

# Optogenetische, allosterische Regulierung der enzymatischen Aktivität am Beispiel der T7- RNA-Polymerase

## **Dissertation**

Zur Erlangung des akademischen Grades Doktor der  
Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

Der Fakultät Chemie und Chemische Biologie der  
Technischen Universität Dortmund

vorgelegt von

**M. Sc. Daniel Hafki**

geboren am 28.12.1991

Dortmund 2025



---

*„Es gibt keine Landstraße für die Wissenschaft,  
und nur diejenigen haben Aussicht ihre lichten Höhen zu erreichen,  
die die Mühe nicht scheuen, ihre steilen Pfade zu erklimmen.“*

Karl Marx



---

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von März 2019 bis Februar 2025 unter der Leitung von Fr. Prof. Dr. Brakmann im Fachbereich Chemische Biologie der Fakultät für Chemie und Chemische Biologie der Technischen Universität Dortmund angefertigt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Bachelorarbeiten von Martin Krümpel (2019), Lisa Johannknecht (2019), Jennifer Orłowsky (2020), Sophie Kochems (2021), Lutz Kremer (2022), Nico Hornkamp (2023), Annalena Kühn (2023), Daniel Pietrus (2024) und Jonas Alda (2024), sowie die Masterarbeit von Max-Luca Heitland (2024) betreut. Die Resultate dieser Arbeiten sind an den entsprechenden Stellen durch Literaturverweise gekennzeichnet.



---

## Publikationen

- [1] D. Hafki, J. Alda, D. Pietrus, S. Brakmann, *Chembiochem* **2024**, e202400536.



---

## Danksagung

Zunächst möchte ich Prof. Dr. Susanne Brakmann meinen Dank aussprechen. Sie hat mir dieses anspruchsvolle Forschungsprojekt anvertraut und mich während der Anfertigung meiner Arbeit mit ihrer Expertise unterstützt. Sie fungierte bei auftretenden Problemen als Ansprechpartnerin und Mentorin und stand jederzeit als Unterstützerin zur Verfügung. Die gemeinsamen, nicht selten kontroversen Diskussionen förderten unterschiedliche Perspektiven und trugen zu meiner persönlichen und wissenschaftlichen Entwicklung bei. Ich möchte ihr an dieser Stelle meinen aufrichtigen Dank aussprechen.

Des Weiteren möchte ich Prof. Dr. Hannes Mutschler meinen Dank aussprechen, der das Korreferat übernommen hat.

Zudem möchte ich Prof. Dr. Daniel Rauh meinen Dank dafür aussprechen, dass er die außergewöhnliche und keinesfalls als selbstverständlich zu betrachtende Labor-Infrastruktur zur Verfügung gestellt hat.

An dieser Stelle sei Priv.-Doz. Dr. Leif Dehmelt und Carolin Gierse für die Bereitstellung des Equipments und die Durchführung der Messungen am Zellmikroskop sowie für die erfolgreiche Zusammenarbeit gedankt.

Darüber hinaus möchte ich der gesamten AG Rauh, der AG Dehmelt und der AG Summerer danken. Die vielen angenehmen und erkenntnisreichen Gespräche im Laboralltag haben wesentlich zu meiner persönlichen und wissenschaftlichen Entwicklung beigetragen und den Alltag aufgelockert.

Des Weiteren gebührt Dr. Matthias Müller und Dr. Raphael Gasper-Schönenbrücher (Max-Planck-Institut, Dortmund) mein Dank für die zahlreichen Messungen am Synchrotron und die kontinuierliche Bereitschaft, jederzeit als Ansprechpartner für Fragen zur Verfügung zu stehen.

Ich möchte an dieser Stelle all jenen Studierenden meinen Dank aussprechen, die ich im Rahmen dieser Arbeit betreut habe. Ihre innovative und kreative Herangehensweise hat mich kontinuierlich mit neuen Ideen versorgt und zu einem fruchtbaren Austausch beigetragen. Das kollegiale Miteinander im Team und die tägliche Zusammenarbeit haben wesentlich zu meiner Freude an der Arbeit beigetragen. Die Betreuung hat mich zudem in meiner didaktischen Kompetenz weiterentwickelt und zu meiner Entwicklung als Lehrender beigetragen. Ein besonderer Dank gilt an dieser Stelle Jonas Alda und Daniel Pietrus für die Klonierung, Expression und Reinigung von acht neuen Fusionsproteinen.

Es ist mir ein Anliegen, auch jenen Personen, die nicht der Universität angehören, meinen besonderen Dank auszusprechen. Sie haben mich während meiner gesamten akademischen Laufbahn unterstützt und ermutigt. Ein besonderer Dank gebührt meinen Freunden und meiner Familie für die unermüdliche Unterstützung während meines Studiums und der Anfertigung dieser Doktorarbeit. Ihr habt sehr großen Anteil daran und ohne euch hätte ich es nicht geschafft. Dafür möchte ich mich herzlich bedanken.



