iso*-Propanol) und 2,5 mL 0,8 % (w/v) Natriumdeoxycholatlösung versetzt und 20 min unter Rühren auf Eis inkubiert. Der Zellaufschluss erfolgte mit Hilfe eines Ultraschall-Homogenisators bei 4 °C in 9 Zyklen (20 s Impuls, 20 s Pause) mit einer Amplitude von 20 %.

Um einen Teil der zelleigenen Proteine und Nucleinsäuren vom Zielprotein abzutrennen, wurden dem Lysat zunächst 5 mL 2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung, 12,45 mL Lysepuffer und 5 mL PEI-Lösung (10 % (v/v) in ddH₂O, pH 8) zugegeben, die Mischung 20 min auf Eis gerührt und 15 min bei 4 °C und 15000 g zentrifugiert. Die Fällung von T7RNAP-WT und Varianten erfolgte anschließend durch langsame Zugabe von 0,82 Volumen (45,1 mL) gesättigter $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung (pH 7), 15-minütiges Rühren bei einer Temperatur von 4 °C sowie anschließender Zentrifugation der Lösung bei 39000 g und 4 °C. Das erhaltene Pellet wurde in 7,5 mL Resuspendierungspuffer aufgenommen und für die folgende Reinigung mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie unter Rühren für 16 h bei 4 °C gegen 1 L Resuspendierungspuffer dialysiert.

3.4.2. Dialyse

Die Entfernung von Ammoniumsulfat vor der chromatographischen Reinigung der Proteine sowie die Überführung der Zielproteine in den Lagerpuffer nach Isolierung durch Ni-NTA-Affinitätschromatographie erfolgte mittels Dialyse. Dazu wurde ein Dialyseschlauch (MWCO 14 kDa) mit 7,5-10 mL der entsprechenden Proteinsuspension gefüllt, dieser in 1 L Resuspendierungspuffer beziehungsweise Lagerpuffer gegeben und für 16 h bei 4 °C bei 100 rpm gerührt. Nach der Dialyse vorhandenes Präzipitat wurde mittels 15-minütiger Zentrifugation bei 5000 rpm und 4 °C für abgetrennt.

3.4.3. Affinitätschromatographie

Die Reinigung von Proteinen mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie basiert auf der spezifischen reversiblen Bindung ihres (N-)terminalen Hexahistidins (His₆-Tag) an die durch NTA (Nitrilotriacetat) immobilisierten Ni²⁺-Ionen. Die Durchführung erfolgte hier mit Hilfe des

Systems ÄKTApurifier (GE Healthcare, Freiburg, Deutschland) in Kombination mit einer 5 mL-HisTrap-HP-Säule (Qiagen, Hilden, Deutschland).

Das Zellysat, das das zu isolierende Zielprotein (T7RNAP-WT oder Varianten) enthielt, wurde nach der Dialyse zur Überführung in den Resuspendierungspuffer zunächst für 10 min bei 5000 rpm und 4 °C zentrifugiert und der erhalten Überstand mit Hilfe eines 0,22-µm-Spritzenfilters von Präzipitat und weiteren festen Verunreinigungen befreit. Das so vorbehandelte Zellysat wurde mit einer Flussrate von 1 mL/min auf die zuvor mit 50 mL Resuspendierungspuffer äquilibrierte Säule aufgetragen und diese anschließend zur Entfernung unspezifisch gebundener Verunreinigungen mit 100 mL Waschpuffer gespült. Die Elution des auf der Säule gebundenen Zielproteins erfolgte mit 50 mL Elutionspuffer und einer Flussrate von 0,5 mL/min. Dabei wurde das Eluat in 1-mL-Fraktionen gesammelt. Die bei einer Wellenlänge von 280 nm ermittelten Peakfraktionen wurden durch SDS-PAGE (siehe 3.5) auf enthaltenes Zielprotein und Reinheit hin analysiert. Eluatfraktionen, die das Zielprotein in ausreichender Reinheit und Konzentration enthielten, wurden vereinigt, gegen Lagerpuffer dialysiert (siehe 3.4.2), mit 9,5 mM DTT und 50 % (v/v) sterilem Glycerin versetzt und in 500 µL-Aliquots bei -20 °C gelagert.

3.5. Proteinbiochemische Methoden

3.5.1. SDS-Gelelektrophorese

Die SDS-Gelelektrophorese wurde für die Analyse von Proteinen basierend auf deren Molekulargewicht eingesetzt. Dazu wurde ein diskontinuierliches System aus einem 4 %igen Sammelgel und einem 10 %igen Trenngel genutzt. Die Zusammensetzung des Polyacrylamidgels ist der **Tabelle 18** zusammengefasst. Die zu analysierenden Proben wurden in einem Verhältnis von 1:5 mit 5x SDS-Probenpuffer versetzt, 10 min bei 95 °C denaturiert und in einem Probenvolumen von 10 µL auf das Gel aufgetragen.

Tabelle 18: Zusammensetzung des für die SDS-Gelelektrophorese genutzten Trenn- und Sammelgels.

Trenngel		Sammelgel	
Komponente	V [µL]	Komponente	V [µL]
30 % Acrylamid	5100	30 % Acrylamid	670
1,5 M Tris-Cl pH 8,8	3900	0,5 M Tris-Cl pH 6,8	1250
ddH ₂ O	5700	ddH ₂ O	2975
10 % APS	150	10 % APS	50
TEMED	15	TEMED	5

Die Elektrophorese erfolgte für 50 min in 1x SDS-Laufpuffer bei einer konstanten Spannung von 180 V. Zur Visualisierung der Proteine wurde das Gel mit Coomassie-Färbelösung behandelt, ca. 1 min in der Mikrowelle erwärmt und 20 min inkubiert. Abschließend wurde die Coomassie-Färbelösung entfernt, Entfärbelösung zugegeben, wiederholt erwärmt und weitere 20 min inkubiert.

3.5.2. Aktivitätsbestimmung mittels *in-vitro*-Transkription

Da RNA, im Vergleich zu DNA, aufgrund des molekularen Aufbaus eine geringere Stabilität aufweist, und somit in alkalischer Umgebung oder auch durch ubiquitär auftretende Rnasen abgebaut wird, wurden der Arbeitsplatz sowie die verwendeten Geräte vor Beginn dieser Arbeiten zuerst mit 1 %ger NaOCl-Lösung, danach mit 70 % (v/v) EtOH behandelt und die genutzte Verbrauchsmaterialien 20 min bei 121 °C autoklaviert. Der genutzte 10x Transkriptionspuffer wurde steril filtriert (0,22 µm, PES) und in 500 µL-Aliquots bei -20 °C gelagert. Die Reinigung der Template-DNA pAlterGC/*HindIII* erfolgte mittels PCR-Purification Kit (Thermo Scientific) nach Herstellerangaben. Um eine Kontamination zu vermeiden, wurden zudem während der gesamten Arbeiten Nitril-Handschuhe getragen.

Die Aktivitätsbestimmung der gereinigten T7RNAP-WT sowie der T7RNAP-LOV2 Varianten erfolgte mittels *in-vitro*-Transkription. Das jeweilige Protein wurde dazu zunächst auf Eis für 30 min unter Lichteinfluss bei einer Wellenlänge von 470 nm in transparenten Reaktionsgefäßen (Lichtreaktion) bzw. unter Lichtausschluss in schwarzen Reaktionsgefäßen (Dunkelreaktion) inkubiert und zum Start der Reaktion anschließend dem entsprechenden Reaktionsansatz zugegeben (siehe **Tabelle 19**). Um zu überprüfen, ob das zu untersuchende Enzym eine Photoaktivität aufweist, wurden T7RNAP-WT und Varianten während der Reaktion in transparenten Reaktionsgefäßen kontinuierlich mit Licht einer Wellenlänge von 470 nm bestrahlt (Lichtreaktion) bzw. unter Lichtausschluss in schwarzen Reaktionsgefäßen für 1 h bei 37 °C inkubiert. Als Template diente dabei das GFP-codierende Gen unter Kontrolle eines T7-Promotors (siehe 3.1.3).

Tabelle 19: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes zur Aktivitätsbestimmung mittels *in-vitro*-Transkription.

Komponente	V [μ L]	Endkonzentration
10x Transkriptionspuffer	2,50	1x
rNTP-Mix (25 mM/rNTP)	2,00	2 mM
pAlterGC/ <i>HindIII</i> (150 ng/ μ L)	1,00	0,1 μ M
T7-RNA-Polymerase (0,05 mg/mL)	3,65	0,06 μ M
HPLC-H ₂ O		auf 25 μ L

Die entstandenen RNA-Produkte wurden mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und dokumentiert sowie mithilfe der Bildanalyse-Software *Image J*^[116] quantitativ bestimmt.

3.5.3. Aktivitätsbestimmung mittels Molecular Beacon

Die Aktivitätsbestimmung der T7RNAP-WT und Varianten mit Hilfe eines Molecular- Beacon-Assays basiert auf einem DNA-Template mit Hairpin-Struktur, das N-terminal eine zum T7-Promotor komplementäre Sequenz enthält und nach erfolgter Transkription in linearisierter Form vorliegt.^[117] Innerhalb der Sekundärstruktur befinden sich bei dem hier verwendeten Oligonukleotid zwei modifizierte Thymin-Nukleotide: Während ein Thymin (T24, siehe Tabelle 18) mit dem Fluorophor TAMRA (Tetramethylrhodamin; Absorptionsmaximum bei $\lambda = 564$ nm, Emissionsmaximum bei $\lambda = 579$ nm)^[118] verknüpft ist, trägt das zweite Thymin (T7; siehe **Tabelle 20**) den nicht-fluoreszenten Farbstoff Dabcyl, der mit einem Absorptionsbereich von $\lambda = 380$ nm bis $\lambda = 550$ nm als Quencher von TAMRA fungiert.

Tabelle 20: Sequenz des T7-Promotors und des Molecular Beacon inklusive der mit Thymin T7 und T24 fusionierte Farbstoffmoleküle Dabcyl und TAMRA (fett) und der zum T7-Promotor komplementären Sequenz (unterstrichen).

Bezeichnung	Sequenz 5'→3'
T7-Promotor	TAATACGACTCACTATA
Molecular Beacon	GCGAGA(T-Dabcyl)CCAAAAAAAAAAACCA(T-TAMRA)CTCGCC GAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTA

Da das Molecular Beacon und somit auch die zum T7-Promotor komplementäre Sequenz als einzelsträngige DNA vorliegt, wurde dieses zunächst in einem Master-Mix (siehe **Tabelle 21**) mit einer T7-Promotorsequenz inkubiert, um die Erkennung und Bindung durch T7RNAP zu gewährleisten.

Tabelle 21: Zusammensetzung des Master-Mix für folgende *in-vitro* Transkription mit dem Molecular Beacon.

Komponente	V [μ L]	Endkonzentration
Molecular Beacon (0,1 nmol/ μ L)	1,00	10 μ M
T7-Promotor (0,1 nmol/ μ L)	1,11	11 μ M
10x Transkriptionspuffer	7,89	8x

Der Master-Mix wurde vor Zugabe zum Reaktionsansatz (siehe **Tabelle 22**) zur Denaturierung der Hairpin-Struktur für 5 min auf 95 °C erhitzt und anschließend 30 min auf Eis abgekühlt, um die Ausbildung einer doppelsträngigen T7-Promotorsequenz sowie der Sekundärstruktur des Molecular Beacon zu erreichen.

Tabelle 22: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes zur Aktivitätsbestimmung mittels Molecular Beacon.

Komponente	V [μ L]	Endkonzentration
10x Transkriptionspuffer	2,5	1x
rNTP-Mix (25 mM/rNTP)	2,0	2 mM
T7-RNA-Polymerase (0,2 mg/mL)	5,0	0,4 μ M
Master-Mix	1,0	/
HPLC-H ₂ O		auf 25 μ L

Die Detektion des linearen Templates (Molecular Beacon) erfolgte anhand des fusionierten Fluorophors TAMRA mithilfe eines Plattenlesegeräts (BioTek Synergy 2) in schwarzen 96-well-Platten bei einer Temperatur von 37 °C durch Anregung mit Licht einer Wellenlänge von $\lambda = 530$ nm und Messung der Fluoreszenz von TAMRA bei $\lambda = 590$ nm. Das Messintervall betrug 1 min über einen Zeitraum von insgesamt 60 min, wobei für jeden Reaktionsansatz eine Dreifachbestimmung durchgeführt wurde.

3.6. Computerbasierte Methoden

3.6.1. Image J

Das Programm *Image J*^[119] diente der quantitativen Analyse von GFP-RNA, die nach *in-vitro*-Transkription durch T7RNAP vorlag. Die mittels *Image J* erstellten Intensitätsplots der RNA-Produkte wurden über die erhalten Peakflächen integriert und prozentual festgehalten. Die Werte aus mindestens drei unabhängigen Messungen wurden gemittelt, relativ zum Wildtyp (= 100 %) normiert und den jeweiligen enzymatischen Aktivitäten von T7RNAP-WT bzw. Varianten zugeordnet.

3.6.2. Molekulardynamik-Simulation

Um die 3D-Struktur ausgewählter T7RNAP-LOV2-Konstrukte zu untersuchen, wurden von Dr. C. Ehrt (Fakultät Chemie und Chemische Biologie, TU Dortmund) basierend auf den Strukturen des Initiationskomplexes (PDB: 2PI4^[73]) und des Elongationskomplexes (PDB: 1H38^[74]) der T7RNAP sowie der Struktur des Sensors AsLOV2 (PDB: 2V0U^[120]) Molekulardynamik-(MD)-Simulationen durchgeführt. Für jedes zu analysierende Konstrukt wurden dazu zwei MD-Simulationen (MD1 und MD2) über einen Zeitraum von 600 ns angelegt. Die Ergebnisse wurden anschließend mittels Pymol^[121] visualisiert.

4. Ergebnisse und Diskussion

Der hier durchgeführten Arbeit wurde das Protein T7-RNA-Polymerase (T7RNAP) als Effektor in Kombination mit dem Sensorprotein (AsLOV2) für die Generierung eines lichtschtbaren Transkriptionssystems zugrunde gelegt. Daher wurde zunächst das Effektorprotein (T7RNAP), das die Basis des Systems darstellt, näher untersucht. Dazu wurde dieses exprimiert, aufgereinigt und basierend auf dessen enzymatischer Aktivität unter Einfluss von Licht einer definierten Wellenlänge (470 nm) sowie unter Zugabe des vom Sensorprotein LOV2 benötigten Cofaktors FMN analysiert.

Im Folgenden wurden definierte Fusions-/Insertionspositionen innerhalb der Polymerase genutzt, um die lichtsensitive Domäne LOV2 gentechnisch mit der T7RNAP zu fusionieren bzw. diese zu insertieren. Die entsprechenden Konstrukte wurden kloniert, gereinigt und im Hinblick auf deren (lichtsensitive) enzymatische Aktivität getestet. Das mittels dieser Ergebnisse bestimmte, optimale lichtschtbare Transkriptionssystem T7RNAP-LOV2, wurde abschließend durch eine Modifikation der C-terminalen Sequenz der LOV2-Domäne optimiert.

4.1. Expression und Reinigung von T7RNAP-WT

Wildtyp-T7-RNA-Polymerase^[67,122] (UniProt: P00573) wurde als Referenz-Protein für alle im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen (Expression und Reinheit der isolierten Proteine, Aktivitätsbestimmung in Gegenwart/in Abwesenheit von Licht durch *in-vitro*-Transkriptionen) benötigt. Die codierende Sequenz lag zu Beginn der Arbeiten im Vektor pQET7WT (bereitgestellt von P. Dollinger, Fakultät Chemie und Chemische Biologie, TU Dortmund) vor und wurde ausgehend von diesem Plasmid in *E. coli* BL21[pREP4] heterolog exprimiert.

Zur Reinigung mithilfe der Ni-NTA-Chromatographie wurde das Standardprotokoll (The QIAexpressionist, Qiagen)^[123] in Anlehnung an die von Grodberg und Dunn 1988 etablierte Verfahrensweise^[101] modifiziert, um Nukleinsäuren und Nukleotide sowie einen Teil der intrazellulären, DNA-bindenden Proteine abzutrennen. Dies erfolgte durch Fällungsreaktionen mit PEI und Ammoniumsulfat, welches durch anschließende Dialyse vor der chromatographischen Reinigung entfernt wurde. **Abbildung 15** zeigt ein exemplarisches SDS-Gel der heterologen Expression, Dialyse und der vereinigten Eluate nach der Ni-NTA-Chromatographie.

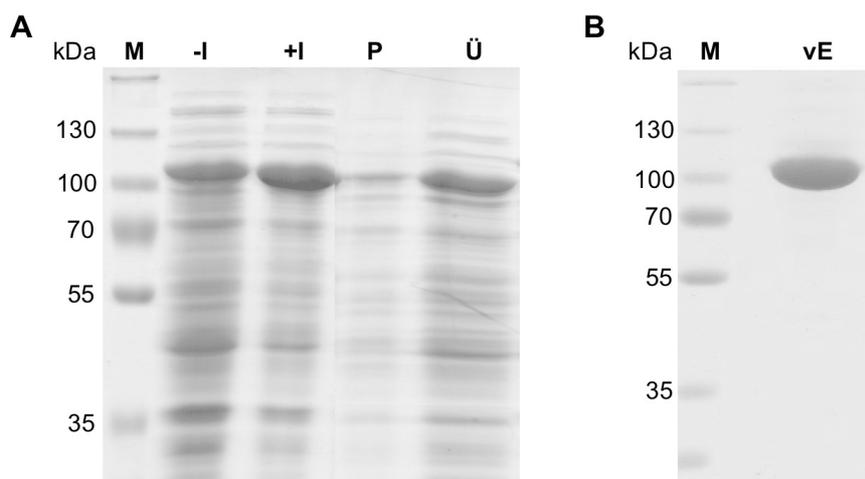


Abbildung 15: SDS-PAGE (A) der heterologen Expression von T7RNAP-WT in BL21[pRep4] mit -I: vor Induktion; + I: nach Induktion; P: Pellet nach Dialyse; Ü: Überstand nach Dialyse und (B) der vereinigten Eluatfraktionen (vE) nach chromatographischer Reinigung durch Ni-NTA. M: *PageRuler Plus Prestained Protein Ladder*.

Anhand der intensiven Bande im Bereich von ca. 100 kDa ist ersichtlich, dass sich T7RNAP-WT (MW \approx 100 kDa, siehe 8.2) in jeder Probe nachweisen lässt. Der Vergleich der Bandenintensität in diesem Bereich vor und nach Induktion, auch im Vergleich zu den enthaltenen zellulären Proteinen, deutet auf eine erfolgreiche Überexpression der Polymerase in BL21[pRep4] hin. Nach der Dialyse zur Entfernung des enthaltenen Ammoniumsulfats und zur Vorbereitung auf die folgende Reinigung mittels Ni-NTA, konnten ca. 80 % des Zielproteins in löslicher Form erhalten werden. Die vereinigten Eluate der Affinitätschromatographie ergaben eine durchschnittliche Ausbeute von ca. 20 mg T7RNAP-WT/L Kultur.

4.2. Lichtabhängige katalytische Aktivität von T7RNAP-WT

Mithilfe der gereinigten Polymerase T7RNAP-WT wurde ein Assay entwickelt, das für die Identifikation und quantitative Charakterisierung von lichtschtbaren Varianten mit inserierter LOV2-Domäne benötigt wurde. Dieses Assay basierte auf einer *in-vitro*-Transkriptionsreaktion mit und ohne Bestrahlung mit blauem Licht unter Verwendung des linearisierten Plasmids pAlterGC/*HindIII*, das die codierende Sequenz für GFP unter der Kontrolle eines T7-Promotors enthält (**Abbildung 16**).

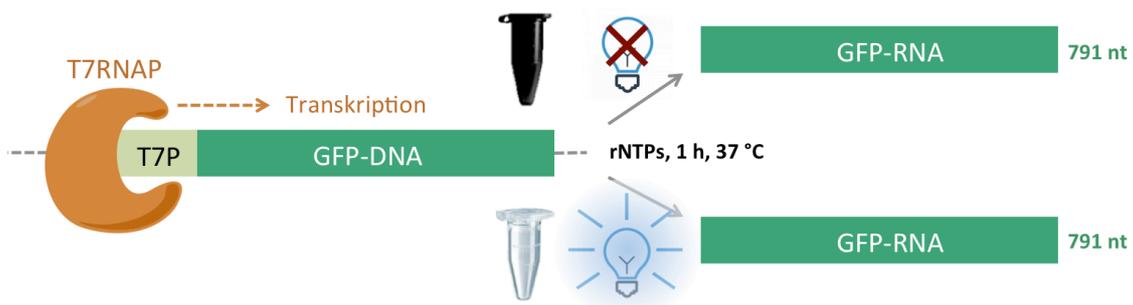


Abbildung 16: Bestimmung der (lichtabhängigen) enzymatischen Aktivität von T7RNAP-WT und Varianten (T7RNAP; orange) mittels *in-vitro*-Transkription des GFP-Gens (GFP-DNA; grün) unter der Kontrolle des T7-Promotors (T7P; hellgrün).

Da die Belichtung des Enzyms in diesen Reaktionen unter definierten und reproduzierbaren Bedingungen stattfinden sollte, wurden Arrays aus 470-nm-LEDs verwendet, deren Lichtstärke über einen Stromstärken-Regler stufenweise gewählt werden konnte (**Abbildung 17**).



Abbildung 17: Blaulicht-Beleuchtungsapparatur mit integrierten 470 nm-LEDs für lichtabhängige *in-vitro*-Transkriptionsreaktionen.

Die über den Regler erreichbaren Lichtstärken wurde mit einem Luxmeter bestimmt und betragen 92 Lx, 111 Lx, 163 Lx, 225 Lx und 288 Lx. Zur Identifikation geeigneter Assay-Bedingungen wurden *in-vitro*-Transkriptions-Reaktionen durchgeführt, bei denen verschiedene (physikalische, chemische) Parameter variierten. Um eine quantitative Bewertung zu ermöglichen, wurden diese Reaktionen jeweils mit und ohne Beleuchtung durchgeführt.

In einer ersten Versuchsreihe sollte untersucht werden, inwieweit die enzymatische Aktivität der T7RNAP durch Belichtung beeinträchtigt wird. Dazu wurden *in-vitro*-Transkriptionen bei 92 Lx (Lichtreaktion) und 0 Lx (Dunkelreaktion) durchgeführt und die erhaltenen RNA-Produkte (791 nt) mithilfe von Bleichgelen^[124] aufgetrennt. Die Gele wurden mit Ethidiumbromid gefärbt, mit einer CCD-Kamera dokumentiert und die erhaltenen Bilder mit *ImageJ*^[119] in Intensitätsplots umgewandelt (siehe **Abbildung 18**). Aus denen durch Integration über die Peakflächen errechneten Intensitätswerten konnte abschließend die prozentuale enzymatische Polymeraseaktivität für die einzelnen Transkriptionsreaktionen bestimmt werden.

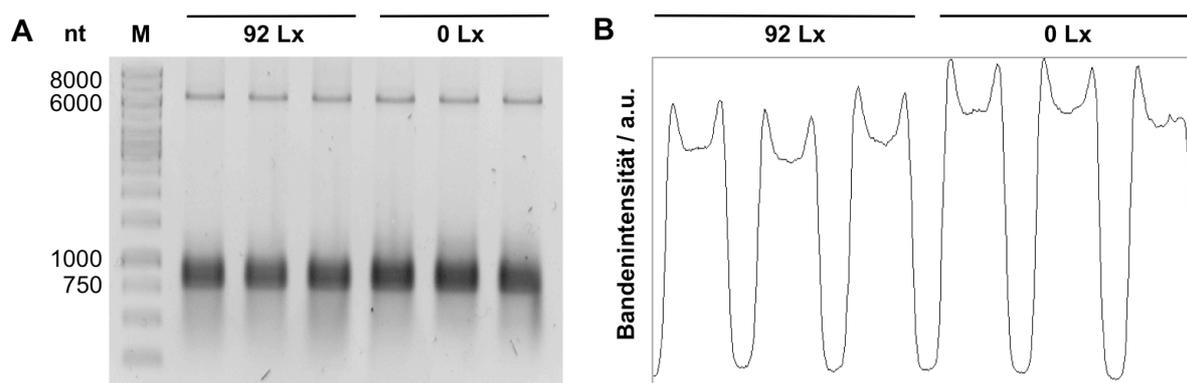


Abbildung 18: (A) Agarosegel und (B) zugehöriger Intensitätsplot der *in-vitro*-Transkription von GFP mit T7RNAP-WT bei einer Beleuchtungsstärke von 92 Lx sowie einer Wellenlänge von 470 nm (Lichtreaktion) und 0 Lx (Dunkelreaktion); M: 1 kb GeneRuler.

In **Abbildung 18** wird diese Vorgehensweise exemplarisch gezeigt, wobei für jede Transkriptionsreaktion mindestens eine Dreifachbestimmung vorgenommen wurde. Für die Reaktion unter Lichteinfluss (92 Lx) wie auch für die Dunkelreaktion (0 Lx) sind deutliche Banden im Bereich von ca. 800 nt zu erkennen, die der GFP-RNA (791 nt) zugeordnet werden können. Demnach liegt die hier verwendete Polymerase (T7RNAP-WT) auch bei Bestrahlung mit Licht einer Beleuchtungsstärke von 92 Lx im aktiven Zustand vor. Um festzustellen, ob die Bestrahlung während der Transkriptionsreaktion zu einer veränderten Enzymaktivität führt, wurden die (prozentualen) Intensitäten der erhaltenen Produktbanden bei 92 Lx in Relation zu 0 Lx betrachtet, wobei für die Dunkelreaktion (0 Lx) eine Polymeraseaktivität von 100 % vorausgesetzt wurde. Daraus ergab sich für die Lichtreaktion der T7RNAP-WT bei 92 Lx eine Restaktivität von 89 % und somit ein Aktivitätsverlust von 11 %. Diese Differenz kann auf die eingebrachte Lichtenergie (vgl. Tabelle 21) und infolgedessen auftretende Photoschäden des Proteins^[125,126], der Template-DNA oder der Substrat-Nukleotide^[127] zurückgeführt werden. Die Untersuchung der enzymatischen Aktivität von T7RNAP-WT in Abhängigkeit von höheren Beleuchtungsstärken (111 Lx, 163 Lx, 225 Lx und 288 Lx) erfolgte analog und wurde in **Abbildung 19** und **Tabelle 23** zusammengefasst.

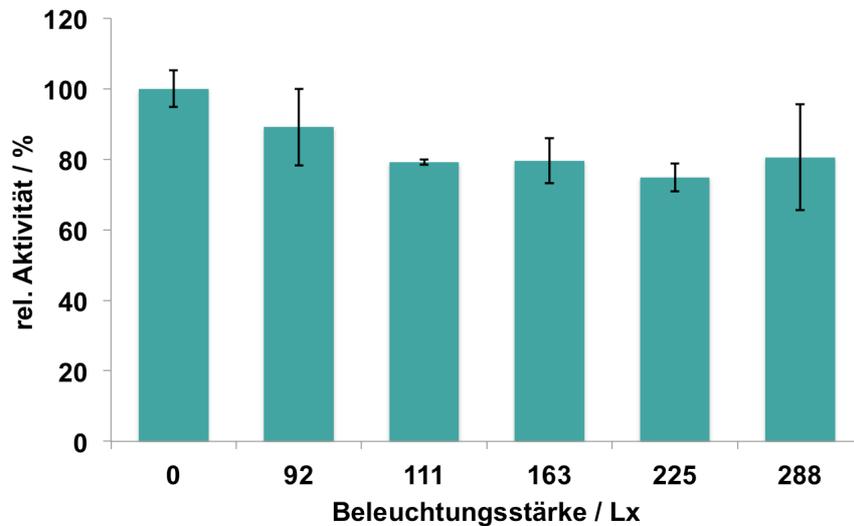


Abbildung 19: Prozentuale relative Aktivität von T7RNAP-WT in Bezug auf 0 Lx in Abhängigkeit zur Beleuchtungsstärke.

Für die Ermittlung möglicher Ursachen der Aktivitätsabnahme auf molekularer Ebene muss man den erfolgten Energieeintrag berücksichtigen. Um diesen zu bestimmen, wurde für die Wellenlänge 470 nm ein Lichtstrom von 68 Lm bei einem Strahlungsfluss von $1 \text{ W}^{[128]}$ angenommen, die auf eine Reaktionsfläche von $0,5 \text{ cm}^2$ einwirken. Letztere errechnet sich aus dem eingesetzten Gesamtvolumen von $25 \mu\text{L}$ des Transkriptionsansatzes und der Füllhöhe innerhalb des Reaktionsgefäßes von $1,5 \text{ mm}$. Bei einer Beleuchtungsstärke von 92 Lx ergibt sich daraus:

$$\begin{aligned}
 92 \text{ Lx} &= 92 \text{ Lm m}^{-2} \\
 &= 92 / 68 \text{ W m}^{-2} \text{ (bei einer Wellenlänge von 470 nm)} \\
 &= \underline{1,35 \text{ W m}^{-2}} = 1,35 \text{ J s}^{-1} \text{ m}^{-2}
 \end{aligned}$$

Auf eine Reaktionsfläche von $0,5 \text{ cm}^2$ wirkt demnach innerhalb von 1 h eine Energie von 244 mJ ein. Die Energieberechnung für weitere Beleuchtungsstärken wurde identisch durchgeführt.

Tabelle 23: Relative Aktivität von T7RNAP-WT unter Beleuchtung bei 470 nm in Abhängigkeit von der Beleuchtungsstärke und der in das System eingebrachten Energie.

Beleuchtungsstärke / Lx	Energie / W m ⁻²	Energie / mJ h ⁻¹	relative Aktivität bezogen auf 0 Lx / %
0	0	0	100 ± 5
92	1,35	244	89 ± 11
111	1,63	294	79 ± 1
163	2,40	431	80 ± 6
225	3,31	596	75 ± 4
288	4,24	762	81 ± 15

Aus den in **Abbildung 19** und **Tabelle 23** aufgeführten Daten ist zu erkennen, dass die Aktivität von T7RNAP-WT durch Beleuchtung mit blauem Licht (470 nm) maximal auf ca. 80 % des Ausgangswertes absinkt.

Die auftretende Aktivitätsabnahme bis zu ca. 20 % kann durch molekulare und strukturelle Veränderungen der Reaktionskomponenten in Folge der Bestrahlung hervorgerufen werden. Im Fall der Polymerase ist eine lichtabhängige Entfaltung, Ausbildung von Aggregaten (Dimeren, Multimeren) oder Fragmentierung möglich^[126].

Eine energieabhängige Veränderung der Wechselwirkungen zwischen Template-DNA und Protein, Template-DNA und Substratnukleotiden oder Protein und Substratnukleotiden kann die Transkriptionsrate ebenfalls verringern.

Ab ca. 111 Lx bleibt die Polymeraseaktivität trotz steigender Beleuchtungsstärke beziehungsweise eingebrachter Energie annähernd konstant. Eine Abhängigkeit der enzymatischen Aktivität von der Beleuchtungsstärke im Bereich von 111 Lx - 288 Lx war somit nicht eindeutig nachweisbar.

4.3. Einfluss des Cofaktors FMN und Licht auf die katalytische Aktivität von T7RNAP-WT

In einer zweiten Versuchsreihe wurde evaluiert, inwiefern FMN, das als Cofaktor in LOV2-Domänen fungiert, Einfluss auf die Lichtsensitivität des T7RNAP-LOV2-Systems ausübt. Dafür wurden Transkriptionsreaktionen mit T7RNAP-WT und äquimolaren Mengen von FMN durchgeführt und mit den unter 4.2 beschriebenen Daten für die Aktivität von T7RNAP-WT ohne FMN verglichen. Dabei wurde analog zur ersten Versuchsreihe die Beleuchtungsstärke variiert (0 Lx, 92 Lx, 111 Lx und 163 Lx). Die erhaltenen Daten sind in **Tabelle 24** und **Abbildung 20** zusammengefasst.

Tabelle 24: Relative Aktivität von T7RNAP-WT unter Beleuchtung bei 470 nm in Abhängigkeit von der Beleuchtungsstärke und der An- oder Abwesenheit von FMN.

Beleuchtungsstärke / Lx	Relative Aktivität ohne FMN bezogen auf 0 Lx / %	Relative Aktivität mit FMN bezogen auf 0 Lx / %
0	100 ± 5	100 ± 8
92	89 ± 11	89 ± 10
111	79 ± 1	81 ± 7
163	80 ± 6	80 ± 2

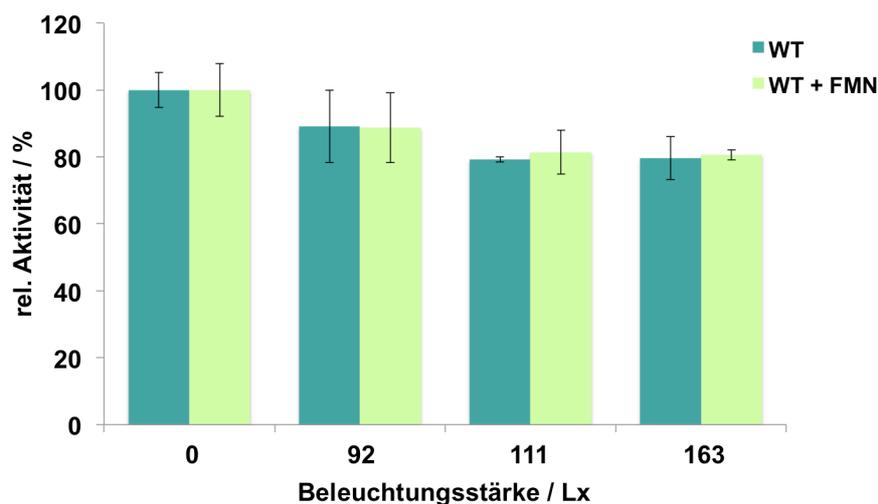


Abbildung 20: Prozentuale relative Aktivität von T7RNAP-WT in Abwesenheit von FMN (grün) und in Anwesenheit von FMN (hellgrün) in Bezug auf 0 Lx in Abhängigkeit zur Beleuchtungsstärke bei einer Wellenlänge von 470 nm.

Der Vergleich der in **Abbildung 20** dargestellten Daten zeigt, dass, mit einer Differenz der prozentualen relativen Transkriptionsaktivität von ca. 0 % mit und ohne Zugabe von FMN, keine weitreichende Änderung der enzymatischen Aktivität der Polymerase durch das Chromophor folgt. Die relativen Polymeraseaktivität bei 0 Lx, 92 Lx, 111 Lx und 163 Lx mit dem Cofaktor entspricht annähernd der ermittelten Aktivität ohne Anwesenheit von FMN in der Reaktion.

Zusammenfassend ergibt sich, dass der Zusatz von FMN weder Auswirkungen auf die Aktivität des Enzyms T7RNAP-WT, noch auf die durch Beleuchtung hervorgerufene lichtabhängige Verringerung von dessen Transkriptionsaktivität, zeigt, was die Verwendung von LOV2 als lichtschaaltbare Domäne im System T7RNAP-LOV2 ermöglicht.

4.4. Designvorbild Natur - T7RNAP-LOV2-Konstrukte der 1. Generation

In der Natur vorkommende photoschaltbare Proteine tragen die lichtensitive Domäne (Sensor) N- oder C-terminal fusioniert mit dem jeweiligen enzymatischen Effektor.^[3] Zunächst wurden daher vorhandene Konstrukte JB1, PD5 und PD6 (J. Benninghoff, P. Dollinger; S. Brakmann; 2011, unveröffentlicht) betrachtet, die auf diesem natürlichen Designvorbild basieren.

Die Idee für das N-terminale Fusionskonstrukt JB1 (J. Benninghoff, S. Brakmann; 2011, unveröffentlicht) bestand in der Substitution der N-terminalen, helikalen Struktur der T7RNAP (Met1-Ser43) durch die C-terminale α -Helix (25 Aminosäuren) der LOV2-Domäne aus NPH1-1 (*nonphototrophic hypocotyl*; Uniprot: O49003). Da diese möglichst exakt den Platz der C1-Helix der Polymerase (Tyr28-His41)^[76] einnehmen sollte, wurde die α -Helix um 9 Aminosäuren (Asn538-Leu544) gekürzt.

Für die Konstruktion C-terminaler LOV2-T7RNAP-Fusionsproteine wurden die Polymerase-Varianten PD5 und PD6 erzeugt (P. Dollinger, S. Brakmann; 2011, unveröffentlicht). Bei diesen wurde eine Insertion an der Position Ala866 nahe des C-Terminus der Polymerase durchgeführt, wobei im Falle der Variante PD5 zusätzlich die Reste Lys867-Leu876 deletiert wurden (siehe **Abbildung 21**). Die direkte Fusion von LOV2 mit dem C-Terminus (Ala883) wurde ausgeschlossen, da dieser im Elongationskomplex (EC) nicht oberflächenexponiert vorliegt und durch seine Dynamik und die Nähe zu den hochkonservierten Aminosäuren Asp812 und Asp537 sowie den katalytisch wirksamen Magnesiumionen zur Ausbildung des aktiven Zentrums der Polymerase beiträgt.^[83]

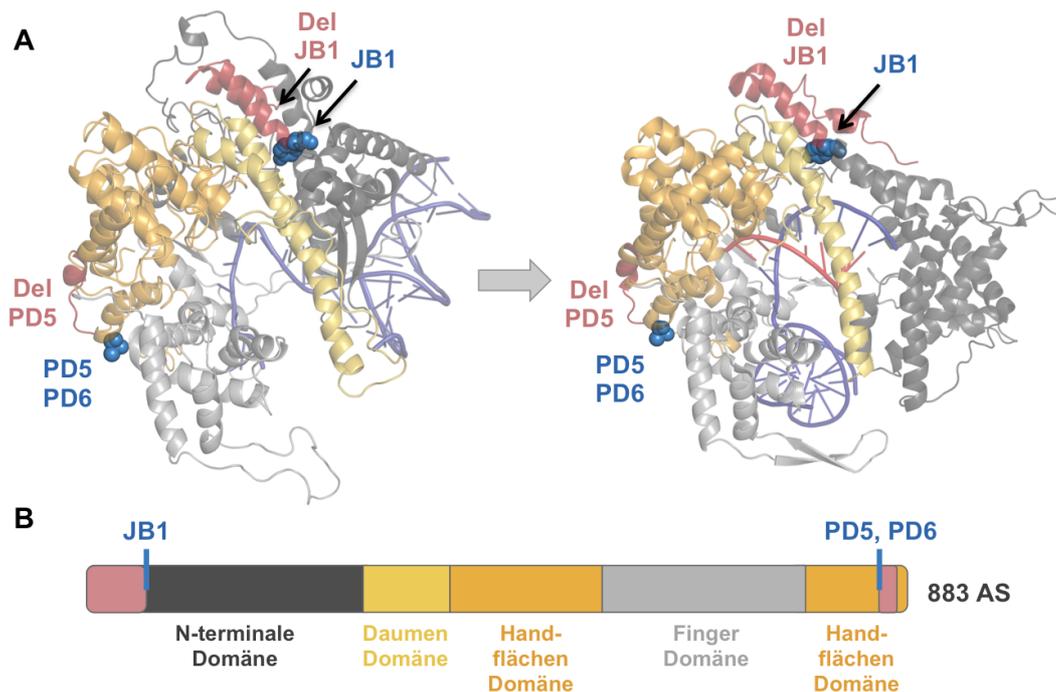


Abbildung 21: (A) Insertionsposition von LOV2 (blau) in den Varianten JB1, PD5 und PD6 sowie die damit verbundenen Deletionen (hellrot) innerhalb des Initiationskomplexes (IC links; PDB: 2PI4^[73]) und Elongationskomplexes (EC rechts; PDB: 1H38^[74]) von T7RNAP-WT. Dunkelblau, DNA; rot, RNA. (B) Schematische Darstellung der Domänen-Anordnung in T7RNAP-WT und Lage der Insertionspositionen JB1, PD5 und PD6 von LOV2 (blau); Hellrot, Deletionen.

4.4.1. Polymeraseaktivität der Varianten JB1, PD5 und PD6

Wie Vorarbeiten gezeigt hatten, führte die Fusion von LOV2 am N-Terminus der Polymerase zu einem inaktiven Protein (J. Benninghoff, S. Brakmann; 2011, unveröffentlicht). Als Ursache wurde vermutet, dass die gewählte Fusionsposition (Tyr44) weder im Initiationskomplex (PDB: 2PI4^[73]) noch im Elongationskomplex der T7RNAP (PDB: 1H38^[74]) oberflächennah vorliegt und die dadurch hervorgerufenen Änderungen von intramolekularen Abständen, z. B. zur Promotor-bindenden Region (PDB; Pro72-Arg150, Leu191-Met267^[76]), oder Beweglichkeiten stärkeren Einfluss besitzen als zunächst angenommen.

Die Aktivitäten der Varianten PD5 und PD6 wurden im Rahmen dieser Arbeit mittels *in-vitro*-Transkription und Analyse der Transkripte durch Agarose-Gelelektrophorese untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass auch für diese beiden Proteine weder ohne noch mit Beleuchtung eine enzymatische Aktivität nachweisbar war.

Da aber die basale Transkriptionsaktivität durch die starke Veränderung des Proteins um mehrere Größenordnungen gegenüber der Aktivität des unveränderten Enzyms abnehmen kann und zudem die Nachweisgrenze für RNA mit Ethidiumbromid bei ca. 50 ng liegt,^[129] wurde dieses Ergebnis mit einem fluoreszenzbasierten Aktivitätsassay überprüft. Das hierfür

verwendete Molecular Beacon bestand aus einer 57 nt langen DNA-Matrize, die sowohl einen T7-Promotor als auch eine Haarnadelschleife ausbildete und im Bereich des Haarnadelstamms mit den Fluoreszenzfarbstoffen TAMRA und Dabcyl substituiert war. Durch Bindung von T7RNAP an den Promotor kann eine Transkription erfolgen, durch die die Interaktion von TAMRA und Dabcyl unterbrochen wird und nach Anregung bei einer Wellenlänge von $\lambda = 530 \text{ nm}$ zum Auftreten einer Fluoreszenz bei $\lambda = 590 \text{ nm}$ führt (siehe **Abbildung 22**). Diese Fluoreszenz konnte zeitabhängig verfolgt werden.

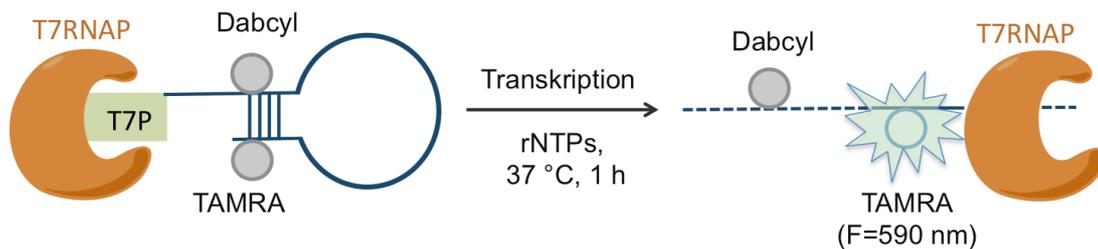


Abbildung 22: Schematische Darstellung der *in-vitro*-Transkriptionsreaktion mittels Molecular Beacon.

Die Ergebnisse dieser Messungen für Transkriptionsreaktionen mit T7RNAP-WT, PD5 und PD6 sind in **Abbildung 23** dargestellt.

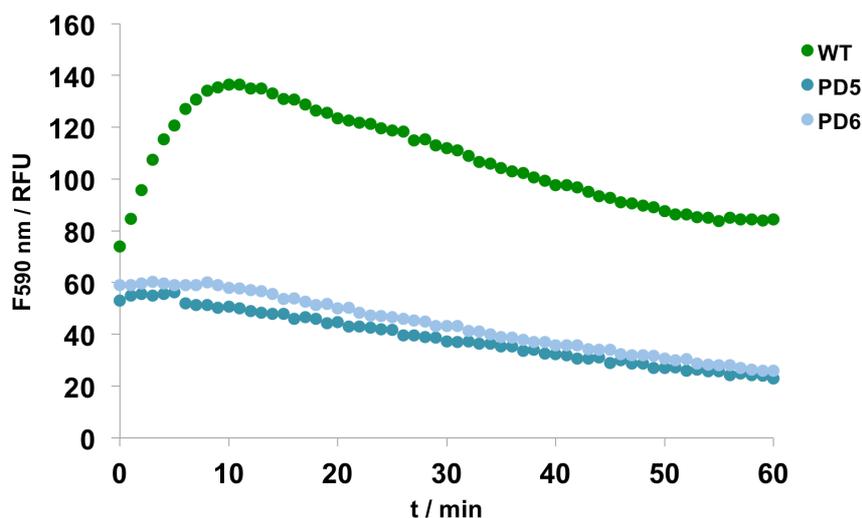


Abbildung 23: *In-vitro*-Aktivitätsbestimmung von T7RNAP-WT, PD5 und PD6 mittels Molecular Beacon durch zeitabhängige Messung der relativen Fluoreszenzeinheiten (RFU) bei einer Wellenlänge von 590 nm und Anregung bei 530 nm.

Es fällt auf, dass die Fluoreszenzmessungen einen zweiphasigen Verlauf aufweisen: Während in einer ersten Phase ($t = 0-10$ min) die Fluoreszenz steigt (T7RNAP-WT) oder konstant bleibt (PD5 und PD6), fällt sie in einer zweiten Phase ($t = 10-60$ min) ab. Letzteres ist auf das Bleichen des verwendeten Farbstoffs TAMRA zurückzuführen.^[130] Der für T7RNAP-WT beobachtbare Anstieg der Fluoreszenz ($\Delta(F_{590\text{ nm}}) = 62$ RFU) zeigt, dass die Sekundärstruktur des Molecular Beacons in Folge einer Transkriptionsreaktion linearisiert wird. Das Referenzprotein T7RNAP-WT liegt demnach in aktiver Konformation vor.

Im Gegensatz dazu bleibt die Fluoreszenz im Falle der LOV2-Varianten PD5 und PD6 bis zu einer Reaktionszeit von $t = 10$ min unverändert, gefolgt von einer durchschnittlichen Abnahme von $\Delta(F_{590\text{ nm}}) = 30$ RFU was auf eine nicht vollständig ausgebildete Sekundärstruktur des Molecular Beacons hinweist. Dies kann auf eine Interaktion dessen mit den T7RNAP-LOV2 Konstrukten basieren. Eine enzymatische Aktivität konnte jedoch für keine der Varianten festgestellt werden.

Die Insertion von LOV2 nach dem Aminosäurerest Ala866 ist demnach nicht für die Erzeugung einer photoschaltbaren T7RNAP geeignet.

4.5. Computerbasiertes Design von T7RNAP-LOV2

Da keines der zuvor untersuchten Konstrukte (JB1, PD5, PD6) eine katalytische Aktivität aufwies, wurde ein computerbasierter Ansatz genutzt, um eine geeignete Insertionsposition für LOV2 zu identifizieren.

In vorangegangenen Untersuchungen wurde dazu das Programm SCHEMA^[131] verwendet, das auf der Rekombination homologer Sequenzen unter Verwendung des Algorithmus RASPP^[132] basiert. Vergleichbar mit dem Prinzip des Sequenzüberlapp nach Ostermeier *et al.*,^[39,133] sollten somit Abschnitte innerhalb der Primärstruktur von T7RNAP bestimmt werden, die eine Insertion der LOV2-Domäne ermöglichen. Aufgrund der geringen Sequenzhomologie von < 40 % der T7RNAP und LOV2, konnten jedoch keine entsprechenden Positionen innerhalb der Polymerase berechnet werden (S. Baluch geb. Seifert, S. Brakmann; 2015, unveröffentlicht).

4.6. Rationales Design - T7RNAP-LOV2-Konstrukt der 2. Generation

Da weder durch eine Imitation des natürlichen Konzepts (terminale Fusion) noch durch einen computerbasierten Ansatz geeignete Kombinationen mit LOV2 ermittelt werden konnten, die zu einem aktiven T7RNAP-LOV2-Protein führten, wurde im nächsten Schritt eine intramolekulare Fusion (Insertion) von LOV2 in Betracht gezogen. Für deren Konstruktion wurden strukturelle Kriterien auf der Basis der verfügbaren Kristallstrukturanalysen von T7RNAP (PDB: 2PI4^[73] und PDB: 1H38^[74]; S. Baluch geb. Seifert, S. Brakmann; 2015, unveröffentlicht) herangezogen.