## Abkürzungsverzeichnis

|          |         |  |
|----------|---------|--|
| <b>A</b> | a.u.    | willkürliche Einheit (engl. <i>Arbitrary unit</i> )  |
|          | AEX     | Anionenaustauschromatographie (engl. <i>Anion exchange chromatography</i> )                          |
|          | AF      | AlphaFold  |
|          | AGE     | Agarosegelelektrophorese   |
|          | APS     | Ammoniumperoxodisulfat   |
|          | AS      | Aminosäure(n)  |
|          | ATP     | Adenosintriphosphat  |
| <b>B</b> | Bp      | Basenpaare   |
|          | BFM     | Biofeuchtmasse   |
| <b>C</b> | cAMP    | cyclisches Adenosinmonophosphat  |
| <b>D</b> | DNA     | Desoxyribonukleinsäure (engl. <i>Deoxyribonucleic acid</i> )   |
|          | 3'-dGTP | 3'-Desoxyguanosintriphosphat   |
|          | dNTP    | Desoxyribonukleosidtriphosphat   |
|          | DMSO    | Dimethylsulfoxid   |
|          | ds      | doppelsträngig   |
|          | DTT     | 1,4-Dithiothreitol   |
|          | DZ      | Dunkelzustand  |
| <b>E</b> | ESRF    | Europäische Synchrotronstrahlungseinrichtung (engl. <i>European Synchrotron Radiation Facility</i> ) |
| <b>F</b> | FAD     | Flavin-Adenin-Dinukleotid  |
|          | FMN     | Flavin-Mononukleotid   |
| <b>H</b> | HTS     | Hochdurchsatz-Screening (engl. <i>High throughput screening</i> )                                    |
| <b>I</b> | ISC     | <i>intersystem crossing</i>  |
|          | IVT     | <i>in-vitro</i> -Transkriptionsreaktion  |
| <b>L</b> | LB      | <i>Lysogeny broth</i>  |
|          | LOV     | Licht-Sauerstoff-Spannungs-Domäne (engl. <i>light-oxygen-voltage domain</i> )                        |
|          | LZ      | Lichtzustand   |
| <b>M</b> | MMS     | <i>Microseed-Matrix-Seeding</i>  |
|          | mRNA    | <i>messenger</i> -RNA  |
|          | MSA     | multiple Sequenzalignment (engl. <i>multiple sequence alignment</i> )                                |
| <b>N</b> | nt      | Nukleotide   |

---

|          |          |   |
|----------|----------|---|
|          | NTA      | Nitrilotriessigsäure (engl. <i>nitrilotriacetic acid</i> )  |
| <b>P</b> | PAS      | Per-ARNT-Sim  |
|          | PCR      | Polymerasekettenreaktion (engl. <i>Polymerase chain reaction</i> )  |
|          | PDB      | Proteindatenbank (engl. <i>Protein Data Bank</i> )  |
|          | PEG      | Polyethylenglykol   |
|          | PEI      | Polyethylenimin   |
|          | PMSF     | Phenylmethylsulfonylfluorid   |
| <b>Q</b> | QC-PCR   | Quikchange-PCR  |
| <b>R</b> | RFC-PCR  | Restriktionsfreie Klonierungs-PCR (engl. <i>Restriction free cloning</i> )  |
|          | RFP      | Rotfluoreszierendes Protein (engl. <i>Red fluorescent protein</i> )   |
|          | RFU      | Relative Fluoreszenzeinheiten (engl. <i>Relative fluorescence units</i> )   |
|          | RNA      | Ribonukleinsäure (engl. <i>Ribonucleic acid</i> )   |
|          | rNTP     | Ribonukleosidtriphosphat  |
|          | rpm      | Umdrehungen pro Minute (engl. <i>revolutions per minute</i> )   |
|          | RT       | Raumtemperatur  |
| <b>S</b> | SAA      | Lösemittelzugängliche Fläche (engl. <i>solvent-accessible area</i> )  |
|          | SDS-PAGE | Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (engl. <i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> ) |
|          | SEC      | Größenausschlusschromatographie (engl. <i>Size exclusion chromatography</i> )   |
|          | SG       | SYBR™ Green II  |
|          | SLS      | Synchrotron-Lichtquelle <i>Swiss Light Source</i> , am Paul-Scherrer-Institut, Villingen, Schweiz                             |
|          | SOC      | <i>super optimal broth with catabolite repression</i>   |
|          | SV       | Säulenvolumen   |
| <b>T</b> | T7-RNAP  | T7-RNA-Polymerase   |
|          | TEMED    | Tetramethylethylendiamin  |
|          | TSA      | Schmelzkurvenanalyse (engl. <i>Thermal shift assay</i> )  |