Die AsLOV2-Domäne weist mit einem Molekulargewicht von ca. 15 kDa sowie der globulären Struktur einen entsprechenden Platzbedarf auf. Daher sollten mögliche Insertionspositionen so gewählt werden, dass sich die LOV2-Domäne sowohl im IC als auch im EC auf der Oberfläche der T7RNAP befindet und dabei vorhandene Sekundärstrukturen der Polymerase möglichst erhalten bleiben. Das Ziel war, durch geringe Änderungen an der Gesamtstruktur der Polymerase, deren katalytische Aktivität zu erhalten, aber durch Einfluss auf intramolekulare Abstände und Faltungsdynamik eine Lichtabhängigkeit zu erreichen. Durch visuelle Untersuchung der T7RNAP-Strukturen 2PI4^[73] und 1H38^[74] mithilfe der Software Pymol^[121], wurden dazu zunächst mögliche Insertionspositionen ermittelt, die folgende Kriterien erfüllten:

- Aminosäuren dürfen ausschließlich ungeordnet (*random coil*) und oberflächenexponiert vorliegen.
- Ungeordnete Abschnitte sollten, aufgrund des Abstandes von 16,6 Å zwischen C- und N-Terminus der LOV2-Domäne (PDB: 2V1A^[120]), eine Länge von ≥ 5 AS-Resten (≥ 20 Å^[134]) aufweisen.
- Entsprechende Aminosäurereste wechselwirken nicht mit der Template-DNA, dem Substrat (rNTPs), der RNA und den Magnesium-Ionen des aktiven Zentrums.

Diese Eigenschaften waren an/von der Insertionsposition His346/Cys347 gegeben und somit konnte T7RNAP-SB1 als erste Polymerase-Variante mit einer insertierten LOV2-Domäne generiert werden (siehe **Abbildung 24**; S. Baluch geb. Seifert, S. Brakmann; 2015, unveröffentlicht).

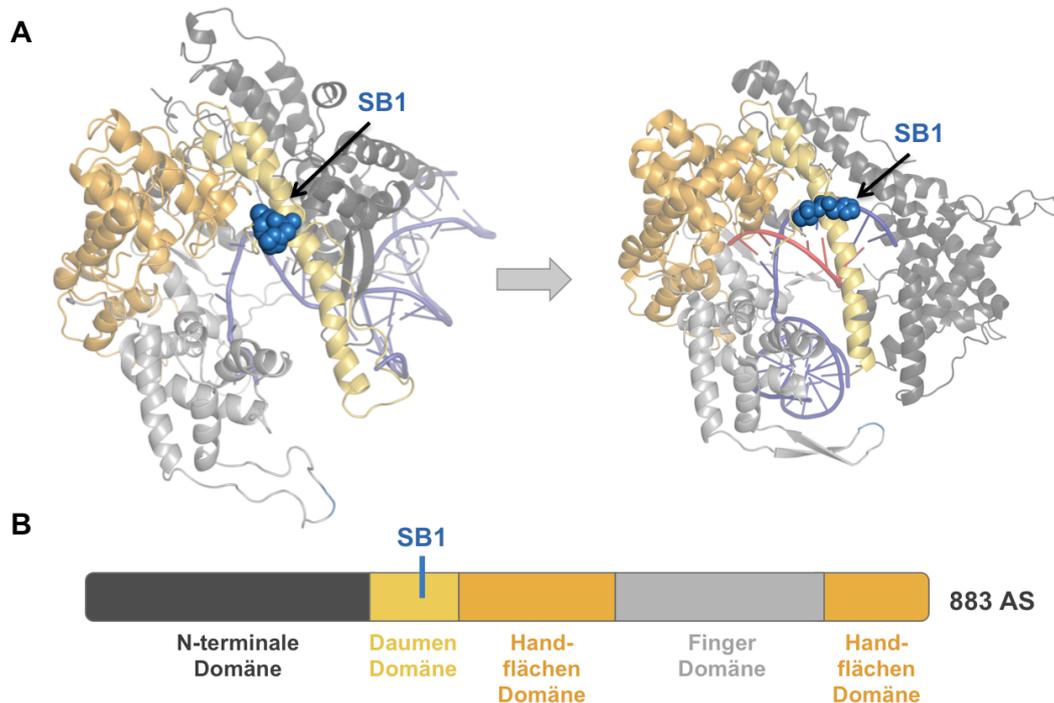


Abbildung 24: (A) Insertionsposition SB1 von LOV2 (blau) innerhalb des Initiations- (IC links; PDB: 2PI4^[73]) und Elongationskomplexes (EC rechts; PDB: 1H38^[74]) von T7RNAP-WT inklusive DNA (dunkelblau) und RNA (rot). (B) Schematisch Darstellung der Domänen-Anordnung in T7RNAP-WT sowie der Insertionsposition SB1 von LOV2.

Die Lichtschaltbarkeit der Polymerase SB1 sollte durch minimale Konformationsänderungen nahe des aktiven Zentrums hervorgerufen werden. Dabei wurde, ausgehend von der Dissoziation der α -Helix vom Kern der LOV2-Domäne, eine Umordnung der auf Cys347 folgenden (ungeordneten) Aminosäurereste der Daumen-Domäne (Asn324-His411)^[75] erwartet (siehe **Abbildung 25**). Diese bildet mit der N-terminalen-Domäne den RNA-Ausgangstunnel^[135] und stabilisiert den Elongationskomplex der T7RNAP während der Transkription.^[76,136,137]

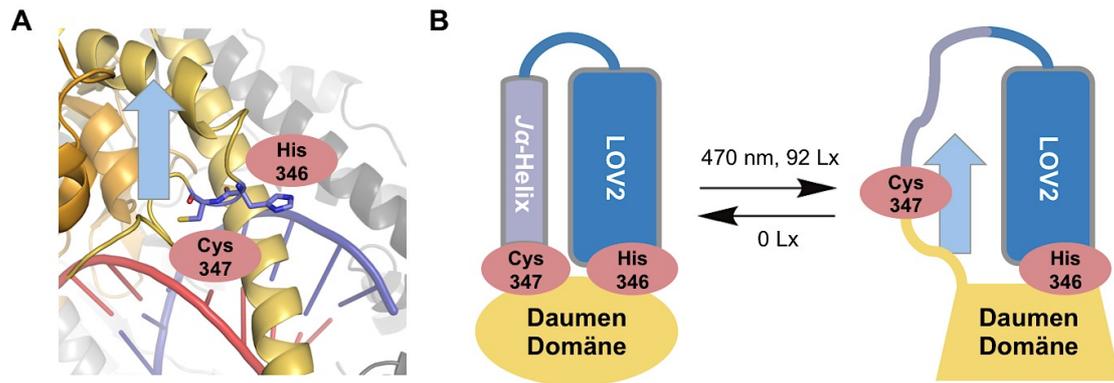


Abbildung 25: (A) Insertionsposition His346/Cys347 innerhalb der T7RNAP (PDB: 1H38^[74]). (B) Schematische Darstellung der (hypothetischen) strukturellen Veränderungen durch Photoanregung (92 Lx, 470 nm).

4.6.1. Lichtabhängige Polymeraseaktivität von SB1

Die Aktivität der Variante SB1 wurde zunächst – analog zu den Varianten PD5 und PD6 – mittels *in-vitro*-Transkription und Analyse der Transkripte durch Agarose-Gelelektrophorese untersucht. Es zeigte sich, dass auch für dieses Protein weder ohne noch mit Beleuchtung eine enzymatische Aktivität nachweisbar war (S. Baluch, S. Brakmann; 2015, unveröffentlicht). Wie zuvor wurde auch dieses Ergebnis durch das fluoreszenzbasierte Molecular-Beacon-Assay überprüft (siehe **Abbildung 26**).

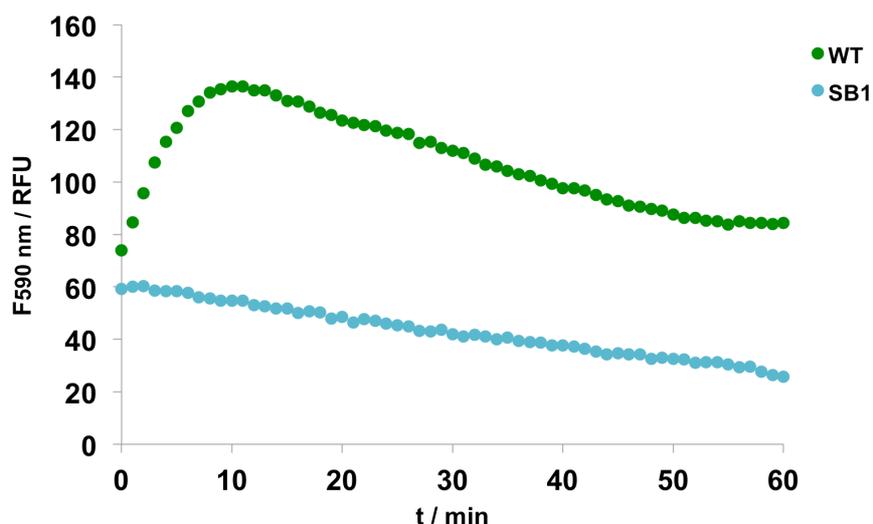


Abbildung 26: *In-vitro*-Aktivitätsbestimmung von SB1 mittels Molecular Beacon durch zeitabhängige Messung der relativen Fluoreszenz-Einheiten (RFU) bei einer Wellenlänge von 590 nm und Anregung bei 530 nm.

Wie schon für die Varianten PD5 und PD6, wurde auch für SB1 ein deutlicher Unterschied zum Kurvenverlauf von T7RNAP-WT beobachtet. Die aktive Polymerase WT zeigt im Zeitraum $t = 0-10$ min aufgrund der Linearisierung des Molecular Beacons, einen Anstieg der Fluoreszenz von $\Delta(F_{590\text{ nm}}) = 62$ RFU, gefolgt von einer Fluoreszenzabnahme ($\Delta(F_{590\text{ nm}}) = 54$ RFU; $t = 10-60$ min), die auf Photobleichen des verwendeten Farbstoffes TAMRA zurückzuführen ist.^[130] Für SB1 konnte dagegen eine stetige Abnahme von $F_{590\text{ nm}}$ von $\Delta(F_{590\text{ nm}}) = 33$ RFU über den gesamten Reaktionszeitraum festgestellt werden. In diesem Fall ist das Reportermolekül TAMRA z.T. zugänglich, was auf eine Wechselwirkung des Molecular Beacons mit SB1 hinweisen kann. Die enzymatische Aktivität dieser Variante ist jedoch nicht nachweisbar.

Die Insertion der LOV2-Domäne zwischen Cys347 und His348 der Polymerase ist für die Generierung einer lichtschtaltbaren T7RNAP-LOV2 daher nicht geeignet.

4.7. *Split-Design* - T7RNAP-LOV2-Konstrukte der 3. Generation

In der Molekularbiologie werden häufig Enzyme genutzt, die an bestimmten Positionen in Fragmente spaltbar sind und *in vivo* wie *in vitro* zu funktionalem Protein voller Länge reassoziieren können. Bekannte Beispiele sind unter Anderem Reporterproteine wie GFP^[105], Luciferase^[106] und β -Lactamase^[107]

Dass diese Eigenschaft auch auf die T7RNAP zutrifft, wurde eher zufällig während der Entwicklung eines Reinigungsverfahrens für diese gefunden^[68,103,138], jedoch nicht weiter untersucht. Erst drei Dekaden später wurde das „*splitting*“ in Fragmente und Reassoziieren in Form des aktiven Enzyms näher analysiert sowie enthaltene *Split*-Positionen identifiziert.^[139,140]

Zudem konnte gezeigt werden, dass, durch C- bzw. N-terminale Fusion homodimerisierender Proteindomänen mit den spezifischen T7RNAP-*Split*-Fragmenten, aktive (regulierbare) Proteinkonstrukte erhalten werden können.^[108,109]

Da die fusionierten Domänen ebenfalls einen spezifischen Konformationsraum beanspruchen, diente dieses Zwei-Fragment-System als Basis zur Generierung des Ein-Fragment-Systems T7RNAP-LOV2, bei dem die spezifischen *Split*-Positionen der Insertion der Sensordomäne dienen. Die Lichtschaltbarkeit der Konstrukte der 3. Generation (SB2-SB5) sollte hier, wie auch bei den vorherigen Polymerasevarianten durch eine Konformationsänderung des Effektors durch Dissoziation und Entfaltung der J α -Helix des Sensors LOV2 erfolgen.

Die Reassoziation der aus einer Spaltung resultierenden Fragmente (C- und N-terminales Fragment) kann durch Fusion mit dimerisierenden Proteindomänen wie z. B. VVD oder Mag begünstigt beziehungsweise reguliert werden.^[108,109]

Die Idee für das hier bearbeitete Projekt war, die bimolekulare Assoziation durch eine monomolekulare Reaktion zu ersetzen, die durch Insertion einer AsLOV2-Domäne an den bekannten *Split*-Positionen ermöglicht werden sollte. Auf diese Weise sollte gleichzeitig die Aktivität des Proteins erhalten und eine Lichtschaltbarkeit erreicht werden (siehe **Abbildung 27**).

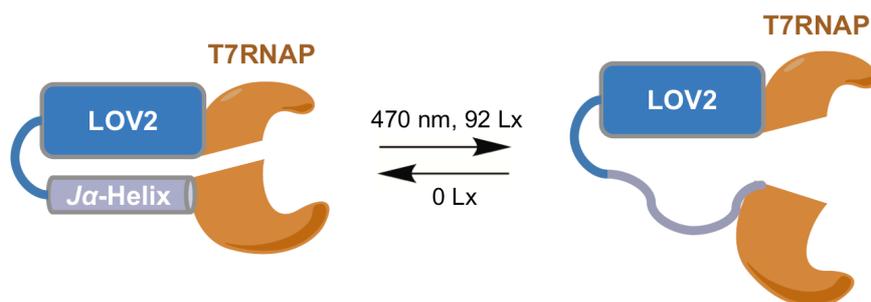


Abbildung 27: Schematische Darstellung einer Konformationsänderung der T7RNAP (orange) durch eine insertierte LOV2-Domäne (blau) bei Bestrahlung mit blauem Licht.

4.7.1. Strukturanalyse der Insertionspositionen für SB2-SB5

Für die Generierung der T7RNAP-LOV2-Konstrukte der 3. Generation (SB2-SB5) wurden insgesamt vier *Split*-Positionen für die Insertion der AsLOV2-Domäne ausgewählt: Asp67/Asn68, Lys179/Lys180, Glu600/Asn601 und Ser564/Glu565. Deren Zuordnung zu Domänen der Polymerase sowie Oberflächenexposition sind **Tabelle 25** und **Abbildung 28** zusammengefasst.

Tabelle 25: Insertionsposition von LOV2 in T7RNAP für die Konstrukte SB2-SB5.

T7RNAP-LOV2 Konstrukt	Insertionsposition in T7RNAP / AS	T7RNAP-Domäne	oberflächen-exponiert (IC/EC)
SB2	Asp67/Asn68	N-Terminus	+ / -
SB3	Lys179/Lys180	N-Terminus	+ / -
SB4	Glu600/Asn601	Finger	+ / +
SB5	Ser564/Glu565	Finger	+ / +

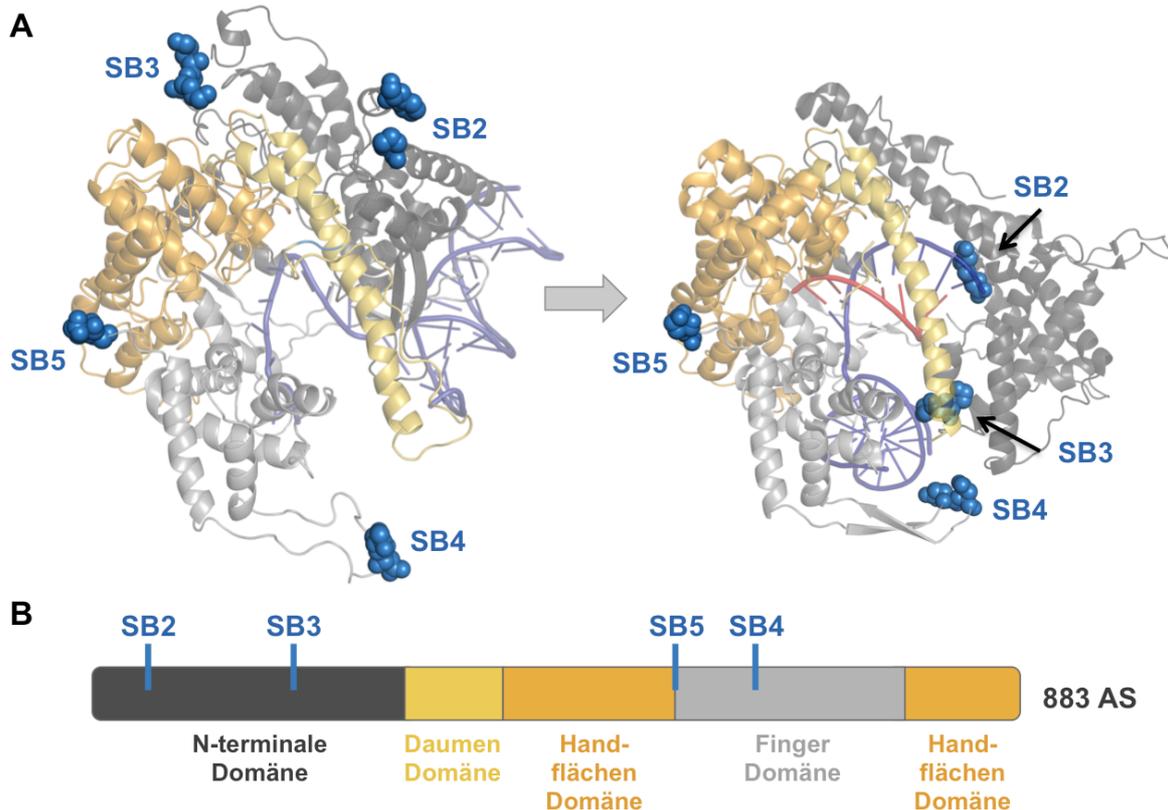


Abbildung 28: (A) Insertionspositionen der T7RNAP-Varianten SB2-SB5 von LOV2 (blau) im Initiations- (IC links; PDB: 2PI4^[73]) und Elongationskomplex (EC rechts; PDB: 1H38^[74]). DNA (dunkelblau) und RNA (rot). (B) Schematisch Darstellung der Domänen-Anordnung in T7RNAP-WT sowie der Insertionspositionen SB2-SB5 von LOV2.

Die gewählten Positionen für die Varianten SB2-SB5 befinden sich im IC, wie auch für das rationale Design vorausgesetzt, in oberflächenexponierten, ungeordneten Sekundärstrukturelementen der T7RNAP. Es wurde daher erwartet, dass die Insertion der globulären Dunkel-Konformation der LOV2-Domäne nur einen geringen Einfluss auf die Bindung an den T7-Promotor und die Initiation der Transkription ausübt. Im EC befinden sich die Insertionspositionen der Konstrukte SB2 (Asp68/Asn69) und SB3 (Lys179/Lys180) durch die Umfaltung des N-Terminus dagegen nicht mehr an der Proteinoberfläche. Dadurch kann eine hier insertierte LOV-Domäne sowohl die Umfaltung vom IC zum EC der Polymerase stören als auch die Lage und Ausbildung benachbarter Sekundärstrukturelemente verändern. Beide Einflüsse könnten die Aktivität der jeweiligen Variante gegenüber dem Wildtypenzym beeinflussen. Zusätzlicher Einfluss ist durch eine Dissoziation der $J\alpha$ -Helix von der LOV-Kerndomäne zu erwarten. Im Falle der Varianten SB4 (Glu600/Asn601) und SB5 (Ser564/Glu565) liegen die Insertionspositionen sowohl im IC als auch im EC oberflächenexponiert vor und sollten somit ausreichend Raum für das Einbringen der Sensordomäne bieten.

Im Gegensatz zu SB5 könnte sich die Insertionsstelle für das Konstrukt SB4 beim Übergang in den EC, durch Ausbildung einer im Raum weniger beweglichen β -Faltblatt Struktur (Glu592 - Tyr598, Ile605 - Val609), in Richtung des aktiven Zentrums verschieben.

Zudem kann es durch die Umordnung der N-terminalen Domäne, ebenfalls zu einer Delokalisierung der Template-DNA kommen, die sich infolgedessen in Richtung der Finger Domäne ausrichtet.

Das Einbringen von LOV2 könnte demnach zu Interaktionen zwischen Sensor und Template-DNA führen, die durch die Dissoziation der $J\alpha$ -Helix und den dadurch benötigten zusätzlichen Konformationsraum verstärkt auftreten können. Aufgrund dieser Wechselwirkung kann es zu einer nicht nativen Delokalisierung der Template-DNA innerhalb des EC kommen, die eine verminderte katalytische Aktivität hervorrufen kann. Ebenso könnte die Insertion des Sensors zwischen Glu600 und Asn601 die Ausbildung des antiparallelen β -Faltblatts (Glu592 - Tyr598, Ile605 - Val609) beeinträchtigen und somit die ungeordnete Struktur dieser Reste erhalten. Dies würde wiederum den benachbarten Austrittstunnel der Template-DNA vergrößern, was eine Aktivitätssteigerung bewirken kann. Auch dieser Effekt würde durch Photoanregung und die damit verbundene Konformationsänderung des Sensors verstärkt werden.

Um mögliche Auswirkungen der intramolekularen Insertion von LOV an den gewählten *Split*-Positionen abzuschätzen, wurde deren Abstand zu den hoch konservierten Aminosäureresten Asp537 und Asp812, welche die katalytisch wirksamen Mg^{2+} -Ionen komplexieren^[72,81], betrachtet (siehe **Tabelle 26**). Die Berechnung der entsprechenden Abstände innerhalb des IC (PDB: 2PI4^[73]) und EC (PDB: 1H38^[74]) der Polymerase erfolgte mittels Pymol^[121].

Tabelle 26: Abstände der Insertionspositionen der Konstrukte SB2 - SB5 zu den hoch konservierten Aminosäuren Asp537 und Asp812.

T7RNAP-LOV2 Konstrukt	Abstand zu Asp537 (IC/EC) / Å	Abstand zu Asp812 (IC/EC) / Å
SB2	45/41	45/37
SB3	32/47	32/44
SB4	55/56	55/52
SB5	15/20	20/16

Ein zu geringer Abstand zwischen einer insertierten Domäne und dem aktiven Zentrum der Polymerase (Asp537 und Asp812) könnte die korrekte Faltung des aktiven Zentrums und somit die Aktivität des Effektors beeinflussen, während eine zu groß gewählte Differenz keinen Einfluss auf die Lichtschaltbarkeit zeigen könnte. Das Konstrukt SB5 weist daher einen

Abstand von bis zu 20 Å (Asp537; EC und Asp812; IC) auf, während mit der Variante SB4 ein Abstand von bis zu 56 Å (Asp537; EC) analysiert wird. Das Konstrukt SB2 deckt zudem einen Abstand zum aktiven Zentrum von 37 Å (Asp812; EC) bis zu 45 Å /Asp537; IC und Asp812 IC) ab. Die Auswirkung der Dynamik der Polymerase auf die Aktivität beim Übergang des IC in den EC in Bezug auf die Insertion des Sensors wurde mit Hilfe der Variante SB3 betrachtet. In diesem Fall zeigt sich eine Differenz des Abstandes von Sensor zum aktiven Zentrum des Effektors von bis zu 15 Å (Asp537).

4.7.2. Expression und Reinigung der Varianten SB2 - SB5

Die Expression der Konstrukte der 3. Generation (SB2 - SB5) erfolgte in *E. coli* BL21[pREP4] unter der Verwendung der zuvor mittels QuickChange und RFC klonierten Plasmide pQET7SB2-pQET7SB5. Die zugehörigen Plasmidkarten sowie Aminosäuresequenzen sind im Anhang unter 8.1 und 8.2 zu finden.

Zunächst wurde die Expression des jeweiligen Zielproteins mittels Analyse durch SDS-PAGE betrachtet (siehe **Abbildung 29**).

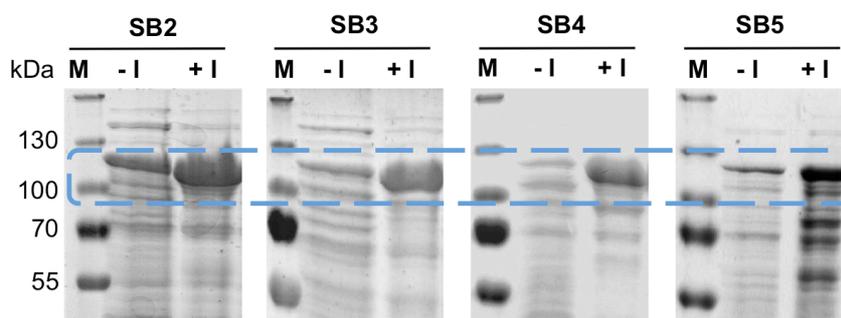


Abbildung 29: SDS-PAGE der heterologen Expression der Varianten SB2-SB5 in BL21[pRep4]. M: PageRuler Plus Prestained Protein Ladder; -I: vor Induktion; + I: nach Induktion.

Wie aus **Abbildung 29** ersichtlich konnte für alle Varianten eine Überexpression des jeweiligen Fusionsproteins T7RNAP-LOV2 (MW = 115 kDa) beobachtet werden. Für die folgenden Aktivitätstests wurden im nächsten Schritt gebundene DNA-Fragmente von der Polymerase getrennt.

Nach der Entfernung von Nukleinsäuren und ersten Verunreinigungen durch PEI- und Ammoniumsulfatfällung wurden die jeweiligen Varianten mithilfe der Ni-NTA-Affinitätschromatographie isoliert. Während für die Variante SB5 kein lösliches Protein erhalten werden konnte, ergab sich für SB2-SB4 eine Ausbeute von durchschnittlich 12 mg/L

Kultur. Die **Abbildung 30** zeigt die gereinigten Polymerasevarianten SB2-SB4 nach Analyse durch SDS-PAGE.

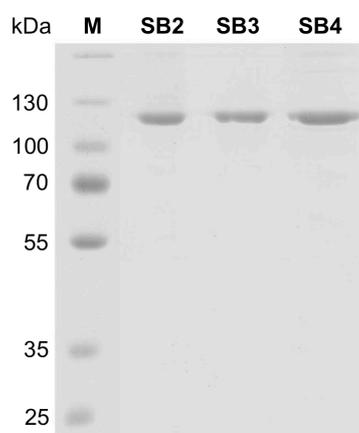


Abbildung 30: SDS-PAGE der vereinigten Eluatfraktionen der Ni-NTA-Affinitätschromatographie der Varianten SB2-SB4. M: *PageRuler Plus Prestained Protein Ladder*.

Die Tatsache, dass SB5 unlöslich anfiel, lässt sich anhand der in **Tabelle 26** aufgeführten Abstände erklären: Die Insertionsposition von LOV2 zwischen Ser564 und Glu565 befindet sich mit einem Abstand von 15 Å - 20 Å dichter am aktiven Zentrum des Enzyms (Asp537, Asp812) als die Insertionspositionen der anderen Varianten (SB2-SB4). Dies kann im Hinblick auf die Konformation der T7RNAP, zu einer geringeren Akzeptanz für eine Insertion an dieser Stelle und somit zu einer Fehlfaltung und geringerer Löslichkeit der Polymerase führen.

Die folgende Bestimmung der (lichtschaltbaren) Polymeraseaktivität erfolgte aufgrund der geringen Löslichkeit des Konstruktes SB5 daher mit den gereinigten Varianten SB2-SB4.

4.7.3. Polymeraseaktivität von SB2 - SB4

Schon geringfügige Änderungen eines Proteins können einen gravierenden Einfluss auf dessen enzymatische Aktivität nehmen. Daher wurde zunächst die katalytische Aktivität der T7RNAP-LOV2 Konstrukte im Vergleich zu T7RNAP-WT untersucht, um herauszufinden, ob diese in aktiver Form vorliegen und eine mit dem WT vergleichbare enzymatische Aktivität aufweisen.

Wie bereits zuvor (siehe 4.2) wurde die relative Aktivität (ohne Belichtung) durch *in-vitro*-Transkription überprüft. Dabei diente T7RNAP-WT als Referenz für die eine Polymeraseaktivität von 100 % angenommen wurde. Die entsprechenden Ergebnisse sind **Abbildung 31** dargestellt.

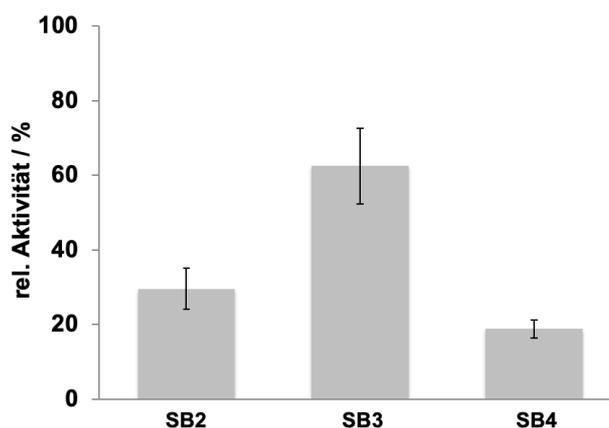


Abbildung 31: Prozentuale relative Aktivität der Varianten SB2-SB4 im Vergleich zu T7RNAP-WT bei einer Beleuchtungsstärke von 0 Lx.

Aus der **Abbildung 31** ist deutlich ersichtlich, dass das Konstrukt SB3 mit 63 % der Aktivität des WT die höchste Transkriptionsaktivität im Vergleich zu den Varianten SB2 (30 %) und SB4 (19 %) aufweist. Demnach hat die Insertion von LOV2 innerhalb der nativen *Split*-Position zwischen Lys179 und Lys180 den geringsten Einfluss auf die katalytische Aktivität der Polymerase, obwohl diese im EC nicht oberflächenexponiert vorliegt und beim Übergang von IC zum EC eine Konformationsänderung innerhalb der Polymerase durchläuft.

Das Konstrukt SB2, das mit der Insertionsstelle des Sensors Asp68/Asn69 ebenfalls in der N-terminalen Domäne des Effektors und im EC ebenso nicht an der Proteinoberfläche lokalisiert ist, zeigt hingegen eine um 33 % geringere WT-Aktivität im Vergleich zu SB3. Im Gegensatz zu SB3, in dem die Insertionsstelle innerhalb der Subdomäne H liegt, befindet sich die LOV2-Domäne dieses Konstruktes nahe der AT-reichen Schleife, die mit dem T7-Promotor wechselwirkt. Die Insertion von LOV2 zwischen Asp68 und Asn69 könnte sich demnach negativ auf die Promotorbindung und somit auf die Transkription auswirken.

Die geringste Aktivität, mit 19 % relativ zum WT, konnte für das Konstrukt SB4 beobachtet werden. Die Position von LOV2 zwischen Glu600 und Asn601 liegt in diesem Konstrukt innerhalb der Finger-Domäne der T7RNAP nahe der Spezifitätsschleife. Diese Subdomäne ist während der Initiation der Transkription für die Sequenzspezifische Promotorbindung verantwortlich^[75]. Demnach kann, wie auch in SB2, eine gestörte Interaktion mit dem T7-Promotor vorliegen, die die Aktivität der Polymerase verringert.

4.7.4. Lichtabhängige Polymeraseaktivität von SB2 - SB4

In 4.7.3 konnte gezeigt werden, dass die Polymerasekonstrukte SB2 - SB4 in aktiver Form exprimiert wurden und, trotz Insertion der LOV2 Domäne mit einem Molekulargewicht von 15 kDa, eine Transkriptionsaktivität von 19 % (SB4) bis 63 % (SB3) im Vergleich zu T7RNAP-WT aufweisen.

Im Folgenden wurde die lichtabhängige enzymatische Aktivität der Polymerase innerhalb der Varianten SB2 - SB4 durch *in-vitro* Transkription bei einer Beleuchtungsstärke von 0 Lx (Dunkelreaktion) und 92 Lx (Lichtreaktion) bei einer Wellenlänge von 470 nm bestimmt. Als Referenz für die enzymatische Aktivität (relative Aktivität = 100 %) diente dabei die jeweils bei 0 Lx generierte GFP-RNA. Die entsprechenden Transkriptionsprodukte wurden mittels Agarosegelelektrophorese analysiert und durch *Image J* quantifiziert.

Die zugehörigen Gelbilder zu jeweils einer Dreifachbestimmung mit den Varianten SB2, SB3 und SB4 sowie eine Übersicht der erhaltenen Daten sind in **Abbildung 32** und **Abbildung 33** zu finden.

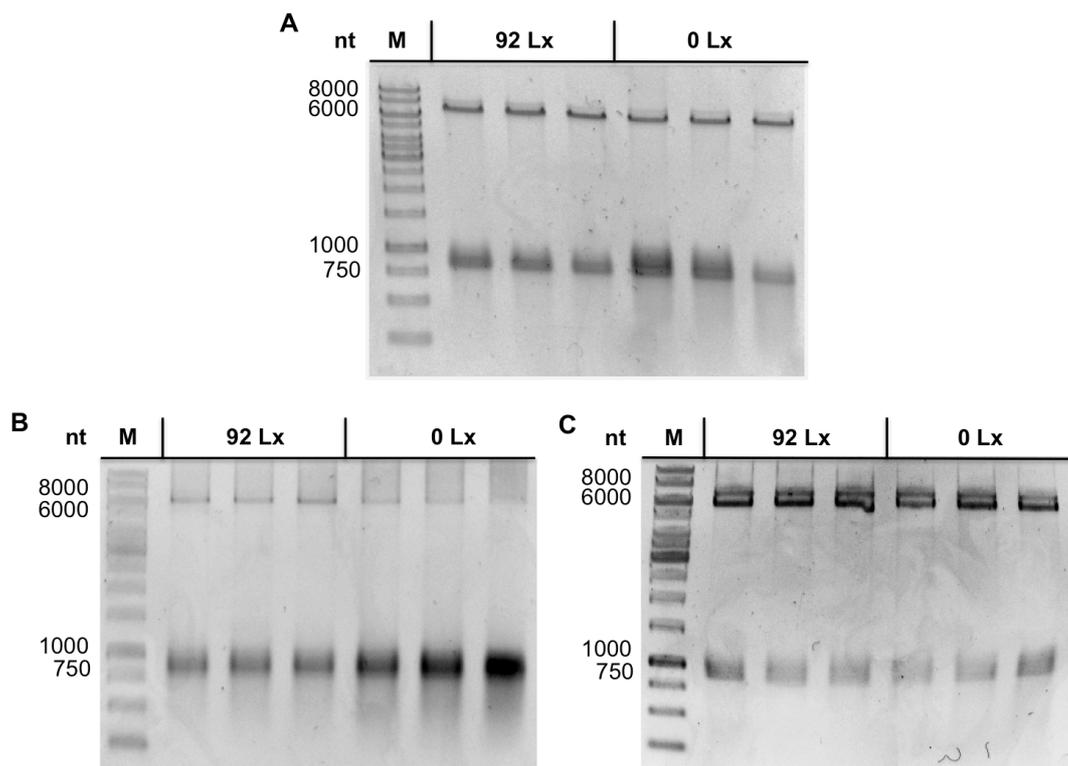


Abbildung 32: Agarosegele der *in-vitro* Transkription von GFP mit A) SB2, B) SB3 und C) SB4 bei einer Beleuchtungsstärke von 92 Lx sowie einer Wellenlänge von 470 nm (Lichtreaktion) und 0 Lx (Dunkelreaktion). M: 1kb *GeneRuler*.

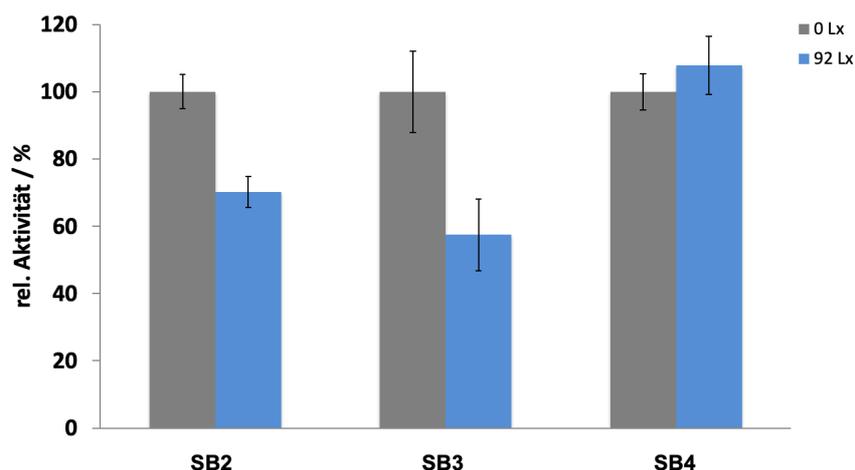


Abbildung 33: Prozentuale relative Aktivität der Varianten SB2-SB4 bei einer Beleuchtungsstärke von 92 Lx und einer Wellenlänge von 470 nm (Lichtreaktion) in Bezug auf 0 Lx (Dunkelreaktion).

Die prozentualen Werte der Polymeraseaktivität zeigen, dass sich die enzymatische Aktivität der Konstrukte SB2 - SB4 durch Bestrahlung mit Licht einer Wellenlänge von 470 nm und einer Beleuchtungsstärke von 92 Lx regulieren lässt. Für SB2 und SB3 konnte dabei eine Reduktion der Aktivität um 30 % bzw. 43 % erreicht werden, während für die Variante SB4 eine um 8 % erhöhte Polymeraseaktivität bestimmt wurde. Somit ist es durch die hier gewählten Insertionspositionen von LOV2 möglich, die katalytische Aktivität des Effektors durch Bestrahlung mit blauem Licht nicht nur zu verringern, sondern diese ebenfalls zu steigern.

Der Unterschied in Bezug auf die lichtabhängige Aktivität der Konstrukte basiert auf der Position des Sensors innerhalb der Polymerasestruktur. Die (lichtabhängige) Konformation des Sensors LOV2 wirkt sich aufgrund der strukturellen und funktionalen Unterschiede der jeweiligen Insertionspositionen verschieden auf dessen Schaltbarkeit aus und es wird ein Zusammenhang zwischen strukturellem Aufbau der Fusionsproteine und (lichtschaltbarer) Polymeraseaktivität deutlich. Daher wurde im Folgenden die Abhängigkeit zwischen Struktur und Aktivität der Varianten SB2 - SB4 näher betrachtet.

4.8. Struktur-Aktivitätsbeziehung von SB2 - SB4

Die Struktur sowie die konservierten Aminosäurereste eines Proteins sind die Grundlage für dessen Aktivität. Daher wurde zunächst der Abstand der Insertionspositionen von LOV2 der Varianten SB2 - SB4 in Bezug auf die hoch konservierten Aminosäurereste Asp537 und Asp812 in Zusammenhang mit deren lichtabhängiger Aktivität betrachtet. (siehe **Tabelle 27**). Die entsprechenden Werte wurden sowohl für den Initiationskomplex (PDB: 2PI4^[73]) als auch den Elongationskomplex der T7RNAP (PDB:1H38^[74]) mithilfe von Pymol^[121] bestimmt.

Tabelle 27: Abstände der Insertionspositionen der Konstrukte SB1 - SB5 zu den konservierten Aminosäuren Asp537 und Asp812 sowie die entsprechende relative enzymatische Aktivität bei 92 Lx.

T7RNAP-LOV2 Konstrukt	Abstand zu Asp537 (IC/EC) / Å	Abstand zu Asp812 (IC/EC) / Å	Rel. Aktivität zu T7RNAP-WT bei 0 Lx/ %	Rel. Aktivität zu 0 Lx bei 92 Lx / %
SB1	28/24	29/27	inaktiv	inaktiv
SB2	45/41	45/37	30 ± 5	70 ± 4
SB3	32/47	32/44	63 ± 10	57 ± 11
SB4	55/56	55/52	19 ± 2	108 ± 9
SB5	15/20	20/16	n.a.*	n.a.*

*unlöslich

Aus den Daten ist ersichtlich, dass sich die enzymatische Aktivität der Polymerase abhängig vom Abstand der LOV2-Domäne zu Asp537 und Asp812 verändert. Ist LOV2 in einem Abstand von < 30 Å zu den konservierten Asp-Reste lokalisiert, wird lediglich unlösliches (SB5, siehe 4.7.2) oder inaktives (SB1, siehe 4.6.1) Protein erhalten. Dies deutet darauf hin, dass der Sensor in diesen Fällen die Faltung der Polymerase stark stört. Die Varianten SB2 und SB3, die eine relative Aktivität von 30 % und 63 % zu T7RNAP-WT (Dunkelzustand, 0 Lx) sowie von 70 % und 57 % Restaktivität bei Bestrahlung mit Licht (Lichtzustand, 92 Lx) zeigen, weisen im Vergleich zu SB1 und SB5 einen größeren Abstand der LOV2-Domäne zu Asp537 und Asp812 auf (32 Å - 47 Å). Auffällig ist, dass dieser Abstand für SB3 beim Übergang vom IC in den EC noch um bis zu 15 Å steigt, während für SB2 eine Verringerung von bis zu 8 Å bestimmt werden kann. Demnach scheint sich ein geringerer Abstand der LOV2-Insertionsposition zum aktiven Zentrum der T7RNAP im IC weniger negativ auf die Polymeraseaktivität auszuwirken als innerhalb des EC.

Im Vergleich dazu ergibt sich für das Konstrukt SB4, mit einer Distanz von > 50 Å zwischen der Position der LOV2-Domäne und dem aktiven Zentrum der Polymerase mit 19 % die

geringste WT-Aktivität gegenüber den Polymerasekonstrukten SB2 und SB3 sowie eine um ca. 8 % erhöhte katalytische Aktivität durch Belichtung.

Basierend auf den ermittelten Abständen und (lichtschaltbaren) Aktivitäten der untersuchten Varianten, lässt sich ein Schalenmodell für T7RNAP erstellen, das den Zusammenhang zwischen Effektoraktivität und Distanz zu den Resten Asp537 und Asp812 im IC sowie im EC zusätzlich verdeutlicht (siehe **Abbildung 34**).

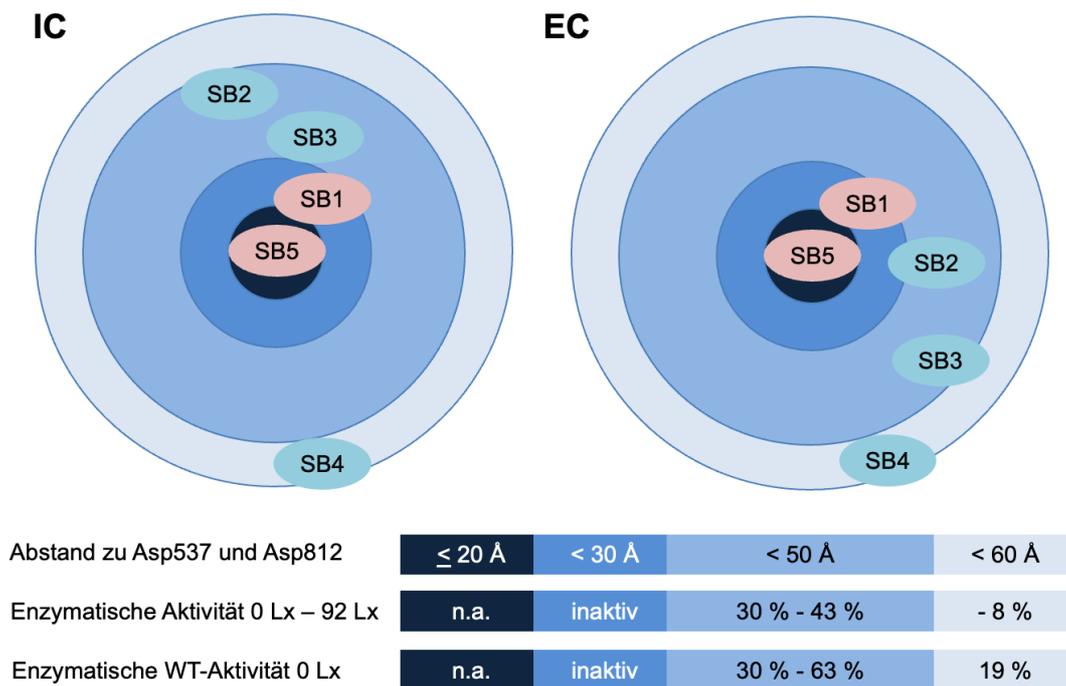


Abbildung 34: Hypothetisches Schalenmodell der T7RNAP (IC und EC) und Lage der Insertionspositionen für LOV2 für die Varianten SB1 - SB5.

In **Abbildung 34** ist deutlich sichtbar, dass sich für die hier betrachteten Konstrukte SB1 - SB5 ein optimaler Abstand zu den katalytisch wirksamen Asp-Resten von $30 \text{ \AA} < 50 \text{ \AA}$ ergibt, der den Polymerasevarianten SB2 und SB3 entspricht. Unterhalb dieses Abstandes ($< 30 \text{ \AA}$) lässt sich hingegen keine Aktivität beobachten (SB1) bzw. lediglich unlösliches Protein (SB5) erhalten. Für Insertionspositionen innerhalb der äußersten Schale ($< 60 \text{ \AA}$; SB4) wird die geringste Effektoraktivität im Vergleich zu T7RNAP-WT sowie, statt einer Herabsetzung, ein Anstieg von 8 % Polymeraseaktivität mit Bestrahlung von 92 Lx beobachtet.

Der strukturelle Einfluss der Insertion von LOV2 innerhalb der unterschiedlichen Positionen der T7RNAP (SB2, SB3 und SB4) auf die zuvor ermittelte Polymerase-Aktivität wurde

zusätzlich durch Modellierung mittels SWISS MODEL^[141–145] untersucht. Als Template dienten dabei der EC von T7RNAP (PDB: 1H38^[74]) sowie die Dunkelstruktur von LOV2 (PDB: 2V1A^[57]). Die entsprechenden Modelle wurden mittels Pymol visualisiert (siehe **Abbildung 35**).

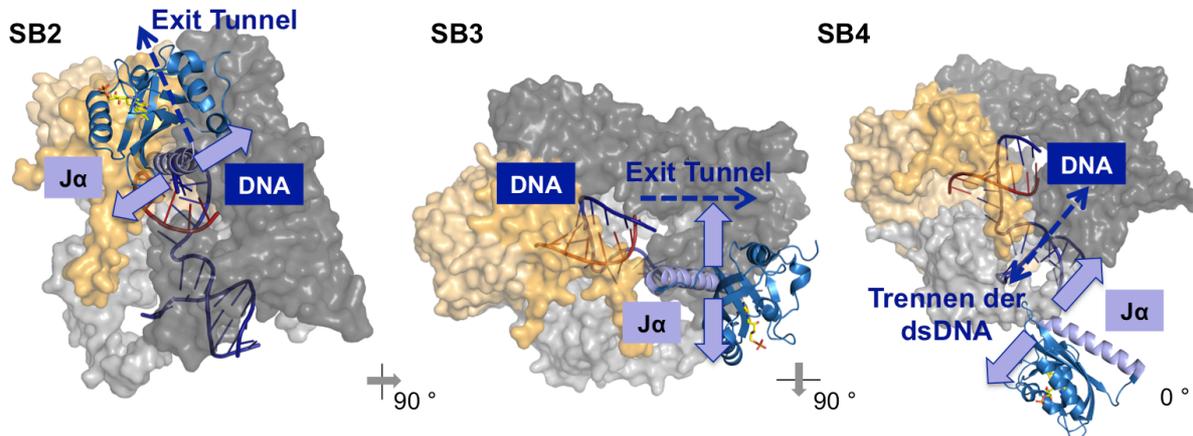


Abbildung 35: SWISS-MODEL der Konstrukte SB2-SB4 basierend auf den Strukturen 1H38^[74] und 2V1A^[57]. rot: RNA; dunkelblau: DNA; hellorange: Daumen Domäne; orange: Handflächen Domäne; hellgrau: Finger Domäne; grau: N-terminale Domäne; blau: LOV2 core; hellviolett: J α -Helix; gelb FMN.

Mit Hilfe der modellierten Strukturmodelle wird deutlich, dass sich die LOV2-Domäne in den Konstrukten SB2 und SB3 im EC in Nachbarschaft zum DNA-Ausgangstunnel (*Exit Tunnel*) befindet. Durch diesen wird während der Elongation der RNA die transkribierte Templat-DNA aus dem aktiven Zentrum des Proteins an dessen Oberfläche transportiert. Im Fall der Variante SB2 würde die Bestrahlung mit blauem Licht und die damit verbundene Dissoziation der J α -Helix eine Aufsperrung des *Exit Tunnels* zur Folge haben, die den Austritt der Templat-DNA erleichtern kann, was die hier beobachtete erhöhte Transkriptionsaktivität (+ 8 %) in Gegenwart von Licht erklärt.