# Inhaltsverzeichnis

|   |             |
|---|-------------|
| <b>Publikationen</b> .....  | <b>VII</b>  |
| <b>Danksagung</b> .....   | <b>IX</b>   |
| <b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....  | <b>XI</b>   |
| <b>Inhaltsverzeichnis</b> .....   | <b>XIII</b> |
| <b>Kurzfassung</b> .....  | <b>XVII</b> |
| <b>Abstract</b> .....   | <b>XIX</b>  |
| <b>1. Einleitung</b> .....  | <b>1</b>    |
| <b>1.1 Kontrolle biochemischer Reaktionen</b> .....                                   | <b>1</b>    |
| <b>1.2 Optogenetische Strategien</b> .....  | <b>2</b>    |
| 1.2.1 Natürliche, lichtensitive Domänen .....   | 3           |
| 1.2.2 Light-oxygen-voltage-(LOV)-Domänen .....  | 4           |
| 1.2.3 Die AsLOV2-Domäne .....   | 5           |
| 1.2.4 Allosterische Regulation von Modellsystemen.....                                | 6           |
| <b>1.3 Die T7-RNA-Polymerase</b> .....  | <b>7</b>    |
| 1.3.1 Funktionsweise der T7-RNA-Polymerase .....                                      | 8           |
| 1.3.2 Split-T7-RNA-Polymerase .....   | 10          |
| 1.3.3 Anwendungsgebiete der T7-RNA-Polymerase .....                                   | 12          |
| 1.3.4 Lichtschaltbare T7-RNA-Polymerasevarianten – Erste Ergebnisse .....             | 13          |
| <b>2. Zielstellung und Motivation</b> .....   | <b>15</b>   |
| <b>3. Ergebnisse und Diskussion</b> .....   | <b>16</b>   |
| <b>3.1 Konstruktdesign und Etablierung der Proteinexpression und -Reinigung</b> ..... | <b>16</b>   |
| <b>3.2 Polymerase-Assay und Michaelis-Menten-Kinetik</b> .....                        | <b>22</b>   |
| <b>3.3 Identifikation neuer Insertionspositionen</b> .....                            | <b>30</b>   |
| <b>3.4 Klonierung, Expression und Reinigung neuer Varianten</b> .....                 | <b>33</b>   |
| <b>3.5 In-vitro-Transkriptionsreaktionen mit Endpunktbestimmung</b> .....             | <b>34</b>   |
| <b>3.6 Optimierung der Schaltbarkeit der Polymerase-Aktivität</b> .....               | <b>38</b>   |
| <b>3.7 Zelluläre Analyse der Lichtschaltbarkeit</b> .....                             | <b>39</b>   |
| <b>3.8 Strukturbiologische Analyse der AlphaFold-Modellierungen</b> .....             | <b>44</b>   |
| <b>3.9 Kristallisationsstudien</b> .....  | <b>47</b>   |
| 3.9.1 Kristallisation der Wildtyp-T7-RNA-Polymerase .....                             | 47          |
| 3.9.2 Kristallisation photoaktiver Varianten der T7-RNA-Polymerase .....              | 53          |
| 3.9.3 Kristallisation verkürzter Konstrukte der photoaktiven Varianten .....          | 54          |
| 3.9.4 Optimierung der Kristallisationsbedingungen für die Variante 179/180v .....     | 58          |
| <b>4. Zusammenfassung und Ausblick</b> .....  | <b>61</b>   |
| <b>5. Material und Methoden</b> .....   | <b>64</b>   |
| <b>5.1 Materialien</b> .....  | <b>64</b>   |

---

|              |  |           |
|--------------|--|-----------|
| 5.1.1        | Geräte und Verbrauchsmaterialien .....   | 64        |
| 5.1.2        | Chemikalien .....  | 66        |
| 5.1.3        | Enzyme .....   | 66        |
| 5.1.4        | Antibiotika .....  | 66        |
| 5.1.5        | Bakterienstämme .....  | 66        |
| 5.1.6        | Medien .....   | 67        |
| 5.1.7        | Puffer und Lösungen .....  | 67        |
| 5.1.8        | Kommerziell erhältliche Kits .....   | 68        |
| 5.1.9        | Primer .....   | 68        |
| 5.1.10       | Software .....   | 70        |
| 5.1.11       | AF2-Parameter .....  | 70        |
| <b>5.2</b>   | <b>Methoden .....</b>  | <b>71</b> |
| <b>5.2.1</b> | <b>Mikrobiologische Methoden .....</b>   | <b>71</b> |
| 5.2.1.1      | Kultivierung .....   | 71        |
| 5.2.1.2      | Herstellung elektrokompenter Zellen .....                                      | 71        |
| 5.2.1.3      | Transformation elektrokompenter Zellen .....                                   | 71        |
| <b>5.2.2</b> | <b>Molekularbiologische Methoden .....</b>                                     | <b>72</b> |
| 5.2.2.1      | Plasmidpräparationen .....   | 72        |
| 5.2.2.2      | Restriktion .....  | 72        |
| 5.2.2.3      | Phenol-Chloroform-Extraktion .....   | 72        |
| 5.2.2.4      | DNA-Ethanol-fällung .....  | 73        |
| 5.2.2.5      | Polymerasekettenreaktion – PCR .....   | 73        |
| 5.2.2.6      | Restriktionsfreie Klonierung – RFC .....                                       | 74        |
| 5.2.2.7      | Quikchange-Polymerasekettenreaktion – QC-PCR .....                             | 74        |
| 5.2.2.8      | Agarose-Gelelektrophorese – AGE .....  | 75        |
| 5.2.2.9      | Denaturierende Agarose-Gelelektrophorese – Bleichgele .....                    | 75        |
| 5.2.2.10     | Sequenzanalyse von DNA .....   | 76        |
| 5.2.2.11     | Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren und Proteinen .....                 | 76        |
| <b>5.2.3</b> | <b>Proteinbiochemische Methoden .....</b>                                      | <b>77</b> |
| 5.2.3.1      | Heterologe Expression .....  | 77        |
| 5.2.3.2      | Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese SDS-PAGE .....            | 77        |
| 5.2.3.3      | Zellyse .....  | 77        |
| 5.2.3.4      | PEI- und (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> -Fällungen .....      | 78        |
| 5.2.3.5      | Dialyse .....  | 78        |
| 5.2.3.6      | Ni-NTA-Chromatographie .....   | 78        |
| 5.2.3.7      | Proteolytische Abspaltung des Tags .....                                       | 79        |
| 5.2.3.8      | Reverse Ni-NTA-Chromatographie .....   | 79        |
| 5.2.3.9      | Gelfiltration – Größenausschlusschromatographie (SEC) .....                    | 79        |
| 5.2.3.10     | Thermal-Shift-Assay .....  | 79        |
| 5.2.3.11     | DNA/RNA <i>annealing</i> .....   | 80        |
| 5.2.3.12     | Kristallisationsscreening .....  | 80        |
| 5.2.3.13     | Kristallisation .....  | 80        |
| 5.2.3.14     | Additive Screenings .....  | 81        |
| 5.2.3.15     | Seeding .....  | 81        |
| 5.2.3.16     | Röntgenbeugungsexperimente .....   | 81        |
| 5.2.3.17     | <i>In-vitro</i> -Transkription .....   | 82        |
| 5.2.3.18     | Michaelis-Menten-Kinetik .....   | 83        |
| 5.2.3.19     | Bestimmung der mittleren, inhibitorischen Konzentration IC <sub>50</sub> ..... | 83        |
| 5.2.3.20     | Zellmikroskopie .....  | 84        |
| <b>6.</b>    | <b>Literaturverzeichnis .....</b>  | <b>85</b> |

---

|   |            |
|---|------------|
| <b>7. Anhang</b> .....  | <b>89</b>  |
| <b>7.1 Plasmidkarten</b> .....                                  | <b>89</b>  |
| <b>7.2 Zusätzliche Abbildungen</b> .....                        | <b>106</b> |
| 7.2.1 Agarosegel-Bilder .....                                   | 106        |
| 7.2.2 Proteinreinigungen .....                                  | 109        |
| 7.2.3 AlphaFold-Modellierungen .....                            | 121        |
| 7.2.4 Berechnung neuer Insertionspositionen .....               | 122        |
| 7.2.5 Zellexperimente .....                                     | 125        |
| 7.2.6 Kristallisation .....                                     | 125        |
| 7.2.7 Aktivitätsbestimmungen .....                              | 131        |
| <b>7.3 Zusätzliche Tabellen</b> .....                           | <b>134</b> |
| 7.3.1 Schmelzkurvenanalyse .....                                | 134        |
| 7.3.2 Korrelation zwischen Aktivität und Kriterien .....        | 136        |
| 7.3.3 Datenstatistiken zu den gelösten Kristallstrukturen ..... | 137        |
| <b>7.4 Sequenzen</b> .....                                      | <b>139</b> |
| 7.4.1 Alignment mOrange und mApple .....                        | 139        |
| 7.4.2 T7-RNA-Polymerase .....                                   | 140        |
| 7.4.3 AsLOV2 .....  | 141        |
| <b>7.5 Sequenzierungsdaten</b> .....                            | <b>141</b> |
| <b>7.6 Eidesstattliche Versicherung</b> .....                   | <b>142</b> |



## Kurzfassung

Biochemische Reaktionsnetze passen sich an Umweltbedingungen an, indem sie chemische und physikalische Reize wahrnehmen und regulierte Mechanismen zur Steuerung von Reaktionen verwenden. Zu den physikalischen Reizen zählen insbesondere Licht und Spannung. Natürliche Photorezeptoren können Licht bestimmter Wellenlängen absorbieren, was ihre Funktion in biologischen Systemen entscheidend macht.

Die Entdeckung dieser Photorezeptoren ermöglichte die Entwicklung verschiedener Strategien zur gezielten Steuerung der Enzymaktivität und zur Untersuchung ihrer Auswirkungen auf Reaktionskaskaden und zelluläre Prozesse. Eine vielversprechende Strategie besteht in der Fusion von Licht-, Sauerstoff- und Spannungsdomänen (LOV-Domänen) mit Effektorproteinen, um Enzyme allosterisch zu kontrollieren.

In einer vorangehenden Studie wurde in dieser Arbeitsgruppe bereits die LOV-Domäne des Saathafers (*Avena sativa*, AsLOV2) erfolgreich in eine Effektordomäne, die RNA-Polymerase des Bakteriophagen T7, unter Erhalt der Aktivität inseriert und die lichtinduzierte Inhibierung der Polymerase durch *in-vitro*-Transkriptionsreaktionen (IVT) bestimmt.