Im Vergleich dazu zeigt das Polymerasekonstrukt SB3 eine verminderte Aktivität im Lichtzustand (57 %), die durch eine Konformationsänderung nahe des DNA-Ausgangstunnels, hervorgerufen worden sein könnte. Dabei könnte es durch die Entfaltung und Dissoziation der J α -Helix innerhalb der N-terminalen Domäne zu einer Verringerung des für den Austritt der Templat-DNA benötigten Raumes kommen. Der Transport des Templatstrangs an die Proteinoberfläche wäre damit eingeschränkt, was zu einer verminderten Polymeraseaktivität von 43 % durch Bestrahlung führt.

In der Variante SB4 befindet sich der LOV2-Sensor in der Finger-Domäne der T7RNAP nahe der zu transkribierenden Templat-DNA und deren Eintrittsstelle in das aktive Zentrum. An dieser Stelle findet die Trennung der doppelsträngigen DNA für die folgende

Transkriptionsreaktion statt. Die Bestrahlung mit Licht und der damit vergrößerte Raumbedarf der LOV2-Domäne könnte demnach die Wechselwirkung der T7RNAP mit der Templat-DNA stören, was eine verminderten katalytische Effektoraktivität zur Folge haben kann.

Da nicht nur die Nachbarschaft zu hoch konservierten Aminosäuren und die Struktur die enzymatische Aktivität eines Enzyms beeinflussen, sondern diese auch durch mögliche allosterische Wechselwirkungen vermindert oder erhöht werden kann, wurde eine computerbasierte Analyse mittels PARS (*Protein Allosteric and Regulatory Sites*)^[146] durchgeführt. Durch den enthaltenen Logarithmus RASP werden dabei, ähnlich wie bei SCA (*Statistical coupling analysis*) potenzielle allosterische Bindestellen in T7RNAP identifiziert, die einen Hinweis auf mögliche aminosäurebasierte Signalwege innerhalb des Proteins hinweisen können, die dessen Katalyseeigenschaften beeinflussen.

4.9. Optimierung der Lichtschaltbarkeit durch Modifikation der LOV-Domäne – T7RNAP-LOV2-Konstrukte der 4. Generation

In den bis hierher erzeugten LOV-T7RNAP-Fusionsproteinen wurde eine LOV2-Domäne verwendet, deren C-Terminus wie in der ersten konstruierten Variante JB1 (siehe 4.4) um neun Aminosäuren verkürzt war. Diese Verkürzung betrifft die α -Helix und damit den Bereich von LOV2, der durch die lichtabhängige Strukturänderung die Effektoraktivität beeinflusst. Es lag daher nahe, die Länge der α -Helix (schrittweise) zu verändern, um deren Einfluss auf das Ausmaß der Veränderung an der Polymeraseaktivität zu untersuchen. Beispielfhaft sollten diese Untersuchungen anhand der Variante SB3 (Insertionsposition Lys179/Lys180) durchgeführt werden, da diese die höchste Differenz in Bezug auf die enzymatische Aktivität mit 43 % zwischen 92 Lx (Lichtreaktion) und 0 Lx (Dunkelreaktion) zeigte.

Um den Erhalt der Sekundärstruktur der α -Helix im Dunkelzustand zu gewährleisten und diesen damit ebenfalls zu stabilisieren, wurden C-terminale Sequenzabschnitte der Helix für deren Modifikation gewählt (siehe **Tabelle 28**). Als Grundlage diente dabei die Sequenz der α -Helix (Asp522 - Leu546) der LOV2 Domäne aus NPH1-1 (*nonphototrophic hypocotyl*; Uniprot: O49003).

Tabelle 28: Verlängerung der α -Helix (blau) in den Polymerasekonstrukten SB3V1-SB3V3 inklusive der repetitiven Sequenzen (unterstrichen).

T7RNAP- LOV2- Konstrukt	Sequenz der α -Helix 5'→3'	Länge der α - Helix / AS
SB3	DAAEREGVMLIKKTAE	16
SB3V1	DAAEREGVMLIKKTAENIDEAAKEL	25
SB3V2	DAAEREGVMLIKKTAENIDEAAKTAENIDEAAK	33
SB3V3	DAAEREGVMLIKKTAENIDEAAKREGVMLIKKTAENIDEAAK	42

Da das Basiskonstrukt SB3 eine um 9 AS (Asn538 - Leu546) verkürzte Sequenz der α -Helix aufweist, wurde diese für das Konstrukt SB3V1 zunächst auf die native Sequenz von LOV2 aus NPH1-1 (Asp522 - Leu546) verlängert. Für SB2V2 und SB3V3 wurde für die Modifikation eine 17 AS (Tyr535 - Lys544) bzw. 26 AS (Arg526 - Lys544) lange repetitive Sequenz genutzt, wobei die nicht helikalen Aminosäurereste Glu545 und Leu546^[120] vernachlässigt wurden. Das Ziel war hier, drei, in Bezug auf die α -Helix, deutlich unterschiedliche Varianten zu generieren, um auch den Zusammenhang zwischen dem Grad der Photoschaltbarkeit, also der Differenz von Dunkel- (0 Lx) und Lichtreaktion (92 Lx, 470 nm), und der Helixlänge zu untersuchen.

4.9.1. Sekundärstrukturanalyse der modifizierten J α -Helices

Um sicherzustellen, dass die sequenzbasierten Veränderungen der C-terminalen LOV2-Helix zum Erhalt der helikalen Struktur führt, wurde im Weiteren eine Sekundärstrukturanalyse der in **Tabelle 28** aufgeführten Aminosäuresequenzen der J α -Helix für die Konstrukte SB3V1, SB3V2 und SB3V3 mittels SCRATCH/SSPro^[147–149] durchgeführt. Die entsprechenden Ergebnisse sind in **Abbildung 36** schematisch dargestellt.



Abbildung 36: Sekundärstruktur der J α -Helix für die Varianten SB3V1, SB3V2 und SB3V3. Die jeweilige repetitive Sequenz ist hervorgehoben; ungeordnete Abschnitte sind unterstrichen.

Für die analysierten Sequenzen J α SB3V1, J α SB3V2 und J α SB3V3 eine mit 84 % (J α SB3V1) - 93 % (J α SB3V3) überwiegend helikale Sekundärstruktur erhalten. Lediglich die Aminosäurereste an N- und C-Terminus, wie Asp522 sowie Lys544 - Leu546 (in J α SB3V1), Ala553 und Lys554 (in J α SB3V1) und Ala561 und Lys562 (in J α SB3V3), werden als ungeordnet eingestuft. Das Ergebnis für J α SB3V1 (native Sequenz) ähnelt dabei der Sekundärstrukturelemente innerhalb der Kristallstruktur (PDB: 2V1A^[120]) mit den endständigen, ungeordneten Resten Glu545 und Leu546. Die hier gefundene Abweichung von 8 % im Vergleich zu der in der PDB 2V1A^[120] angegebenen Sekundärstruktur für die J α -Helix entspricht exakt der Fehlerrate des zur Analyse verwendeten Programms SCRATCH/SSPro^[147–149]. Für die übrigen Varianten J α SB3V2 mit einem ungeordneten Anteil von 9 % und 7 % für J α SB3V3 wird dementsprechend ebenfalls ein helikaler Strukturanteil von annähernd 100 % angenommen.

Da hier ausschließlich die Sekundärstruktur der C-terminalen, modifizierten J α -Helix betrachtet wurde, sollte im nächsten Schritt das strukturelle Verhalten der Sensordomänen LOV2V1-V3 mittels MD-Simulation näher bestimmt werden.

4.9.2. 3D-Strukturanalyse der Sensordomänen LOV2V1-V3 mittels MD-Simulation

Innerhalb komplexer Proteinstrukturen kann es durch auftretende inter- oder auch intramolekulare Wechselwirkungen zu Abweichungen der zuvor bestimmten Sekundärstruktur kommen. Daher wurden zusätzlich zu der Sekundärstrukturanalyse MD-Simulationen der Polymerasekonstrukte SB3V1, SB3V2 und SB3V3 durchgeführt (Dr. C. Ehrt, Fakultät Chemie und Chemische Biologie, TU Dortmund). Als strukturelle Grundlage diente dabei der IC (PDB: 2PI4^[73]) und EC (PDB: 1H38^[74]) der T7RNAP sowie die Dunkelstruktur des Sensors AsLOV2 (PDB: 2V0U^[120]). Für jedes Konstrukt wurden dazu zwei MD-Simulationen (MD1 und MD2) über einen Zeitraum von 600 ns durchgeführt. Die **Abbildung 37** zeigt die errechneten LOV2-Strukturen der Fusionsproteine SB3V1, SB3V2 und SB3V3 im IC und EC inklusive der Sekundärstruktur der zugehörigen α -Helix.

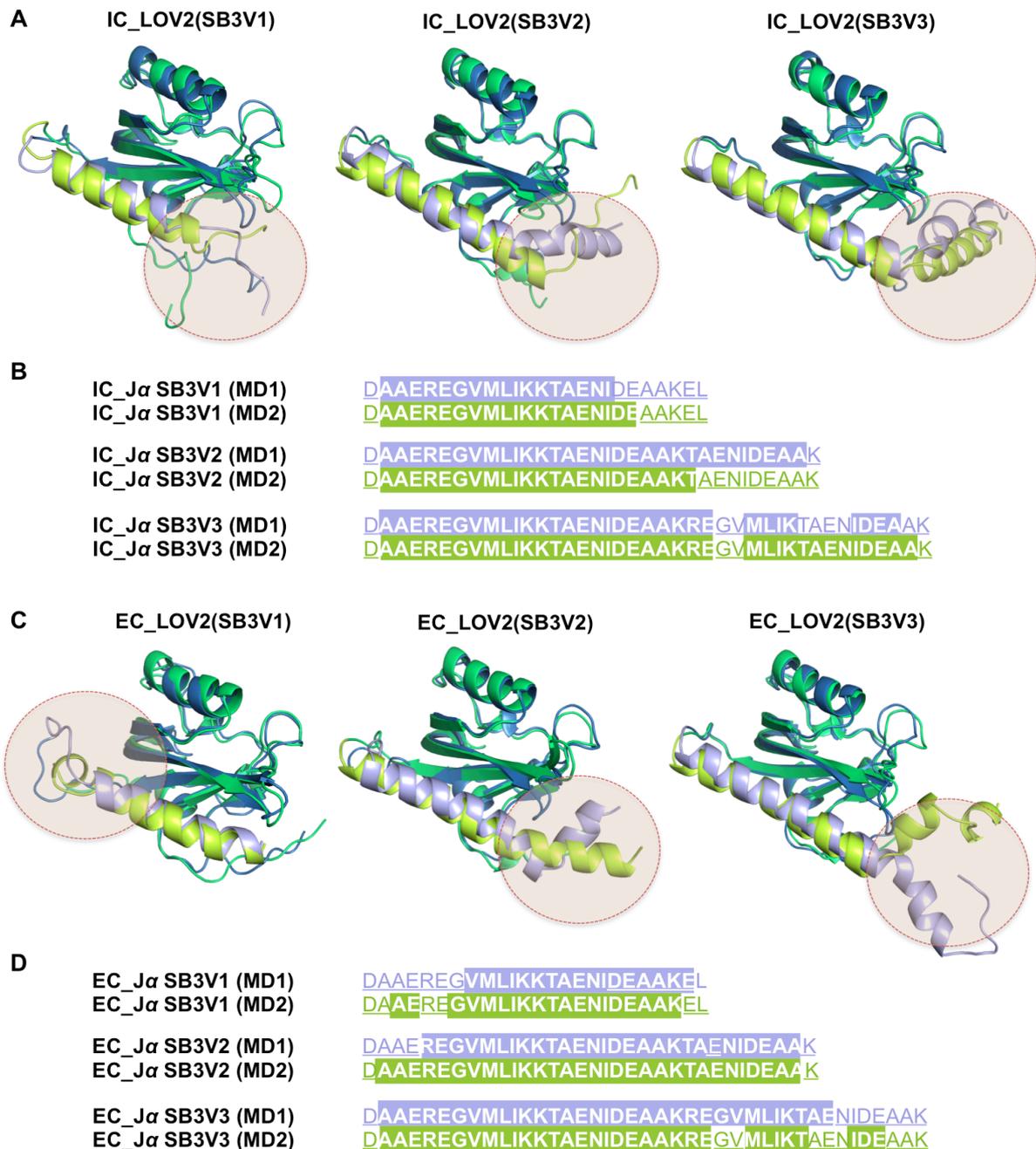


Abbildung 37: MD-Simulationen (MD1 und MD2) der LOV2-Sensordomäne innerhalb der Polymerasekonstrukte SB3V1, SB3V2 und SB3V3. A) 3D-Struktur der MD-Simulation von LOV2 innerhalb der Varianten SB3V1, SB3V2 und SB3V3 im IC; B) Sekundärstruktur der Jα-Helix der entsprechenden Varianten im IC (unterstrichen: ungeordnet; farbig hinterlegt: helikal); C) 3D-Struktur der MD-Simulation von LOV2 innerhalb der Varianten SB3V1, SB3V2 und SB3V3 im EC; D) Sekundärstruktur der Jα-Helix der entsprechenden Varianten im EC (unterstrichen: ungeordnet; farbig hinterlegt: helikal).

Aus den durch MD-Simulation bestimmten 3D- und Sekundärstrukturen für die Sensordomänen der Varianten SB3V1, SB3V2 und SB3V3 wird deutlich, dass diese im Hinblick auf die Konformation und Strukturelemente der entsprechenden α -Helix ein verändertes Verhalten aufweisen. Dabei unterscheiden sich diese sowohl für die zwei errechneten möglichen Strukturen innerhalb eines Komplexes als auch im Vergleich zwischen den untersuchten Komplexen der Fusionsproteine im IC und EC. Demzufolge werden für den jeweiligen Zustand (Initiation und Elongation) der Konstrukte jeweils zwei mögliche Konformationen angenommen.

In SB3V1 besteht die α -Helix bis zu einem Anteil von 24 % (MD2 in IC und EC) bis 32 % (MD1 in IC und EC) aus nicht helikalen Strukturanteilen, wobei im IC überwiegend der C-Terminus ungeordnet vorliegt, während sich im EC der N-Terminus nicht helikal ausbildet. Die erhaltenen Ergebnisse unterscheiden sich dabei sowohl von den in 4.9.1 bestimmten Sekundärstrukturanteilen (16 % ungeordnet) als auch von der nativen Struktur der α -Helix in LOV2 (PDB: 2V1A^[120]), in der der nicht helikale Anteil aufgrund der C-terminalen Aminosäuren Glu545 und Leu546^[120] 8 % beträgt. Die Differenz von bis zu 24 % wird hier durch Insertion des LOV2 in die T7RNAP hervorgerufen. Obwohl sich die Insertionsposition innerhalb einer Loop-Struktur des Effektors befindet, haben zusätzlich auftretende Wechselwirkungen innerhalb des Fusionsproteins sowie von der Polymerase beanspruchter Konformationsraum Einfluss auf die Struktur des insertierten LOV2, wobei besonders die dynamische α -Helix betroffen ist. Die Orientierung der Helix ist dabei für alle errechneten Strukturen, mit einer parallelen Ausrichtung zum β -Faltblatt Motiv des LOV2 vergleichbar.

Für SB3V2 ergeben sich hingegen deutliche Unterschiede für die Ausrichtung des C-Terminus der α -Helix des LOV2 im EC sowie für die ermittelte Sekundärstruktur dieser innerhalb des IC. Die endständigen neun Aminosäurereste Ala335 - Lys343 des IC sind für die in MD2 bestimmte Struktur ungeordnet; aus der MD1 ergibt sich im Vergleich hingegen nur für das C-terminale Lys343 eine nicht helikale Sekundärstruktur. Unter Berücksichtigung des in beiden Strukturen ebenfalls nicht helikalen N-terminalen Asp311, beträgt der ungeordnete Anteil der α -Helix 6 % (MD1) bzw. 30 % (MD2).

Die Helix der LOV2 Struktur aus MD1 des IC unterscheidet sich zusätzlich durch ihre räumliche Orientierung von der in MD2 errechneten α -Helix. Die terminale Loop-Struktur in MD1 richtet sich in einem Winkel von ca. 90 ° in Richtung des β -Faltblatt Motiv des LOV2 aus, während sich die Helix in MD2 ab dem Aminosäurerest Glu330 diesem in einem Winkel von ca. 120 °, annähert.

Die α -Helices der MD1 und MD2 des zugehörigen EC zeigen N-terminal (Ala312 - Glu314) und im mittleren Teil der Helix (Ala335 - Asn337) ein gegensätzliches Verhalten in Bezug auf die ausgebildete Sekundärstruktur. Die in MD1 errechneten ungeordneten Anteile der α -Helix betragen 24 % (Asp311 - Glu314, Ala335 - Asn337) während mittels der MD2 ein ungeordneter Anteil von 6 % (Asp311, Lys343) ermittelt werden konnte.

Im Vergleich dieser Strukturmodelle ist ebenfalls ein Unterschied der endständigen Konformation der α -Helix sichtbar. In MD1 kann, wie auch schon in MD2 des ICs, eine Umorientierung ab der Aminosäure Ala335 von ca. 90° in Richtung des β -Faltblatt Motivs des LOV2 beobachtet werden. Die Helix der in MD2 ermittelten Struktur richtet sich dagegen fast annähernd parallel zur β -Faltblatt Struktur des LOV2 aus.

Innerhalb des IC des Konstruktes SB3V3 ergibt sich sowohl für die MD1 als auch für die MD2 eine Drehung der α -Helix um ca. 90° in Richtung des β -Faltblatt Motivs des LOV2. Ermöglicht wird dies durch die in beiden Strukturmodellen enthaltenen ungeordneten Aminosäurereste Gly336 und Val337. In MD2 liegen zusätzlich zu diesen Resten lediglich die N- und C-terminalen Aminosäuren der α -Helix (Asp331, Lys352) ungeordnet vor. Für die α -Helix dieses Modells lässt sich somit ein ungeordneter Anteil von 10 % errechnen. Das Strukturmodell MD1 des IC zeigt dagegen fünf weitere ungeordnete Reste innerhalb der C-terminalen Region der α -Helix (Thr343 - Asn346, Ala351) was einen Anteil von insgesamt 21 % ergibt.

Die Sekundärstruktur sowie die Orientierung der α -Helix der MD2 des EC ist vergleichbar mit MD1 des IC. Die Reste Gly336 und Val337 sind ebenfalls ungeordnet, was zu einer Umorientierung der Helix um ca. 90° führt. Zudem sind ebenfalls kleinere Loop-Strukturen zu finden (Ala344 - Asn346, Ala350 - Lys352) mit denen für die α -Helix von MD2 ein ungeordneter Anteil von 21 % erhalten wird. Das Strukturmodell MD1 des EC verhält sich mit Blick auf den C-Terminus der α -Helix deutlich anders. Im Bereich Asn346 - Lys352 findet sich eine größere Loop-Struktur, während der Rest der α -Helix, bis auf die N-terminale Aminosäure Asp311 in einer geordneten helikalen Struktur vorliegt. Der Gesamtanteil der ungeordneten Reste beträgt hier 19 %.

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass die Sekundärstruktur sowie die Konformation der LOV2-Kernstruktur (Lys192 - Arg310), die auch die Bindetasche für das Chromophor FMN enthält, auch bei Insertion in T7RNAP erhalten bleibt. Die lichtabhängige Wechselwirkung mit FMN sollte demnach für jedes der Konstrukte möglich sein.

Unterschiede konnten vor Allem zwischen den Strukturmodellen des IC und des EC festgestellt werden. Während in den IC-Konstrukten überwiegend der C-Terminus der α -Helix

ungeordnet vorliegt, sind im EC (SB3V1 und SB3V2) N-terminale Loop-Regionen zu finden. Dies kann deutliche Vorteile für den Übergang der Polymerase vom IC in den EC sowie für die lichtabhängige Aktivität dieser Konstrukte haben:

- Die ungeordnete Struktur des C-Terminus von LOV2 im IC bietet ausreichend Dynamik für die Umorientierung der T7RNAP in den EC
- Die Loop-Struktur am N-Terminus der α -Helix im EC erleichtert die Dissoziation und Entfaltung dieser bei Bestrahlung mit Licht
- Die geordnete helikale Struktur des C-Terminus von LOV2 im EC unterstützt die Stabilität der Gesamtstruktur der Konstrukte im Dunkelzustand

4.9.3. Expression und Reinigung der Varianten SB3V1-SB3V3

Die heterologe Expression der Polymerasevarianten SB3V1-SB3V3 erfolgte in *E. coli* BL21[pRep4]. Das jeweilig genutzte Plasmid pQET7SBX (X = 3, V1, V2 und V3; siehe 8.1) wurde zuvor mittels QuickChange und RFC kloniert. Die zugehörigen Aminosäuresequenzen sind im Anhang unter 8.2 aufgelistet.

Die Reinigung der expremierten Konstrukte wurde, nach einer Fällung der enthaltenen Nukleinsäuren mit PEI sowie einer Entfernung erster Unreinheiten mittels Ammoniumsulfatfällung, durch Ni-NTA Affinitätschromatographie durchgeführt. Die **Abbildung 38** zeigt die jeweils vereinigten Eluatfraktionen der Varianten SB3V1, SB3V2 und SB3V3 nach Analyse mittels SDS-PAGE.

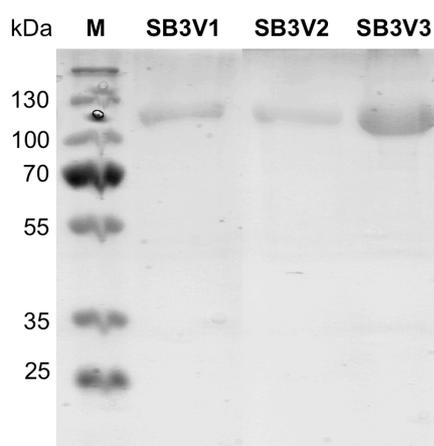


Abbildung 38: SDS-PAGE der vereinigten Eluatfraktionen der Ni-NTA Affinitätschromatographie der Varianten SB3V1-SB3V3; M: *PageRuler Plus Prestained Protein Ladder*.

Aus jeweils 1L Kultur konnten im Durchschnitt 4 mg (SB3V1 und SB3V2) beziehungsweise 11 mg (SB3V3) Zielprotein in hoher Reinheit erhalten werden. Die erhaltenen Konstrukte wurden für die folgenden Aktivitätstests verwendet.

4.9.4. Polymeraseaktivität von SB3V1 - SB3V3

Um die enzymatische Aktivität der einzelnen Konstrukte SB3V1, SB3V2 und SB3V3 im Vergleich zu T7RNAP-WT zu bestimmen, wurden *in-vitro* Transkriptionsreaktionen mit GFP-DNA unter Kontrolle des T7-Promotors bei einer Beleuchtungsstärke von 0 Lx (Dunkelreaktion) durchgeführt. Die erhaltenen GFP-RNA-Produkte (791 nt) wurden mittels Agarosegelelektrophorese und *ImageJ* analysiert. Als Referenz diente dabei die Transkription mit T7RNAP-WT für die eine Aktivität von 100 % angenommen wurde. Die ermittelten Daten sind in **Abbildung 39** dargestellt.

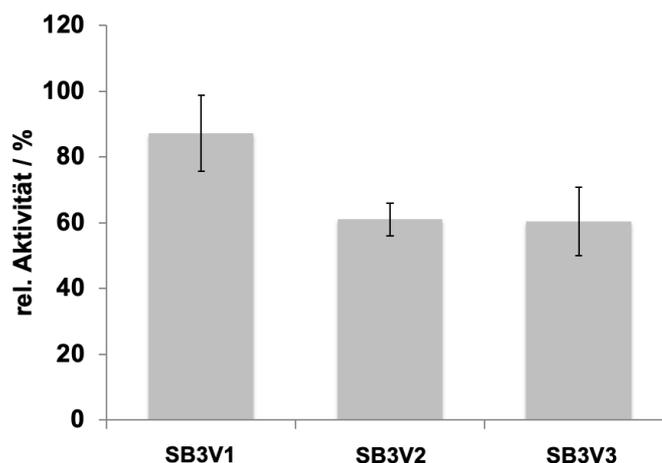


Abbildung 39: Prozentuale relative Aktivität der Varianten SB3V1-SB3V3 zu T7RNAP-WT bei einer Beleuchtungsstärke von 0 Lx.