In dieser Folgestudie wurden die Aktivitäten der zuvor erzeugten Varianten im kinetischen Detail untersucht (apparente Michaelis-Menten-Kinetik) und neue LOV-Polymerase-Fusionsvarianten auf der Grundlage weiterer Insertionskriterien generiert. Die Ergebnisse lieferten mechanistische Erkenntnisse darüber, wie eine LOV-Domänen-Insertion die Polymeraseaktivität in einer lichtabhängigen Weise beeinflussen kann: Alle bisher untersuchten aktiven und photoresponsiven Enzymvarianten wurden nach Bestrahlung mit blauem Licht bei 470 nm teilweise inhibiert, was durch spezifische Beeinflussung der Polymerase-Eingangs- oder Ausgangskanäle (Substrateingangs- oder Produktausgangskanäle oder beides) erklärt werden kann. Diese Beeinflussung konnte durch die Modellierung der Fusionsproteine mit AlphaFold abgeleitet werden. Darüber hinaus wurden die Inhibitionsarten aus Enzymkinetiken und Modellierungen abgeleitet und erste Regeln für die Insertion von allosterischen Domänen in Polymerasen der Polymerasefamilie I aufgestellt.

Ferner wurde die inserierte LOV-Domäne der vielversprechendsten Variante durch natürlich vorkommende, rigide Struktur motive C-terminal verlängert und die Auswirkung der Verlängerung auf die Aktivität und lichtabhängige Inhibierung bestimmt. Zusätzlich wurden mit diesem Fusionsprotein erste *in-cellulo*-Untersuchungen zur lichtabhängigen Inhibierung in *E. coli* durchgeführt. Dabei konnte die *in vitro* beobachtete Inhibierung der Variante in den Zellen reproduziert werden.

Anschließend wurden die Initiations- und Elongationskomplexe des Wildtyp-Enzyms durch Proteinkristallisation und Röntgenbeugungsexperimente gelöst und die photoaktiven Varianten zur Strukturaufklärung in Kristallisationsexperimenten eingesetzt, wobei erste Kristalle einer LOV-T7-RNAP-Variante erhalten werden konnten.



---

## Abstract

Biochemical reaction networks adapt to environmental conditions by sensing chemical and physical stimuli and using regulated mechanisms to control reactions. Physical stimuli include, in particular, light and voltage. Natural photoreceptors can absorb light of certain wavelengths, which is important for their function in biological systems.

The discovery of these photoreceptors has enabled the development of various strategies to specifically control enzyme activity and to study their effects on reaction cascades and cellular processes. One promising strategy is the fusion of light, oxygen and voltage (LOV) domains with effector proteins to allosterically control enzymes.

In a previous study, the LOV domain from oat (*Avena sativa*, AsLOV2) was successfully inserted into an effector domain, the RNA polymerase of bacteriophage T7, while maintaining its activity, and the light-induced inhibition of the polymerase was determined by *in vitro* transcription reactions (IVT).

In this follow-up study, the activities of the previously generated variants were kinetically investigated in detail (apparent Michaelis-Menten kinetics) and new LOV polymerase fusion variants were designed based on additional insertion criteria. The results provided mechanistic insights into how LOV domain insertion can influence polymerase activity in a light-dependent manner: All previously studied active and photoresponsive enzyme variants were partially inhibited after irradiation with blue light at 470 nm, which can be explained by specific interactions with polymerase input or output tunnels (substrate entry or product exit tunnel or both). This influence could be derived by modeling the fusion proteins with AlphaFold. In addition, the types of inhibition were deduced from enzyme kinetics and modeling and first rules for the insertion of allosteric domains in polymerases of polymerase family I were established.

Furthermore, the inserted LOV domain of the most promising variant was extended C-terminally by naturally available rigid structural motifs, and the effect of the extension on activity and light-dependent inhibition was determined. In addition, the first *in cellulo* studies on light-dependent inhibition in *E. coli* were carried out with this fusion protein. The inhibition of the variant observed *in vitro* could be reproduced in the cells.

Subsequently, the initiation and elongation complexes of the wildtype enzyme were solved by protein crystallisation and X-ray diffraction experiments, and the photoactive variants were used for structure elucidation in crystallisation experiments, whereby the first crystals of a LOV-T7-RNAP variant were obtained.



# 1. Einleitung

## 1.1 Kontrolle biochemischer Reaktionen

Für jede lebende Zelle ist ein effizienter Umgang mit Ressourcen (Substrate, Energie) essenziell, da diese nicht jederzeit unbegrenzt zur Verfügung stehen. Dies erfordert eine zielgerichtete Steuerung der in der Zelle ablaufenden Reaktionen. Bekannte Mechanismen, welche in Organismen für die Steuerung von Reaktionen verantwortlich sind und auch für die Steuerung von Modellsystemen genutzt werden können, basieren unter anderem auf Ionen, niedermolekularen Verbindungen (Inhibitoren und Aktivatoren), Protein-Protein-Wechselwirkungen, der Regulation von Reaktionen durch Variation des pH-Wertes oder (De-) Phosphorylierungen. Weitere Methoden der Regulation von biochemischen Prozessen basieren auf physikalischen Eigenschaften. Zu den am häufigsten in der Natur vorkommenden physikalischen Regulationsmechanismen zählen Spannung und Licht. Die Steuerung und Beeinflussung biochemischer Reaktionen und Reaktionskaskaden durch Licht hat besonderes Interesse in Forschung und industrieller Anwendung geweckt. Diese Tendenz wird evident, wenn man die Publikationsaktivitäten zum Themengebiet „optische Kontrolle“ innerhalb der vergangenen fünf Dekaden analysiert (Abbildung 1). Die Anzahl der Veröffentlichungen stieg in den letzten Jahren nahezu exponentiell an.