Aus **Abbildung 39** ist ersichtlich, dass keine lineare Abhängigkeit zwischen der verlängerten Sequenz der α -Helix von LOV2 und der Effektoraktivität besteht. Während für die Konstrukte SB3V2 und SB3V3 eine Aktivität von 61 % \pm 5 % bzw. 61 \pm 10 % im Vergleich zu T7RNAP-WT erreicht wird, konnte für die Variante SB3V1, die die native C-terminale Sequenz der LOV2 Domäne beinhaltet, eine katalytische Aktivität von 87 % \pm 12 % bestimmt werden. Dies kann unter anderem auf die geringere Größe des insertierten Sensors im Vergleich zu LOV2 in den Konstrukten SB3V2 und SB3V3 zurückzuführen sein. Zudem zeigen die durchgeführten MD-Simulationen (siehe 4.9.2) für SB3V1 einen höheren Anteil ungeordneter Strukturen innerhalb der α -Helix. Der geringere Anteil an helikalen Strukturen des C-Terminus von LOV2 in SB3V1

kann die korrekte Faltung der Polymerase und somit die Transkriptionsaktivität positiv beeinflussen.

4.9.5. Lichtabhängige Polymeraseaktivität von SB3V1 - SB3V3

Die Aktivität der generierten Polymerasevarianten SB3V1, SB3V2 und SB3V3 bei Bestrahlung mit Licht (92 Lx) wurde ebenfalls mittels *in-vitro* Transkription untersucht. Als Referenz diente hier die in der Dunkelreaktion (0 Lx) generierte GFP-RNA (791 nt). Die Analyse wurde, wie zuvor, durch Agoresegelelektrophores und *ImageJ* durchgeführt. Die entsprechenden Daten sind in **Abbildung 40** zusammengefasst.

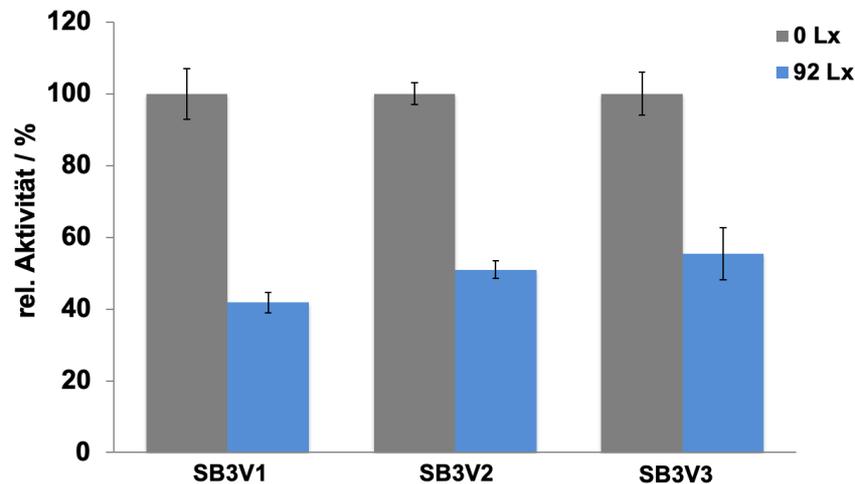


Abbildung 40: Prozentuale relative Aktivität der Varianten SB3V1-SB3V3 bei einer Beleuchtungsstärke von 92 Lx in Bezug auf 0 Lx.

Während für die Polymeraseaktivität der Konstrukte SB3V1, SB3V2 und SB3V3 bei 0 Lx keine direkte Abhängigkeit zu der verlängerten $J\alpha$ -Helix festgestellt werden konnte (siehe 4.9.4), zeigt **Abbildung 40** einen deutlichen Zusammenhang der Effektoraktivität bei Bestrahlung mit Licht. Die Variante SB3V1 konnte mittels Bestrahlung (430 nm, 92 Lx) auf eine Restaktivität von 42 % \pm 3 % relativ zur Dunkelreaktion (0 Lx) herabreguliert werden. Die Konstrukte SB3V2 und SB3V3 zeigten eine relative Aktivität zu 0 Lx von 52 % \pm 3 % und 55 % \pm 7 %. Demzufolge scheint die Verlängerung der $J\alpha$ -Helix der insertierten LOV2-Domäne einen direkten, linearen Effekt auf die lichtabhängige Polymeraseaktivität der jeweiligen Konstrukte (SB3V1, SB3V2 und SB3V3) zu haben. Im Fall der verlängerten Sequenzen der $J\alpha$ -Helix in den Konstrukten SB3V2 und SB3V3 kann die verminderte Regulierbarkeit durch Licht vermutlich primär auf die Flexibilität der Polymerasestruktur nahe der Insertionsposition

zurückzuführen sein. Die Verlängerung der $J\alpha$ -Helix könnte hier wie ein Linker agieren, wodurch der Einfluss der Sensordomäne auf die lichtabhängige T7RNAP-WT-Aktivität verringert wird.

Für die Variante SB3V1 konnte somit nicht nur die höchste Effektoraktivität relativ zu T7RNAP-WT (87 % +/- 12 %) bestimmt werden, sondern diese zeigt im Vergleich zu den Varianten mit gleicher Insertionsposition der LOV2-Domäne (SB3V2 und SB3V3) zudem die bestmöglichen Regulationseigenschaften der Polymeraseaktivität durch Licht. Folglich wird eine Insertion der Sensordomäne innerhalb der nativen *Split*-Position der T7RNAP (Lys179/Lys 180) mit annähernd vollständigem Erhalt der Effektoraktivität (SB3V1) sehr gut toleriert. Die Regulation der Aktivität durch Bestrahlung mit Licht (92 Lx, 430 nm) kann durch eine Verlängerung der $J\alpha$ -Helix des Sensors LOV2 zusätzlich kontrolliert werden, wobei unter Einsatz der nativen Sequenz bestmögliche Ergebnisse erreicht werden konnten.

5. Zusammenfassung

Innerhalb des hier durchgeführten Projektes konnte gezeigt werden, dass durch die spezifische (rationale) Insertion einer optischen Sensordomäne (LOV2) in einen Effektor (T7RNAP) ein lichtschtbares System generiert werden kann, das eine Regulation der Transkription mittels Licht (430 nm, 92 Lx) ermöglicht. Dabei wurde sowohl das native Design, das auf dem natürlichen Aufbau photoschaltbarer Proteine basiert (Fusion von LOV2 N- oder C-Terminal; Konstrukte JB1, PD1 und PD2), als auch das strukturbasierte rationale Design (SB-Varianten) berücksichtigt (siehe **Abbildung 41**).

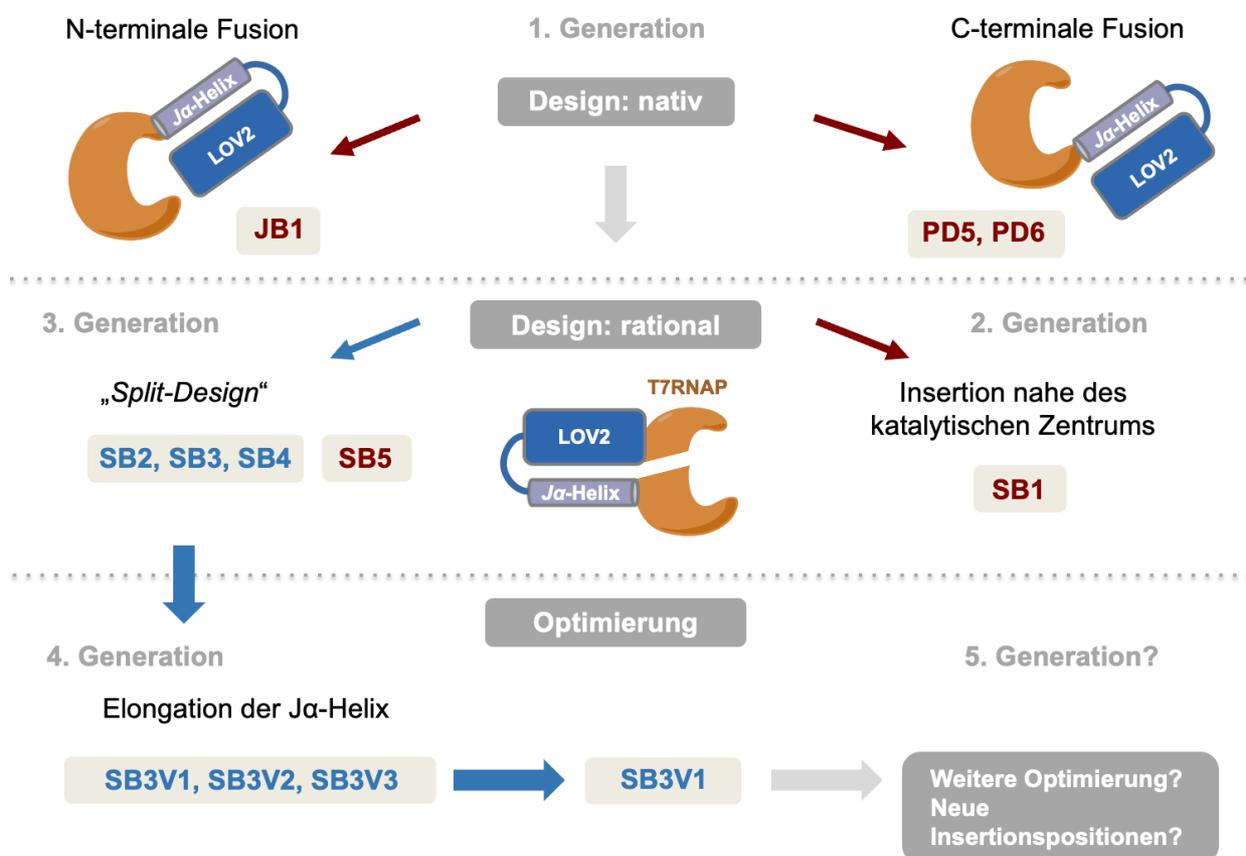


Abbildung 41: Schematische Zusammenfassung der Generierung einer photoschaltbaren T7RNAP mittels Fusion/Insertion von LOV2. Rot: Inaktive/unlösliche Konstrukte; Grün: enzymatisch aktive Konstrukte.

Die Basis der lichtabhängigen Regulation der Polymerase war für alle Designansätze die Dissoziation und Entfaltung der J α -Helix des LOV2-Sensors bei Bestrahlung mit Licht.

Während für die mittels nativen Designs generierten Varianten der ersten Generation JB1, PD1 und PD2 (P. Dollinger und J. Benninghoff, Fakultät Chemie und Chemische Biologie, TU Dortmund; unveröffentlicht) sowie die erste rational generierte Variante SB1 keine Aktivität der

T7RNAP nachgewiesen werden konnte, wurden mit Hilfe des "*Split-Designs*" drei aktive Konstrukte SB2-SB4 erhalten. Dabei zeigte die Variante SB3 mit 63 +/- 10 % die höchste Transkriptionsaktivität relativ zu T7RNAP-WT (siehe **Tabelle 29**). Zudem konnte beobachtet werden, dass sich die Polymeraseaktivität dieses Konstruktes bei Bestrahlung mit Licht einer Wellenlänge von 430 nm und 92 Lx bis auf 57 +/- 11 % reduzieren lässt.

Im Vergleich zu den Konstrukten SB1, SB2, SB4 und SB5 konnte ein Zusammenhang zwischen (lichtabhängiger) Aktivität und Abstand der katalytisch wichtigen Aminosäuren der T7RNAP zu der insertierten LOV2-Domäne festgestellt werden. Beträgt dieser Abstand weniger als 30 Å liegt das Konstrukt inaktiv (SB1) oder unlöslich (SB5) vor. Der optimale Bereich für eine aktive und lichtabhängige Variante liegt bei einem Abstand zwischen 30 Å und 50 Å (Variante SB2 und SB3). Dabei ist zu beachten, dass sich die Vergrößerung des Abstandes während des Übergangs vom IC in den EC (SB3) deutlich positiv auf die Transkriptionsaktivität sowie die Kontrolle durch Licht auswirkt. Im Bereich ab 50 Å (SB4) sinkt die Effektoraktivität stark ab, eine lichtabhängige Verringerung ist nicht mehr zu beobachten.

Um die Regulation der Variante SB3 durch Licht zu optimieren, wurde im Folgenden eine Veränderung der J α -Helix der inserierten Sensordomäne LOV2 durchgeführt. Durch den Einsatz der nativen Sequenz der J α -Helix konnte die Effektoraktivität während der Bestrahlung mit Licht auf 42 +/- 3 % gesenkt werden (siehe **Tabelle 29**). Zudem zeigte sich für diese Variante eine Polymeraseaktivität von 87 +/- 12 % relativ zu T7RNAP-WT.

Demzufolge ist die Variante SB3V1 der 4. Generation, die sowohl auf der nativen *Split*-Position der T7RNAP-WT basiert, als auch die native Sequenz der J α -Helix von AsLOV2 enthält, ein vielversprechendes Modell für die Generierung optogenetischer Transkriptionssysteme.

Tabelle 29: Zusammenfassung der strukturellen und enzymatischen Eigenschaften der T7RNAP-LOV2 Varianten. Rot: inaktive/unlösliche Konstrukte.

T7RNAP- LOV2 Konstrukt	LOV2-Position in T7RNAP / AS	LOV2 oberflächen- exponiert (IC/EC)	LOV2 Abstand zu Asp537 (IC/EC) / Å	LOV2 Abstand zu Asp812 (IC/EC) / Å	Rel. Aktivität zu T7RNAP-WT bei 0 Lx / %	Rel. Aktivität zu 0 Lx bei 92 Lx / %
JB1	-/Tyr44	+/ +	35/34	34/32	inaktiv	inaktiv
PD5	Ala866/Glu877	+/ +	28/30	27/26	inaktiv	inaktiv
PD6	Ala866/Lys867	+/ +	28/30	27/26	inaktiv	inaktiv
SB1	His346/Cys347	+/ +	28/24	29/27	inaktiv	inaktiv
SB2	Asp68/Asn69	+/ -	45/41	45/37	30 ± 5	70 ± 4
SB3	Lys179/Lys180	+/ -	32/47	32/44	63 ± 10	57 ± 11
SB4	Glu600/Asn601	+/ +	55/56	55/52	19 ± 2	108 ± 9
SB5	Ser564/Glu565	+/ +	15/20	20/16	n.a.*	n.a.*
SB3V1	Lys179/Lys180	+/ -	32/47	32/44	87 ± 12	42 ± 3
SB3V2	Lys179/Lys180	+/ -	32/47	32/44	61 ± 5	52 ± 3
SB3V3	Lys179/Lys180	+/ -	32/47	32/44	61 ± 10	55 ± 7

* unlöslich

6. Summary

Within this project, it was shown that the specific (rational) insertion of an optical sensor domain (LOV2) into an effector (T7RNAP) can generate a photoswitchable system that enables the regulation of transcription by light (430 nm, 92 Lx). Both, the native design, which is based on the natural structure of photoswitchable proteins (fusion of LOV2 N- or C-terminal; constructs JB1, PD1 and PD2), and the structure-based rational design (SB variants) were considered (see Figure 41).

The basis of the light-dependent regulation of the polymerase for all design approaches was the dissociation and unfolding of the $J\alpha$ helix of the LOV2 sensor upon irradiation with light. While no activity of the T7RNAP could be detected for the first generation variants JB1, PD1 and PD2 generated using native design (P. Dollinger and J. Benninghoff, Department of Chemistry and Chemical Biology, TU Dortmund University; unpublished) and the first rationally generated variant SB1, three active constructs SB2-SB4 were obtained using "split design". With 63 +/- 10 %, the SB3 variant showed the highest transcriptional activity relative to T7RNAP-WT (see Table 30). It was also observed that the polymerase activity of this construct can be reduced to 57 +/- 11 % when irradiated with light at a wavelength of 430 nm and 92 Lx. In comparison to the constructs SB1, SB2, SB4 and SB5, a correlation between (light-dependent) activity and the distance between the catalytically important amino acids of the T7RNAP and the inserted LOV2 domain could be determined. If this distance is less than 30 Å, the construct is inactive (SB1) or insoluble (SB5). The optimum range for an active and light-dependent variant is a distance between 30 Å and 50 Å (variant SB2 and SB3). It should be noted that increasing the distance during the transition from IC to EC (SB3) has a clearly positive effect on transcription activity and control by light. In the region above 50 Å (SB4), effector activity drops sharply and a light-dependent reduction can no longer be observed.

In order to optimize the regulation of the SB3 variant by light, the $J\alpha$ helix of the inserted sensor domain LOV2 was modified in the following. By using the native sequence of the $J\alpha$ helix, the effector activity could be reduced to 42 +/- 3 % during irradiation with light (see also Table 30). In addition, this variant showed a polymerase activity of 87 +/- 12 % relative to T7RNAP-WT. Consequently, the 4th generation variant SB3V1, which is based on the native split position of T7RNAP-WT and also contains the native sequence of the $J\alpha$ helix of AsLOV2, is a promising model for the generation of optogenetic transcription systems.

7. Literaturverzeichnis

- [1] G. Ruyters, *Biologie in unserer Zeit* **1988**, *18*, 40–46.
- [2] R. S. Molday, O. L. Moritz, *J Cell Sci.* **2015**, *128*, 4039–45.
- [3] S. Seifert, S. Brakmann, *ACS Chem Biol* **2018**, *13*, 1914–1920.
- [4] A. Jäschke, *FEBS Lett* **2012**, *586*, 2106–2111.
- [5] U. Krauss, T. Drepper, K. E. Jaeger, *Chemistry - A European Journal* **2011**, *17*, 2552–2560.
- [6] P. Klán, T. Šolomek, C. G. Bochet, A. Blanc, R. Givens, M. Rubina, V. Popik, A. Kostikov, J. Wirz, *Chem Rev* **2013**, *113*, 119–191.
- [7] D. C. F. Monteiro, E. Amoah, C. Rogers, A. R. Pearson, *Acta Crystallogr D Struct Biol* **2021**, *77*, 1218–1232.
- [8] D. Laczi, M. D. Johnstone, C. L. Fleming, *Chem Asian J* **2022**, *17*, e202200200.
- [9] J. H. Kaplan, B. Forbush III, J. F. Hoffman, *American chemical Society* **1978**, *17*, 1929–1935.
- [10] D. P. Nguyen, M. Mahesh, S. J. Elsässer, S. M. Hancock, C. Uttamapinant, J. W. Chin, *J Am Chem Soc* **2014**, *136*, 2240–2243.
- [11] A. Gautier, D. P. Nguyen, H. Lusic, W. An, A. Deiters, J. W. Chin, *J Am Chem Soc* **2010**, *132*, 4086–4088.
- [12] N. Wu, A. Deiters, T. A. Cropp, D. King, P. G. Schultz, *J Am Chem Soc* **2004**, *126*, 14306–14307.
- [13] J. W. Cheung, W. D. Kinney, J. S. Wesalo, M. Reed, E. M. Nicholson, A. Deiters, T. A. Cropp, *ChemBioChem* **2023**, *24*, e202200721.
- [14] A. Deiters, D. Groff, Y. Ryu, J. Xie, P. G. Schultz, *Angewandte Chemie - International Edition* **2006**, *45*, 2728–2731.
- [15] A. C. Kneutinger, *Biol Chem* **2022**, *403*, 573–613.
- [16] W. Szymański, J. M. Beierle, H. A. V. Kistemaker, W. A. Velema, B. L. Feringa, *Chem Rev* **2013**, *113*, 6114–6178.
- [17] A. A. Beharry, G. A. Woolley, *Chem Soc Rev* **2011**, *40*, 4422–4437.
- [18] M. W. H. Hoorens, W. Szymanski, *Trends Biochem Sci* **2018**, *43*, 567–575.
- [19] O. Sadovskii, A. A. Beharry, F. Zhang, G. A. Woolley, *Angewandte Chemie - International Edition* **2009**, *48*, 1484–1486.
- [20] N. Muranaka, T. Hoshaka, M. Sisido, *FEBS Lett* **2002**, *510*, 10–12.
- [21] M. D. Yamada, Y. Nakajima, H. Maeda, S. Maruta, *J Biochem* **2007**, *142*, 691–698.
- [22] K. Nakayama, M. Endo, T. Majima, *Chem. Commun.* **2004**, 2386–2387.

- [23] B. Schierling, A.-J. Noël, W. Wende, L. T. Hien, E. Volkov, E. Kubareva, T. Oretskaya, M. Kokkinidis, A. Römpf, B. Spengler, A. Pingoud, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2010**, *107*, 1361–1366.
- [24] S. Kellner, S. Berlin, *Applied Sciences (Switzerland)* **2020**, *10*, DOI 10.3390/app10030805.
- [25] S. Seifert, C. Ehrh, L. Lückfeldt, M. Lubeck, F. Schramm, S. Brakmann, *ChemBioChem* **2019**, *20*, 2813–2817.
- [26] T. Ziegler, A. Möglich, *Front Mol Biosci* **2015**, *2*, DOI 10.3389/fmolb.2015.00030.
- [27] A. Pudasaini, K. K. El-Arab, B. D. Zoltowski, *Front Mol Biosci* **2015**, *2*, 1–15.
- [28] K. A. Reynolds, R. N. McLaughlin, R. Ranganathan, *Cell* **2011**, *147*, 1564–1575.
- [29] O. Dagliyan, M. Tarnawski, P. H. Chu, D. Shirvanyants, I. Schlichting, N. V. Dokholyan, K. M. Hahn, *Science (1979)* **2016**, *354*, 1441–1444.
- [30] M. Shaaya, J. Fauser, A. Zhurikhina, J. E. Conage-Pough, V. Huyot, M. Brennan, C. T. Flower, J. Matsche, S. Khan, V. Natarajan, J. Rehman, P. Kota, F. M. White, D. Tsygankov, A. V Karginov, *Elife* **2020**, *9*, e60647.
- [31] J. A. Reynolds, Y. L. Vishweshwaraiah, V. R. Chirasani, J. R. Pritchard, N. V. Dokholyan, *Journal of Biological Chemistry* **2023**, *299*, 103069.
- [32] S. Gehrig, J. A. Macpherson, P. C. Driscoll, A. Symon, S. R. Martin, J. I. MacRae, J. Kleinjung, F. Fraternali, D. Anastasiou, *FEBS Journal* **2017**, *284*, 2955–2980.
- [33] D. Strickland, K. Moffat, T. R. Sosnick, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2008**, *105*, 10709–14.
- [34] S. M. Harper, L. C. Neil, K. H. Gardner, *Science* **2003**, *301*, 1541–1544.
- [35] Y. I. Wu, D. Frey, O. I. Lungu, A. Jaehrig, I. Schlichting, B. Kuhlman, K. M. Hahn, *Nature* **2009**, *461*, 104–8.
- [36] A. Möglich, R. a Ayers, K. Moffat, *J Mol Biol* **2009**, *385*, 1433–44.
- [37] E. Romano, A. Baumschlager, E. B. Akmeriç, N. Palanisamy, M. Houmani, G. Schmidt, M. A. Öztürk, L. Ernst, M. Khammash, B. Di Ventura, *Nat Chem Biol* **2021**, *17*, 817–827.
- [38] X. Li, C. Zhang, X. Xu, J. Miao, J. Yao, R. Liu, Y. Zhao, X. Chen, Y. Yang, *Nucleic Acids Res* **2020**, *48*, E33.
- [39] M. Ostermeier, *Curr Opin Struct Biol* **2009**, *19*, 442–448.
- [40] E. Rihtar, T. Lebar, D. Lainšček, K. Kores, S. Lešnik, U. Bren, R. Jerala, *Nat Chem Biol* **2023**, *19*, 64–71.
- [41] J. R. Porter, C. I. Stains, B. W. Jester, I. Ghosh, *J Am Chem Soc* **2008**, *130*, 6488–6497.
- [42] A. B. Tyszkiewicz, T. W. Muir, *Nat Methods* **2008**, *5*, 303–305.
- [43] A. Levskaya, O. D. Weiner, W. A. Lim, C. A. Voigt, *Nature* **2009**, *461*, 997–1001.