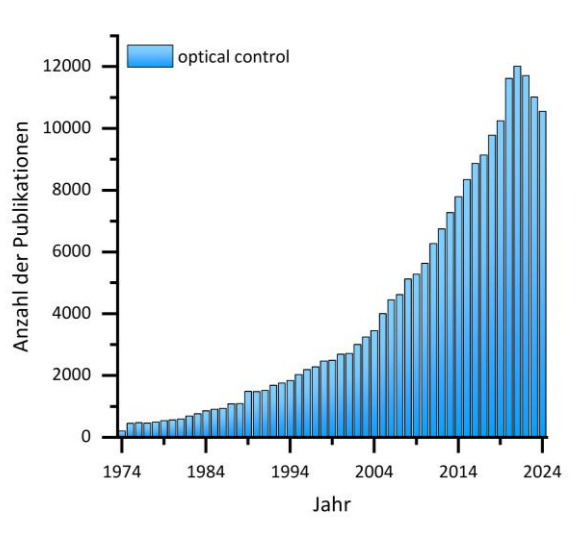


Abbildung 1: Anzahl der Publikationen für „optical control“ innerhalb der letzten 50 Jahre.<sup>[1]</sup>

Das signifikant gestiegene Interesse an der Steuerung und Beeinflussung von Reaktionen durch Licht ist insbesondere auf die Vorteile einer lichtbasierten Regulation zurückzuführen. Erstens erlaubt die räumliche und zeitliche Exaktheit der Lichtapplikation eine präzise Steuerung der Prozesse, zweitens ist der Einsatz toxischer niedermolekularer Verbindungen nicht erforderlich, und drittens erfolgt die Anwendung in der Regel minimalinvasiv, was bedeutet, dass die Steuerung mit kleinstmöglichem schädlichem Einfluss auf das System erfolgt (wellenlängenabhängig).

In den vergangenen Jahrzehnten wurden unterschiedliche Strategien entwickelt, um biochemische Prozesse durch Licht zu regulieren und die Auswirkung auf Reaktions- und Signalkaskaden durch z.B. Inhibierung eines Enzyms zu studieren. Im Folgenden werden verschiedenen Ansätze, um die Aktivität von Proteinen zu steuern, erläutert.

## 1.2 Optogenetische Strategien

Der Großteil der Strategien zur lichtgesteuerten Beeinflussung von biochemischen Reaktionen kann in drei Untergruppierungen klassifiziert werden: Inhibitoren, posttranslationale Modifikationen von Enzymen und Fusionierungen mit Photorezeptoren. Erstens besteht die Möglichkeit, Inhibitoren (*small molecules*) von Enzymen durch eine reversible Änderung der Konformation<sup>[2-5]</sup> oder durch Abspaltung einer Photoschutzgruppe<sup>[3,6-7]</sup> mittels Licht zu aktivieren (Abbildung 2A und B). Zweitens können durch posttranslationale Modifikation sogenannte *Photocages* in ein Enzym eingebracht und das Protein durch Abspaltung der Photoschutzgruppe durch Bestrahlung mit Licht aktiviert werden (Abbildung 2C).<sup>[8]</sup>

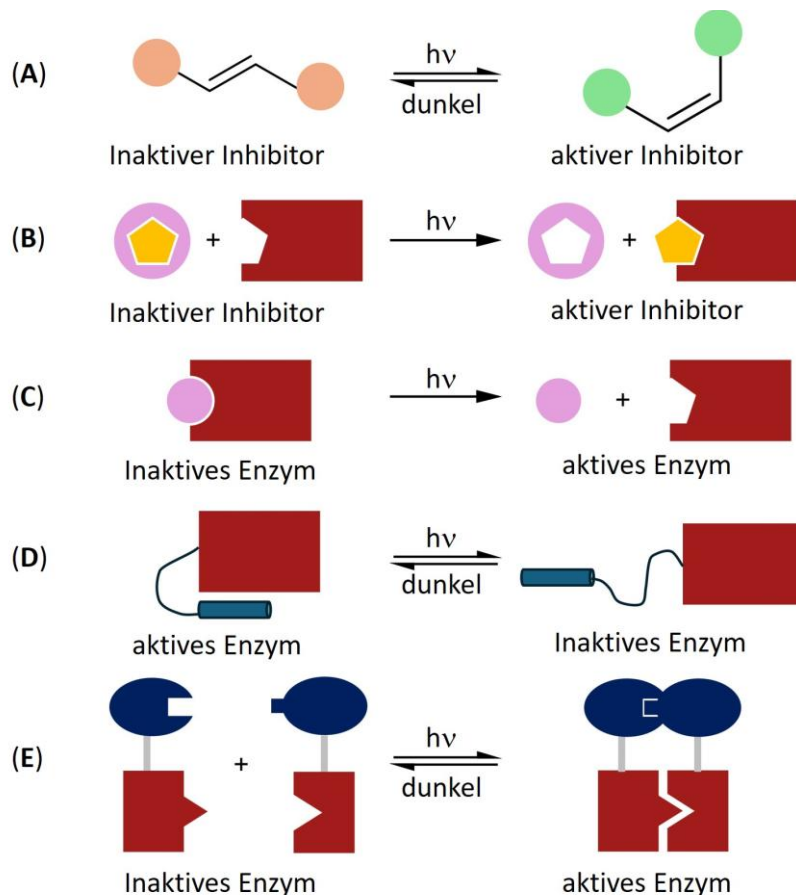


Abbildung 2: Schematische Übersicht über lichtbasierte Regulationsmechanismen in der Chemie und der chemischen Biologie.<sup>[4,9-10]</sup> **A:** Lichtinduzierte Konformationsänderung eines Photoschalters, **B:** Inhibitoraktivierung durch Abspaltung einer Photoschutzgruppe, **C:** Enzymaktivierung nach Abspaltung einer Photoschutzgruppe, **D:** Allosterische Inaktivierung eines Enzyms durch eine konformationelle Änderung einer LOV-Domäne, **E:** Aktivierung eines Split-Enzyms durch Homo- oder Heterodimerisierung eines Photorezeptors.

Ein signifikanter Nachteil der *Photocages* ist jedoch die Irreversibilität ihrer Abspaltung oder Umwandlung. Zudem verbleiben die modifizierten oder abgespaltenen Gruppen innerhalb des Systems, was zu inhibierenden oder toxischen Nebenwirkungen führen kann.

Bei der dritten Methode wird die Fusion eines Enzyms mit einer lichtschtbaren Proteindomäne angestrebt. Diese erfährt bei Bestrahlung mit Licht der geeigneten Wellenlänge eine reversible Konformationsänderung<sup>[10-16]</sup> oder geht eine Dimerisierung<sup>[17-20]</sup> ein und aktiviert oder inhibiert dadurch das Zielprotein (Abbildung 2D und E). Diese beiden Strategien werden nachfolgend genauer beleuchtet.

### 1.2.1 Natürliche, lichtsensitive Domänen

In der Natur kommt eine Vielzahl photosensitiver Domänen vor, welche in den unterschiedlichsten Organismen zu finden sind. Durch die große Anzahl verschiedener Domänen ist das Spektrum des Lichts (UV/sichtbar/IR) abgedeckt, sodass die Domänen je nach benötigter Wellenlänge für den Einsatz in Modellsystemen ausgewählt werden können.<sup>[10,21]</sup> Abbildung 3 zeigt Beispiele für diese lichtabsorbierenden Domänen. Das Spektrum reicht dabei vom UV-B-Licht absorbierenden, als Homodimer vorliegendem UVR8-Photorezeptor, welcher nach Anregung durch Licht in ein aktives Monomer dissoziiert<sup>[22]</sup> (Abbildung 3, oben links), bis hin zur bakteriellen RpBphP1-Domäne, welche nach Absorption von infrarotem Licht eine Hetero-Dimerisierung eingeht (Abbildung 3, oben rechts).<sup>[23-25]</sup>

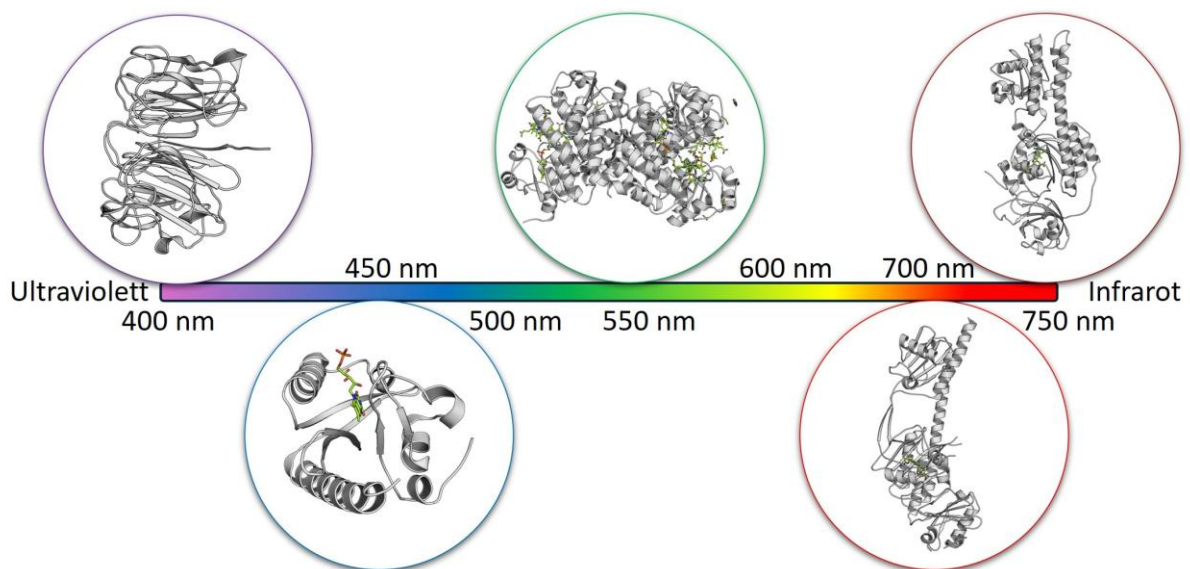


Abbildung 3: Übersicht über einige, in der Natur vorkommende Photorezeptoren. Oben links: Photorezeptor UVR8 (7VGG<sup>[22]</sup>), unten links: AsLOV2 (2V1A<sup>[26]</sup>), oben mittig: Transkriptionsregulator TtCarH (8C31<sup>[27]</sup>), unten rechts: Phyochrom B (6TL<sup>[28]</sup>), oben rechts: infrarotabsorbierendes BphP1 (5OY5<sup>[23]</sup>).