- [44] D. S. Tawfik, *Enzyme Engineering and Evolution: Specific Enzyme Applications*, Academic Press, **2020**.
- [45] Y.-T. Lee, T.-H. Su, W.-C. Lo, P.-C. Lyu, S.-C. Sue, *PLoS One* **2012**, *7*, e43820.
- [46] Y.-Z. Lee, W.-C. Lo, S.-C. Sue, in *Split Inteins: Methods and Protocols* (Ed.: H.D. Mootz), Springer New York, New York, NY, **2017**, pp. 259–268.
- [47] Y. Han, T. C. Branon, J. D. Martell, D. Boassa, D. Shechner, M. H. Ellisman, A. Ting, *ACS Chem Biol* **2019**, *14*, 619–635.
- [48] R. J. McLure, S. E. Radford, D. J. Brockwell, *Trends Chem* **2022**, *4*, 378–391.
- [49] J. Herrou, S. Crosson, *Nat Rev Microbiol* **2011**, *9*, 713–723.
- [50] E. Demarsy, C. Fankhauser, *Curr Opin Plant Biol* **2009**, *12*, 69–74.
- [51] S. Endres, J. Granzin, F. Circolone, A. Stadler, U. Krauss, T. Drepper, V. Svensson, E. Knieps-Grünhagen, A. Wirtz, A. Cousin, P. Tielen, D. Willbold, K. E. Jaeger, R. Batra-Safferling, *BMC Microbiol* **2015**, *15*, DOI 10.1186/s12866-015-0365-0.
- [52] M. Salomon, J. M. Christie, E. Knieb, A. Ulrika Lempert, W. R. Briggsll, **2000**, 9401–9410.
- [53] J. M. Christie, M. Salomon, K. Nozue, M. Wada, W. R. Briggs, *Proc Natl Acad Sci U S A* **1999**, *96*, 8779–8783.
- [54] C. H. Chen, B. S. DeMay, A. S. Gladfelter, J. C. Dunlap, J. J. Loros, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2010**, *107*, 16715–16720.
- [55] B. L. Taylor, I. B. Zhulin, *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **1999**, *63*, 479–506.
- [56] B. D. Zoltowski, K. H. Gardner, *Biochemistry* **2011**, *50*, 4–16.
- [57] A. S. Halavaty, K. Moffat, *Biochemistry* **2007**, *46*, 14001–14009.
- [58] A. Möglich, K. Moffat, *J Mol Biol* **2007**, *373*, 112–126.
- [59] M. Salomon, W. Eisenreich, H. Dürr, E. Schleicher, E. Knieb, V. Massey, W. Rüdiger, F. Müller, A. Bacher, G. Richter, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2001**, *98*, 12357–12361.
- [60] J. N. Iuliano, J. T. Collado, A. A. Gil, T. Pavithran, A. Lukacs, S. Shin, H. A. Woroniecka, J. M. Aramini, U. R. Edupuganti, C. R. Hall, M. Gregory, I. V Sazanovich, I. P. Clark, T. Daryae, J. E. Toettcher, J. B. French, K. H. Gardner, C. L. Simmerling, S. R. Meech, P. J. Tonge, L. Facility, B. Initiative, *ACS Chem Biol* **2020**, *15*, 2752–2765.
- [61] J. Mathony, D. Niopek, *Adv Biosyst* **2020**, *2000181*, DOI 10.1002/adbi.202000181.
- [62] O. Dagliyan, N. V Dokholyan, K. M. Hahn, *Nat Protoc* **2019**, *14*, 1863–1883.
- [63] A. Möglich, R. A. Ayers, K. Moffat, *Structure* **2009**, *17*, 1282–1294.
- [64] J. Dietler, R. Gelfert, J. Kaiser, V. Borin, C. Renzl, S. Pils, A. T. Ranzani, A. García de Fuentes, T. Gleichmann, R. P. Diensthuber, M. Weyand, G. Mayer, I. Schapiro, A. Möglich, *Nat Commun* **2022**, *13*, 1–16.

- [65] T. E. Swartz, S. B. Corchnoy, J. M. Christie, J. W. Lewis, I. Szundi, W. R. Briggs, R. A. Bogomolni, *Journal of Biological Chemistry* **2001**, 276, 36493–36500.
- [66] M. Chamberlin, J. McGrath, L. Waskell, *Nature* **1970**, 228, 227–231.
- [67] B. A. Moffatt, J. J. Dunn, F. W. Studier, *J Mol Biol* **1984**, 173, 265–269.
- [68] P. Davanloo, A. H. Rosenberg, J. J. Dunn, F. W. Studier, *Proc Natl Acad Sci U S A* **1984**, 81, 2035–2039.
- [69] R. Sousa, Y. J. Chung, J. P. Rose, B. C. Wang, *Nature* **1993**, 364, 593–599.
- [70] “PDB, <https://www.rcsb.org>,” **2024**.
- [71] N. Opalka, J. Brown, W. J. Lane, K. A. F. Twist, R. Landick, F. J. Asturias, S. A. Darst, *PLoS Biol* **2010**, 8, DOI 10.1371/journal.pbio.1000483.
- [72] A. Y. M. Woody, S. S. Eaton, P. A. Osumi-Davis, R. W. Woody, *Biochemistry* **1996**, 35, 144–152.
- [73] W. P. Kennedy, J. R. Momand, Y. W. Yin, *J Mol Biol* **2007**, 370, 256–268.
- [74] T. H. Tahlrov, D. Temiakov, M. Anikin, V. Patlan, W. T. McAllister, D. G. Vassylyev, S. Yokoyama, *Nature* **2002**, 420, 43–50.
- [75] G. M. T. Cheetham, D. Jeruzalmi, T. A. Steltz, *Nature* **1999**, 399, 80–83.
- [76] K. J. Durniak, S. Bailey, T. A. Steitz, *Science (1979)* **2008**, 322, 553–557.
- [77] R. P. Bandwar, G.-Q. Tang, S. S. Patel, *J Mol Biol* **2006**, 360, 466–483.
- [78] R. P. Bandwar, N. Ma, S. A. Emanuel, M. Anikin, D. G. Vassylyev, S. S. Patel, W. T. McAllister, *Journal of Biological Chemistry* **2007**, 282, 22879–22886.
- [79] G. Bonner, E. M. Lafer, R. Sousa, *Journal of Biological Chemistry* **1994**, 269, 25129–25136.
- [80] G. M. T. Cheetham, T. A. Steitz, *Science (1979)* **1999**, 286, 2305–2309.
- [81] P. A. Osumi-Davis, M. C. de Aguilera, R. W. Woody, A. Y. M. Woody, *J Mol Biol* **1992**, 226, 37–45.
- [82] L. P. Gardner, K. A. Mookhtiar, J. E. Coleman, *Biochemistry* **1997**, 36, 2908–2918.
- [83] J. Lykke-Andersen, J. Christiansen, *Nucleic Acids Res* **1998**, 26, 5630–5.
- [84] R. Padmanabhan, D. Miller, *bioRxiv* **2019**, 619395.
- [85] Q. Guo, R. Sousa, *Journal of Biological Chemistry* **2005**, 280, 14956–14961.
- [86] C. Liu, C. T. Martin, *Journal of Biological Chemistry* **2002**, 277, 2725–2731.
- [87] M. Jiang, N. Ma, D. G. Vassylyev, W. T. McAllister, *Mol Cell* **2004**, 15, 777–788.
- [88] M. Golomb, M. Chamberlin, *J Biol Chem* **1974**, 149, 2858–2863.
- [89] L. Swint-Kruse, K. S. Matthews, in *Encyclopedia of Biological Chemistry* (Eds.: W.J. Lennarz, M.D. Lane), Elsevier, New York, **2004**, pp. 529–534.
- [90] L. E. Macdonald, R. K. Durbin, J. J. Dunn, W. T. McAllister, *J Mol Biol* **1994**, 238, 145–158.
- [91] D. L. Lyakhov, B. He, X. Zhang, F. W. Studier, J. J. Dunn, W. T. McAllister, *J Mol Biol* **1998**, 280, 201–213.

- [92] F. W. Studier, B. A. Moffatt, *J Mol Biol* **1986**, *189*, 113–130.
- [93] J. Samuelsen, in *Production of Membrane Proteins* (Ed.: A. Skaja Robinson), Wiley, **2011**, pp. 13–35.
- [94] X. Liang, R. Wakuda, K. Fujioka, H. Asanuma, *FEBS Journal* **2010**, *277*, 1551–1561.
- [95] B. A. Moffatt, F. W. Studier, *Cell* **1987**, *49*, 221–227.
- [96] F. W. Studier, *J Mol Biol* **1991**, *219*, 37–44.
- [97] D. Jeruzalmi, T. A. Steitz, *EMBO Journal* **1998**, *17*, 4101–4113.
- [98] S. Borkotoky, A. Murali, *Int J Biol Macromol* **2018**, *118*, 49–56.
- [99] C. Chou, D. Young, A. Deiters, *ChemBioChem* **2010**, *11*, 972–977.
- [100] S. Tabor, C. C. Richardson, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1985**, *82*, 1074–1078.
- [101] J. Grodberg, J. J. Dunn, *J Bacteriol* **1988**, *170*, 1245–1253.
- [102] R. A. Ikeda, C. C. Richardson, *J Biol Chem* **1987**, *262*, 3800–3806.
- [103] R. A. Ikeda, C. C. Richardson, *J Biol Chem* **1987**, *262*, 3790–3799.
- [104] T. H. Segall-Shapiro, A. J. Meyer, A. D. Ellington, E. D. Sontag, C. A. Voigt, *Mol Syst Biol* **2014**, *10*, 742–742.
- [105] M. G. Romei, S. G. Boxer, *Annu Rev Biophys* **2019**, *176*, 139–148.
- [106] K. E. Luker, M. C. P. Smith, G. D. Luker, S. T. Gammon, H. Piwnica-Worms, D. Piwnica-Worms, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2004**, *101*, 12288–12293.
- [107] A. Galarnau, M. Primeau, L.-E. Trudeau, S. W. Michnick, *Nat Biotechnol* **2002**, *20*, 619–622.
- [108] A. Baumschlager, S. K. Aoki, M. Khammash, *ACS Synth Biol* **2017**, *6*, 2157–2167.
- [109] T. Han, Q. Chen, H. Liu, *ACS Synth Biol* **2017**, *6*, 357–366.
- [110] J. Ibach, L. Dietrich, K. R. M. Koopmans, N. Nöbel, M. Skoupi, S. Brakmann, *J Biotechnol* **2013**, *167*, 287–295.
- [111] “<https://www.chem-agilent.com/pdf/strata/200249.pdf>,” **2019**.
- [112] L. Zheng, U. Baumann, J.-L. Reymond, *Nucleic Acids Res* **2004**, *32*, e115.
- [113] F. van den Ent, J. Löwe, *J Biochem Biophys Methods* **2006**, *67*, 67–74.
- [114] S. R. Bond, C. C. Naus, *Nucleic Acids Res* **2012**, *40*, 209–213.
- [115] P. S. Aranda, D. M. LaJoie, C. L. Jorcyk, *Electrophoresis* **2013**, *33*, 366–369.
- [116] C. A. Schneider, W. S. Rasband, K. W. Eliceiri, *Nat Methods* **2012**, *9*, 671–675.
- [117] D. Summerer, A. Marx, *Angewandte Chemie - International Edition* **2002**, *41*, 3620–3622.
- [118] “Dual labeled Probes, <https://www.jenabioscience.com/molecular-biology/real-time-pcr/dual-labeled-fluorescent-probes/dabcyl-quencher>,” **2019**.
- [119] C. A. Schneider, W. S. Rasband, K. W. Eliceiri, *Nat Methods* **2012**, *9*, 671.
- [120] A. S. Halavaty, K. Moffat, *Biochemistry* **2007**, *46*, 14001–14009.
- [121] The PyMOL Molecular Graphics System, *Version 1.3 Schrödinger, LLC* **2010**.

- [122] J. J. Dunn, F. W. Studier, *J Mol Biol* **1983**, *166*, 477–535.
- [123] “The QIAexpressionist,
<https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=79ca2f7d-42fe-4d62-8676-4cfa948c9435&lang=en>,” **2019**.
- [124] P. S. Aranda, D. M. LaJoie, C. L. Jorcyk, *Electrophoresis* **2013**, *33*, 366–369.
- [125] M. J. Davies, R. J. W. Truscott, in *Sun Protection in Man* (Ed.: P.U.B.T.-C.S. in P. Giacomoni), Elsevier, **2001**, pp. 251–275.
- [126] D. I. Pattison, A. S. Rahmanto, M. J. Davies, *Photochemical and Photobiological Sciences* **2012**, *11*, 38–53.
- [127] W. J. Schreier, P. Gilch, W. Zinth, *Annu Rev Phys Chem* **2015**, *66*, 497–519.
- [128] J. Nolting, G. Dittmar, *DOZ Optometrie* **2005**, *11*, 32–34.
- [129] “<https://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/dna-rna-purification-analysis/nucleic-acid-gel-electrophoresis/dna-stains/etbr.html>,” **2019**.
- [130] E. M. S. Stennett, G. Kodis, M. Levitus, *ChemPhysChem* **2012**, *13*, 909–913.
- [131] M. A. Smith, F. H. Arnold, *Methods in Molecular Biology* **2014**, *1179*, 335–343.
- [132] J. B. Endelman, J. J. Silberg, Z. G. Wang, F. H. Arnold, *Protein Engineering, Design and Selection* **2004**, *17*, 589–594.
- [133] M. Ostermeier, *Protein Engineering, Design and Selection* **2005**, *18*, 359–364.
- [134] S. R. K. Ainaravapu, J. Brujić, H. H. Huang, A. P. Wiita, H. Lu, L. Li, K. A. Walther, M. Carrion-Vazquez, H. Li, J. M. Fernandez, *Biophys J* **2007**, *92*, 225–233.
- [135] K. Severinov, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2001**, *98*, 5–7.
- [136] P. E. Montesana, S. T. Chin-Bow, R. Sousa, W. T. McAllister, *J Mol Biol* **2000**, *302*, 1049–1062.
- [137] L. G. Brieba, V. Gopal, R. Sousa, *Journal of Biological Chemistry* **2001**, *276*, 10306–10313.
- [138] S. Tabor, C. C. Richardson, **1985**, *82*, 1074–1078.
- [139] T. H. Segall-Shapiro, A. J. Meyer, A. D. Ellington, E. D. Sontag, C. a Voigt, *Mol Syst Biol* **2014**, *10*, 742.
- [140] D. L. Shis, M. R. Bennett, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2013**, *110*, 5028–5033.
- [141] M. Bertoni, F. Kiefer, M. Biasini, L. Bordoli, T. Schwede, *Sci Rep* **2017**, *7*, 10480.
- [142] N. Guex, M. C. Peitsch, T. Schwede, *Electrophoresis* **2009**, *30*, S162–S173.
- [143] A. Waterhouse, M. Bertoni, S. Bienert, G. Studer, G. Tauriello, R. Gumienny, F. T. Heer, T. A. P. de Beer, C. Rempfer, L. Bordoli, R. Lepore, T. Schwede, *Nucleic Acids Res* **2018**, *46*, W296–W303.
- [144] S. Bienert, A. Waterhouse, T. A. P. de Beer, G. Tauriello, G. Studer, L. Bordoli, T. Schwede, *Nucleic Acids Res* **2016**, *45*, D313–D319.
- [145] P. Benkert, M. Biasini, T. Schwede, *Bioinformatics* **2010**, *27*, 343–350.

- [146] A. Panjkovich, X. Daura, *Bioinformatics* **2014**, 30, 1314–1315.
- [147] "<http://scratch.proteomics.ics.uci.edu/>"
- [148] C. N. Magnan, P. Baldi, *Bioinformatics* **2014**, 30, 2592–2597.
- [149] J. Cheng, A. Z. Randall, M. J. Sweredoski, P. Baldi, *Nucleic Acids Res* **2005**, 33, 72–76.

8. Anhang

8.1. Plasmidkarten der Konstrukte SB2-SB5 und SB3V1-SB3V3

pQET7SB2

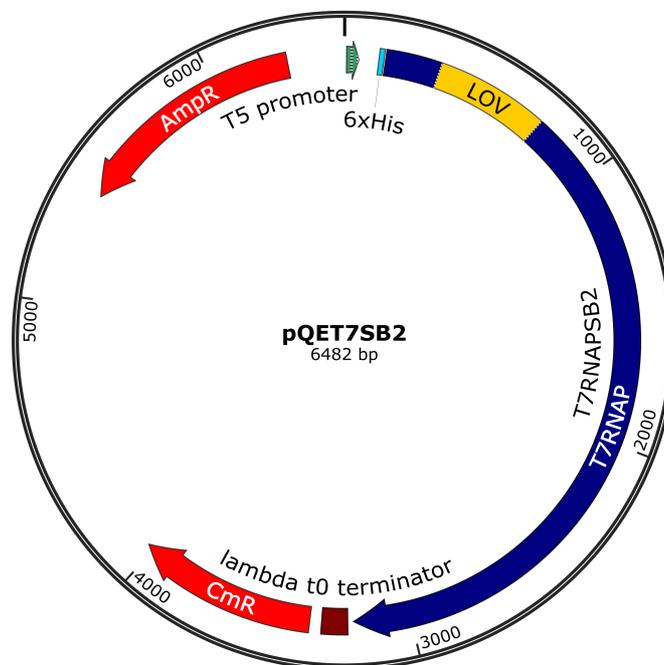


Abbildung 42: Plasmidkarte pQET7SB52 (6482 bp). Blau: T7RNAP; Gelb: LOV-Insert; Türkis: His₆-Tag; Grün: T5-Promotor; Dunkelrot: Lambda-Terminator; Rot: Antibiotikaresistenzgene Chloramphenicol-Acetyltransferase (CmR) und β -Lactamase (AmpR).

pQET7SB3

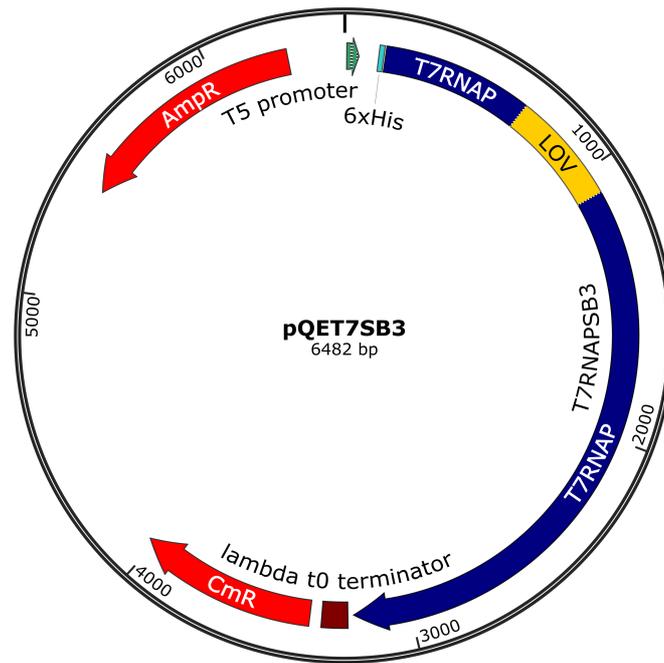


Abbildung 43: Plasmidkarte pQET7SB3 (6482 bp). Blau: T7RNAP; Gelb: LOV-Insert; Türkis: His₆-Tag; Grün: T5-Promotor; Dunkelrot: Lambda-Terminator; Rot: Antibiotikaresistenzgene Chloramphenicol-Acetyltransferase (CmR) und β -Lactamase (AmpR).

pQET7SB4

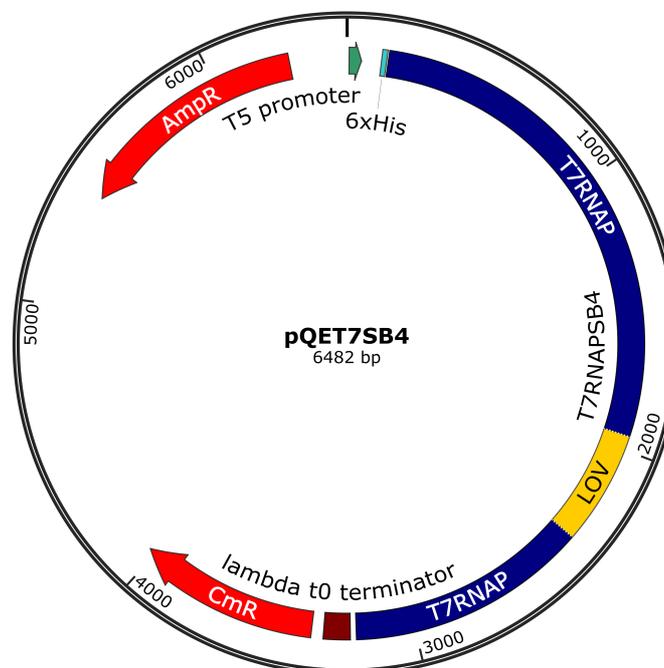


Abbildung 44: Plasmidkarte pQET7SB4 (6482 bp). Blau: T7RNAP; Gelb: LOV-Insert; Türkis: His₆-Tag; Grün: T5-Promotor; Dunkelrot: Lambda-Terminator; Rot: Antibiotikaresistenzgene Chloramphenicol-Acetyltransferase (CmR) und β -Lactamase (AmpR).

pQET7SB5

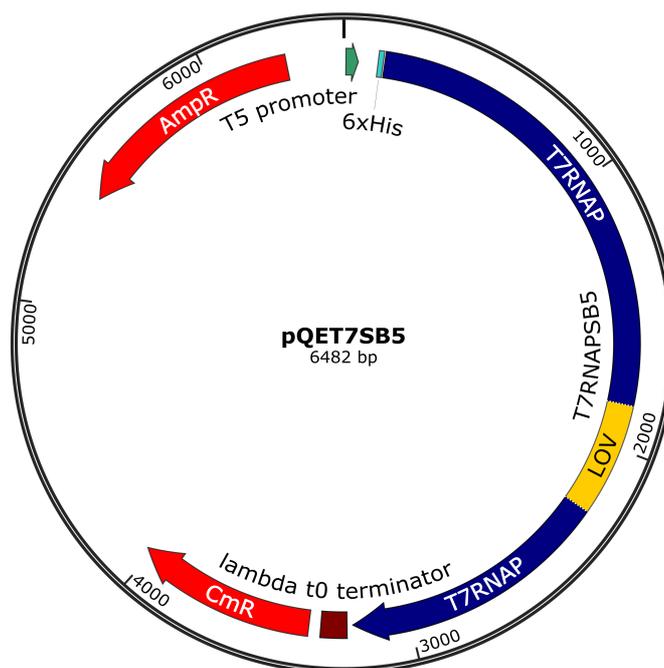


Abbildung 45: Plasmidkarte pQET7SB5 (6482 bp). Blau: T7RNAP; Gelb: LOV-Insert; Türkis: His₆-Tag; Grün: T5-Promotor; Dunkelrot: Lambda-Terminator; Rot: Antibiotikaresistenzgene Chloramphenicol-Acetyltransferase (CmR) und β -Lactamase (AmpR).

pQET7SB3V1

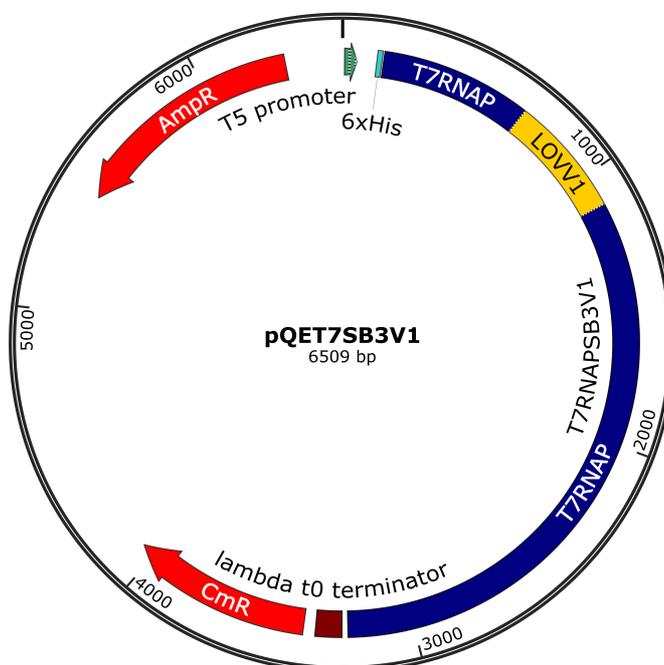


Abbildung 46: Plasmidkarte pQET7SB3V1 (6509 bp). Blau: T7RNAP; Gelb: LOV-Insert; Türkis: His₆-Tag; Grün: T5-Promotor; Dunkelrot: Lambda-Terminator; Rot: Antibiotikaresistenzgene Chloramphenicol-Acetyltransferase (CmR) und β -Lactamase (AmpR).

pQET7SB3V2

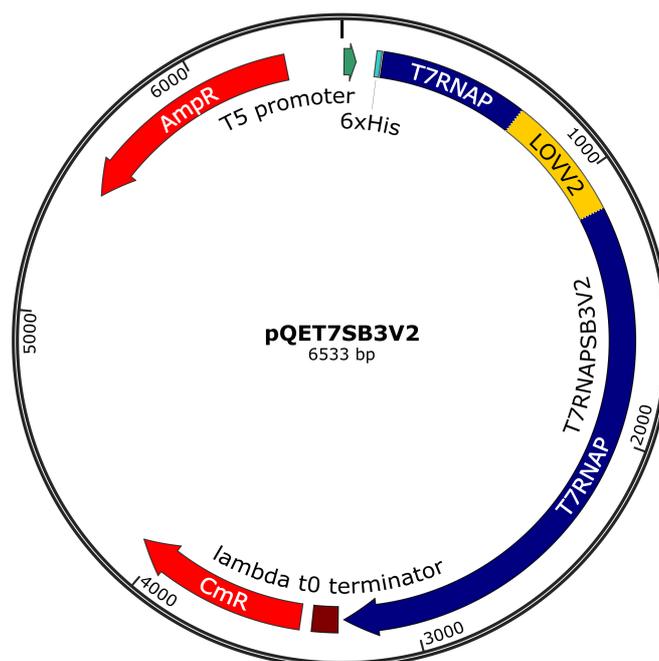


Abbildung 47: Plasmidkarte pQET7SB3V2 (6533 bp). Blau: T7RNAP; Gelb: LOV-Insert; Türkis: His₆-Tag; Grün: T5-Promoter; Dunkelrot: Lambda-Terminator; Rot: Antibiotikaresistenzgene Chloramphenicol-Acetyltransferase (CmR) und β -Lactamase (AmpR).

pQET7SB3V3

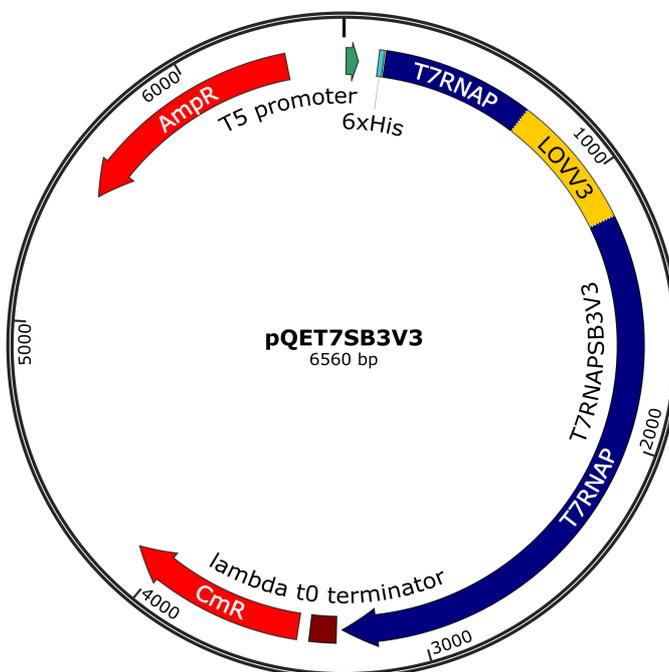


Abbildung 48: Plasmidkarte pQET7SB3V3 (6560 bp). Blau: T7RNAP; Gelb: LOV-Insert; Türkis: His₆-Tag; Grün: T5-Promoter; Dunkelrot: Lambda-Terminator; Rot: Antibiotikaresistenzgene Chloramphenicol-Acetyltransferase (CmR) und β -Lactamase (AmpR).

8.2. Aminosäuresequenzen T7RNAP-WT und T7RNAP-LOV2 Varianten

Legende: His₆-Tag (gelb), LOV2 Insert (blau), C-terminale Modifikation von LOV2 (türkis), Mutationen in T7RNAP (orange).

T7RNAP-WT

MW = 100235,74 Da; pI = 7,00; 895 AS

MRGS^{HHHHHH}GSLNTINIAKNDFSDIELAAIPFNTLADHYGERLAREQLALEHESYEMGEAR
FRKMSERQLKAGEVADNAAKPLITLLPKMIARINDWFEEVKAKRGKRPTAFQFLQEIKPEA
VAYITIKTTLACLTSADNTTVQAVASAIGRAIEDEARFGRIRDLEAKHFKKNVEEQLNKRVGHV
YKAFMQVVEADMLSKGLLGGEAWSSWHKEDSIHVGVRCEIEMLIESTGMVSLHRQNV^GVV
GQDSETIELAPEYAEAIATRAGALAGISPMFQPCVPPKPWTGITGGGYWANGRRPLALVR
THSKKALMRYEDVYMPEVYKAINIAQNTAWKINKKVLAVANVITKWKHCPVEDIPAIEREELP
MKPEDIDMNPEALTAWKRAAAVYRKDKARKSRRISLEFMLEQANKFANHKAIWFPYNMD
WRGRVYAVSMFNPQGNDMTKGLLTLAKGKPIGKEGYWLNKIHGANCAGVDKVPFPERIKFI
EENHENIMACAKSPLENTWWAEQDSPFCFLAFCFEYAGVQHHGLSYNCSLPLAFDGS^{CSGI}
QHFSAMLRDEVGGRAVNLLPSETVQDIYGIVAKK^VNEILQADAINGTDNEVVTVDENTGEIS
EKV^KLGTKALAGQWLAYGVTRSVTKRSVMTLAYGSKEFGFRQQVLEDTIQPAIDSGKGLMF
TQPNQAAGYMAKLIWESVSVTVVAAVEAMNWLKSAKLLAAEVKDKKTGEILRKCAVHWV
TPDGFVWQEYKPIQTRLNLMFLGQFRLQPTINTNKDSEIDAHKQESGIAPNFVHSQDGS
LRKTVVWAHEKYGIESFALIHDSFGTIPADAANLFKAVRETMVDTYESCDVLADFYDQFADQ
LHESQLDKMPALPAKG^NLNLRDILESDF^A

SB2

MW = 115887,56 Da; pI = 6,89; 1030 AS

MRGS^{HHHHHH}GSLNTINIAKNDFSDIELAAIPFNTLADHYGERLAREQLALEHESYEMGEAR
FRKMSERQLKAGEVAD^{KLATTLERIEKNFVITDPRLPDNPIIFASDSFLQLTEYSREEILGRNC}
^{RFLQGPETDRATVRKIRDAIDNQTEVTVQLIN^YTKSGKFWNLFHLQPMRDQKGDVQYFIGV}
^{QLDGT^EHVRDAAEREGVMLIKKTA^E}NAAKPLITLLPKMIARINDWFEEVKAKRGKRPTAF
QFLQEIKPEAVAYITIKTTLACLTSADNTTVQAVASAIGRAIEDEARFGRIRDLEAKHFKKNVE
EQLNKRVGHVYKAFMQVVEADMLSKGLLGGEAWSSWHKEDSIHVGVRCEIEMLIESTGMV
SLHRQNV^GVVVGQDSETIELAPEYAEAIATRAGALAGISPMFQPCVPPKPWTGITGGGYWA
NGRRPLALVRTHSKKALMRYEDVYMPEVYKAINIAQNTAWKINKKVLAVANVITKWKHCPVE
DIPAIEREELPMKPEDIDMNPEALTAWKRAAAVYRKDKARKSRRISLEFMLEQANKFANHK
AIWFPYNMDWRGRVYAVSMFNPQGNDMTKGLLTLAKGKPIGKEGYWLNKIHGANCAGVDK
VPFPERIKFIEENHENIMACAKSPLENTWWAEQDSPFCFLAFCFEYAGVQHHGLSYNCSLPL
AFDGS^{CSGI}QHFSA^{MLR}DEVGGRAVNLLPSETVQDIYGIVAKK^VNEILQADAINGTDNEVVT
VDENTGEISEKV^KLGTKALAGQWLAYGVTRSVTKRSVMTLAYGSKEFGFRQQVLEDTIQ
AIDSGKGLMFTQPNQAAGYMAKLIWESVSVTVVAAVEAMNWLKSAKLLAAEVKDKKTGEI
LRKCAVHWVTPDGFVWQEYKPIQTRLNLMFLGQFRLQPTINTNKDSEIDAHKQESGIAP
NFVHSQDGS^{HLR}KTVVWAHEKYGIESFALIHDSFGTIPADAANLFKAVRETMVDTYESCDVL
ADFYDQFADQLHESQLDKMPALPAKG^NLNLRDILESDF^A

SB3

MW = 115887,56 Da, pl = 6,89; 1030 AS

MRGS**HHHHHH**GSLNTINIAKNDFSDIELAAIPFNTLADHYGERLAREQLALEHESYEMGEAR
FRKMSERQLKAGEVADNAAKPLITLLPKMIARINDWFEEVKAKRGKRPTAFQFLQEIKPEA
VAYITIKTTLACLTSADNTTVQAVASAIGRAIEDEARFGRIRDLEAKHFKNVVEEQLNKRVGHV
YK**KLATTLERIEKNFVITDPRLPDNPIIFASDSFLQLTEYSREEILGRNCRFLQGPETDRATVR**
KIRDAIDNQTEVTVQLINITYKSGKKFWNLFHLQPMRDQKGDVQYFIGVQLDGTTEHVRDAE
REGVMLIKKTAEKAFMQVVEADMLSKGLLGGEAWSSWHKEDSIHVGVRCEIEMLIESTGMVS
LHRQNVGVVGGDSETIELAPEYAEAIATRAGALAGISPMFQPCVPPKPWTGITGGGYWAN
GRRPLALVRTHSKKALMRYEDVYMPEVYKAINIAQNTAWKINKKVLAVANVITKWKHCPVED
IPAIEREELPMKPEDIDMNPEALTAWKRAAAVYRKDKARKSRRISLEFMLEQANKFANHKA
WFPYNMDWRGRVYAVSMFNPQGNDMTKGLLTLAKGKPIGKEGYWLVKIHGANCAGVDKV
PFFPERIKFIEENHENIMACAKSPLNTWWAEQDSPFCFLAFCEYAGVQHHGLSYNCSLPLA
FDGSCSGIQHFSAMLRDEVGGRAVNLPLSETVQDIYGIVAKKVNEILQADAINGTDNEVVTVT
DENTGEISEKVKLGTKALAGQWLAYGVTRSVTKRSVMTLAYGSKEFGFRQQVLEDTIQPAID
SGKGLMFTQPNQAAGYMAKLIWESVSVTVVAAVEAMNWLKSAKLLAAEVKDKKTGEILRK
RCAVHWVTPDGFPVWQEYKKPIQTRLNLMFLGQFRLQPTINTNKDSEIDAHKQESGIAPNF
VHSQDGSHLRKTVVWAHEKYGIESFALIHDSFGTIPADAANLFKAVRETMVDTYESCDVLAD
FYDQFADQLHESQLDKMPALPAKGNNLRDILESDFafa

SB4

MW = 115887,56 Da; pl = 6,89; 1030 AS

MRGS**HHHHHH**GSLNTINIAKNDFSDIELAAIPFNTLADHYGERLAREQLALEHESYEMGEAR
FRKMSERQLKAGEVADNAAKPLITLLPKMIARINDWFEEVKAKRGKRPTAFQFLQEIKPEA
VAYITIKTTLACLTSADNTTVQAVASAIGRAIEDEARFGRIRDLEAKHFKNVVEEQLNKRVGHV
YKAFMQVVEADMLSKGLLGGEAWSSWHKEDSIHVGVRCEIEMLIESTGMVSLHRQNVGVV
GGDSETIELAPEYAEAIATRAGALAGISPMFQPCVPPKPWTGITGGGYWANGRRPLALVR
THSKKALMRYEDVYMPEVYKAINIAQNTAWKINKKVLAVANVITKWKHCPVEDIPAIEREELP
MKPEDIDMNPEALTAWKRAAAVYRKDKARKSRRISLEFMLEQANKFANHKAIFWFPYNMD
WRGRVYAVSMFNPQGNDMTKGLLTLAKGKPIGKEGYWLVKIHGANCAGVDKVPFFPERIKFI
EENHENIMACAKSPLNTWWAEQDSPFCFLAFCEYAGVQHHGLSYNCSLPLAFDGS
CSGIQHFSAMLRDEVGGRAVNLPLSETVQDIYGIVAKKVNEILQADAINGTDNEVVTVTDE**KLATTL**
ERIEKNFVITDPRLPDNPIIFASDSFLQLTEYSREEILGRNCRFLQGPETDRATVRKIRDAIDN
QTEVTVQLINITYKSGKKFWNLFHLQPMRDQKGDVQYFIGVQLDGTTEHVRDAEAEREGVMLIK
KTAENTGEISEKVKLGTKALAGQWLAYGVTRSVTKRSVMTLAYGSKEFGFRQQVLEDTIQP
AIDSGKGLMFTQPNQAAGYMAKLIWESVSVTVVAAVEAMNWLKSAKLLAAEVKDKKTGEI
LRKCAVHWVTPDGFPVWQEYKKPIQTRLNLMFLGQFRLQPTINTNKDSEIDAHKQESGIAP
NFVHSQDGSHLRKTVVWAHEKYGIESFALIHDSFGTIPADAANLFKAVRETMVDTYESCDVL
ADFYDQFADQLHESQLDKMPALPAKGNNLRDILESDFafa

SB5

MW = 115887,56 Da; pl = 6,89; 1030 AS

MRGS**HHHHH**GSLNTINIAKNDFSDIELAIPFNTLADHYGERLAREQLALEHESYEMGE
 ARFRKM**S**ERQLKAGEVADNAAAKPLITLLPKMIARINDWFEEVKAKRGKRPTAFQFLQE
 IKPEAVAYITIKTTLACLTSADNTTVQAVASAI GRAIEDEARFGRIRDLEAKHFKNVEE
 QLNKRVGHVYK**K**AFMQVVEADMLSKGLLGGEAWSSWHKEDSIHVGVRCEIEMLIESTGMVS
 LHRQ**N**VGVVGDSETIELAPEYAEAIATRAGALAGISPMFQPCVPPKPWTGITGGGYWA
 NGRRPLALVRTHSKKALMRYEDVYMPEVYKAINIAQNTAWKINKKVLAVANVITKWKHCP
 VEDIPAIEREELPMKPEDIDMNPEALTAWKRAAAAVYRKDKARKSRRISLEFMLEQANKF
 ANHKAIWFPYNMDWRGRVYAVSMFNPQGNDMTKGLLTLAKGKPIGKEGYWLNKIHGANCA
 GVDKVPFPERIKFIEENHENIMACAKSPLNTWWAEQDSPFCFLAFCFEYAGVQHHGLSY
 NCSLPLAFDGS CSGIQHFSAMLRDEVGGRAVNULLPS**FLATTLERIEKNFVITDPRLPDNP**
IIFASDSFLQLTEYSREEILGRNCRFLQGPETDRATVRKIRDAIDNQTEVTVQLINITYKS
GKKFWNLFHLQPMRDQKGDVQYFIGVQLDGT EHV RDA AEREGVMLIKKTAETVQDIYGI
 VAKKVNEILQADAINGTDNEVTVTDENTGEISEKVKLGTKALAGQWLAYGVTRSVTKRS
 VMTLAYGSKEFGFRQQVLEDTIQPAIDSGKGLMFTQPNQAAGYMAKLIWESVSVTVVAAV
 EAMNWLKSAAKLLAAEVKDKKTGEILRKRCVHWVTPDGFVWQEYKKPIQTRLNLMFLG
 QFRLQPTINTNKDSEIDAHKQESGIAPNFVHSQDGSHLRKTVVWAHEKYGIESFALIHDS
 FGTIPADAANLFKAVRETMVDTYESCVDLADFYDQFADQLHESQLDKMPALPAKGNLNL
 DILESDFAFA

SB3V1

MW = 116871,64 Da; pl = 6,69; 1039 AS

MRGS**HHHHH**GSLNTINIAKNDFSDIELAIPFNTLADHYGERLAREQLALEHESYEMGE
 ARFRKM**S**ERQLKAGEVADNAAAKPLITLLPKMIARINDWFEEVKAKRGKRPTAFQFLQE
 IKPEAVAYITIKTTLACLTSADNTTVQAVASAI GRAIEDEARFGRIRDLEAKHFKNVEE
 QLNKRVGHVYK**K**LATTLERIEKNFVITDPRLPDNP**IIFASDSFLQLTEYSREEILGRNCR**
FLQGPETDRATVRKIRDAIDNQTEVTVQLINITYKSGKKFWNLFHLQPMRDQKGDVQYFIG
VQLDGT EHV RDA AEREGVMLIKKTAENIDEAAKELKAFMQVVEADMLSKGLLGGEAWSSW
 HKEDSIHVGVRCEIEMLIESTGMVSLHRQ**N**VGVVGDSETIELAPEYAEAIATRAGALAGI
 SPMFQPCVPPKPWTGITGGGYWANGRRPLALVRTHSKKALMRYEDVYMPEVYKAINIAQ
 NTAWKINKKVLAVANVITKWKHCPVEDIPAIEREELPMKPEDIDMNPEALTAWKRAAAAV
 YRKDKARKSRRISLEFMLEQANKFANHKAIWFPYNMDWRGRVYAVSMFNPQGNDMTKGLL
 TLAKGKPIGKEGYWLNKIHGANCAGVDKVPFPERIKFIEENHENIMACAKSPLNTWWAE
 QDSPFCFLAFCFEYAGVQHHGLSYNCSLPLAFDGS CSGIQHFSAMLRDEVGGRAVNULLPS
 ETVQDIYGIVAKKVNEILQADAINGTDNEVTVTDENTGEISEKVKLGTKALAGQWLAYG
 VTRSVTKRSVMTLAYGSKEFGFRQQVLEDTIQPAIDSGKGLMFTQPNQAAGYMAKLIWES
 VSVTVVAAVEAMNWLKSAAKLLAAEVKDKKTGEILRKRCVHWVTPDGFVWQEYKKPIQ
 TRNLMFLGQFRLQPTINTNKDSEIDAHKQESGIAPNFVHSQDGSHLRKTVVWAHEKYGI
 ESFALIHDSFGTIPADAANLFKAVRETMVDTYESCVDLADFYDQFADQLHESQLDKMPAL
 PAKGNLNLRDILESDFAFA

SB3V2

MW = 117644,41 Da; pl = 6,61; 1047 AS

MRGSHHHHHHGS LNTINIAKNDFSDIELAAIPFNTLADHYGERLAREQLALEHESYEMGE
 ARFRKMSERQLKAGEVADNAAAKPLITLLPKMIARINDWFEEVKAKRGKRPTAFQFLQE
 IKPEAVAYITIKTTLACLTSADNTTVQAVASAI GRAIEDEARFGRIRDLEAKHFKNVEE
 QLNKRVGHVYK KLATTLERIEKNFVITDPRLPDNPIIFASDSFLQLTEYSREEILGRNCR
 FLQGPETDRATVRKIRDAIDNQTEVTVQLINYTKSGKKFWNLFHLQPMRDQKGDVQYFIG
 VQLDGT EHV RDAAEREGVMLIKKTAENIDEAAKTAENIDEAAK KAFMQVVEADMLSKGLL
 GGEAWSSWHKEDSIHVGVRCEIEMLIESTGMVSLHRQNVGVVGQDSETIELAPEYAEAIAT
 RAGALAGISPMFQPCVPPKPWTGITGGGYWANGRRPLALVRTHSKKALMRYEDVYMPEV
 YKAINIAQNTAWKINKKVLAVANVITKWKHCPVEDIPAIEREELPMKPEDIDMNPEALTA
 WKRAAAAVYRKDKARKSRRISLEFMLEQANKFANHKAIFPYNMDWRGRVYAVSMFNPQ
 GNDMTKGLLTLAKGKPIGKEGYW LKIHGANCAGVDKVPFPERIKFIEENHENIMACAKSP
 LENTWWAEQDSPFCFLAFCFEYAGVQHHGLSYNCSLPLAFDGS CSGIQHFSAMLRDEVGG
 RAVNLLPSETVQDIYGIVAKKVNEILQADAINGTDNEVVTVTDENTGEISEKVKLGTKAL
 AGQWLAYGVTRSVTKRSVMTLAYGSKEFGFRQQVLEDTIQPAIDSGKGLMFTQPNQAAGY
 MAKLIWESVSVTVVA AVEAMNWLKSAAKLLAAEVKDKKTGEILRKRCVHVWVTPDGFVW
 QEYKPIQTRLNLMFLGQFRLQPTINTNKDSEIDA HKQESGIAPNFVHSQDGSHLRKT VV
 WAHEKYGIESFALIHDSFGTIPADAANLFKAVRETMVDTYESCDVLADFYDQFADQLHES
 QLDKMPALPAKGNLNL RDILESDF AFA

SB3V3

MW = 118667,71 Da; pl = 6,79; 1056 AS

MRGSHHHHHHGS LNTINIAKNDFSDIELAAIPFNTLADHYGERLAREQLALEHESYEMGE
 ARFRKMSERQLKAGEVADNAAAKPLITLLPKMIARINDWFEEVKAKRGKRPTAFQFLQE
 IKPEAVAYITIKTTLACLTSADNTTVQAVASAI GRAIEDEARFGRIRDLEAKHFKNVEE
 QLNKRVGHVYK KLATTLERIEKNFVITDPRLPDNPIIFASDSFLQLTEYSREEILGRNCR
 FLQGPETDRATVRKIRDAIDNQTEVTVQLINYTKSGKKFWNLFHLQPMRDQKGDVQYFIG
 VQLDGT EHV RDAAEREGVMLIKKTAENIDEAAKREGVMLIKKTAENIDEAAK KAFMQVVEAD
 MLSKGLL GGEAWSSWHKEDSIHVGVRCEIEMLIESTGMVSLHRQNVGVVGQDSETIELAPEY
 AEAIATRAGALAGISPMFQPCVPPKPWTGITGGGYWANGRRPLALVRTHSKKALMRYEDV
 YMPEVYKAINIAQNTAWKINKKVLAVANVITKWKHCPVEDIPAIEREELPMKPEDIDMNPEAL
 TAWKRAAAAVYRKDKARKSRRISLEFMLEQANKFANHKAIFPYNMDWRGRVYAVSMFNP
 QGNDMTKGLLTLAKGKPIGKEGYW LKIHGANCAGVDKVPFPERIKFIEENHENIMACAKSP
 LENTWWAEQDSPFCFLAFCFEYAGVQHHGLSYNCSLPLAFDGS CSGIQHFSAMLRDEVGG
 RAVNLLPSETVQDIYGIVAKKVNEILQADAINGTDNEVVTVTDENTGEISEKVKLGTKALAGQ
 WLAYGVTRSVTKRSVMTLAYGSKEFGFRQQVLEDTIQPAIDSGKGLMFTQPNQAAGYMAK
 LIWESVSVTVVA AVEAMNWLKSAAKLLAAEVKDKKTGEILRKRCVHVWVTPDGFVWQEYK
 KPIQTRLNLMFLGQFRLQPTINTNKDSEIDA HKQESGIAPNFVHSQDGSHLRKT VVWAHEKY
 GIESFALIHDSFGTIPADAANLFKAVRETMVDTYESCDVLADFYDQFADQLHESQLDKMPAL
 PAKGNLNL RDILESDF AFA



Danksagung

Zunächst danke ich Prof. Dr. Susanne Brakmann für die Aufnahme in die Arbeitsgruppe, die Betreuung, konstruktiven Gespräche und die stetige Begleitung von der Masterarbeit bis zur Dissertation.

Weiterhin bedanke ich mich bei Prof. Dr. Daniel Summerer für die Übernahme der Tätigkeit als Zweitgutachter.

Ein besonderer Dank gilt auch meiner Kollegin M.Sc. Anne Drathen, dem Arbeitskreis Rauh, Summerer und Dehmelt für praktische Hilfestellung, fachliche Diskussionen und viele nette Mittagessen und Gespräche.

Ebenso danke ich Dr. Christiane Ehart für die tolle Zusammenarbeit und die Durchführung der MD-Simulationen.

Ich danke auch den Studenten Stefan Schmeing, Denice Weklak, Damian Schiller, Melissa Lubeck und Lena Lückfeldt, die durch Ihren motivierten Einsatz ebenfalls Teil des Projektes waren und dieses vorangetrieben haben.

Außerdem möchte ich natürlich meinen Eltern Heike, Ralf und Benno für die stetige Unterstützung und den guten Zuspruch während meiner gesamten Studienzeit danken.

Zudem danke ich meinem Partner Mark und meinen Freunden Magda und Andi, dass Sie immer ein offenes Ohr für aufkommende Herausforderungen hatten.