Rotes Licht wird von Phytochrom-B-Domänen absorbiert<sup>[28]</sup> (Abbildung 3, unten rechts), während grünes Licht vom Coenzym-B<sub>12</sub>-bindenden Photorezeptor CarH absorbiert wird (Abbildung 3, oben mittig).

Eine der umfangreichsten Familien der lichtabsorbierenden Proteine bilden Domänen, welche mit ihren Chromophoren Flavinmononukleotid (FMN) und Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD) blaues Licht (400-500 nm) absorbieren (Abbildung 3, unten links).

Die Untersuchung dieser Domänen ist von großem Interesse, da sie durch die Fusion eines *Protein of Interest* mit einer lichtschaltbaren Rezeptordomäne neue Erkenntnisse ermöglichen – etwa über die Auswirkungen der Inhibition einzelner Reaktionen auf eine Reaktionskaskade oder einen Organismus sowie über die gezielte Aktivierung von Reaktionswegen.

### 1.2.2 Light-oxygen-voltage-(LOV)-Domänen

*Light-oxygen-voltage*-Domänen (LOV-Domänen) werden der Familie der Per-ARNT-Sim-(PAS)-Domänen zugeordnet,<sup>[26,29-31]</sup> kommen in Pflanzen, Algen, Bakterien und Pilzen vor und treten in der Natur vor allem im Phototropismus, in der Signalweiterleitung und der Photosynthese in Erscheinung.<sup>[32]</sup> Strukturell bestehen PAS-Domänen aus fünf antiparallelen  $\beta$ -Faltblättern und vier oder fünf  $\alpha$ -Helices, welche die  $\beta$ -Faltblätter flankieren. Die Struktur der LOV2-Domäne des Frauenhaarfarns ins beispielhaft in Abbildung 4 dargestellt.<sup>[33]</sup>

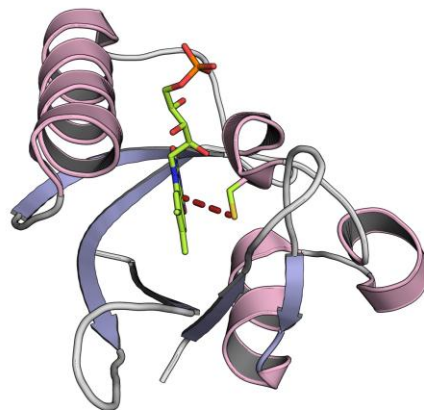


Abbildung 4: Struktur der LOV2-Domäne des Frauenhaarfarns mit der angedeuteten Bindung (rot) zwischen dem Kofaktor FMN (hellgrün) und dem Cysteinrest (*Adiantum capillus veneris*, PDB 1G28<sup>[34]</sup>).

Im Zentrum der LOV-Domänen befindet sich immer der für die Lichtabsorption verantwortliche Chromophor FMN oder FAD. Bei Bestrahlung mit Licht reagiert der Chromophor unter Ausbildung einer kovalenten Bindung mit dem Cysteinrest des GXNCRFL-Motivs.<sup>[34-35]</sup> Dieses hochkonservierte Motiv ist in einer Vielzahl von LOV-Domänen zu finden.

### 1.2.3 Die AsLOV2-Domäne

Eine der am besten untersuchten LOV-Domänen ist die LOV2-Domäne (Uniprot: O49003) des Saathafers (*Avena sativa*), die in dieser Arbeit als Sensordomäne verwendet wurde. Sie ist in der Pflanze innerhalb des Phototropins NPH1-1 lokalisiert (Abbildung 5) und spielt eine wesentliche Rolle bei der Orientierung des Organismus zum Sonnenlicht.



Abbildung 5: Schematische Darstellung des Phototropins NPH1-1. Hellblau: AsLOV1-Domäne, dunkelblau: AsLOV2-Domäne, grau: Ser/Thr-Kinase des Saathafers.

Die AsLOV2-Domäne setzt sich aus fünf antiparallelen  $\beta$ -Faltblättern ( $A\beta$ ,  $B\beta$ ,  $G\beta$ ,  $H\beta$ ,  $I\beta$ ) und sechs  $\alpha$ -Helices ( $A'\alpha$ ,  $C\alpha$ ,  $D\alpha$ ,  $E\alpha$ ,  $F\alpha$ ,  $J\alpha$ ) zusammen.<sup>[26]</sup> Im Zentrum der Domäne befindet sich der Chromophor FMN, welcher nach Absorption von blauem Licht ( $\lambda = 400-500$  nm) eine kovalente Bindung mit dem konservierten Cys450 der  $E\alpha$ -Helix eingeht (Abbildung 6). Dabei wird der Kofaktor FMN zuerst in den angeregten Singulettzustand überführt und gelangt dann über ein *intersystem crossing* (ISC) in den angeregten Triplettzustand. Nach dem ISC erfolgt die Bindungsbildung mit dem Cys-Rest in der  $E\alpha$ -Helix, die eine strukturelle Umordnung der Domäne zur Folge hat.

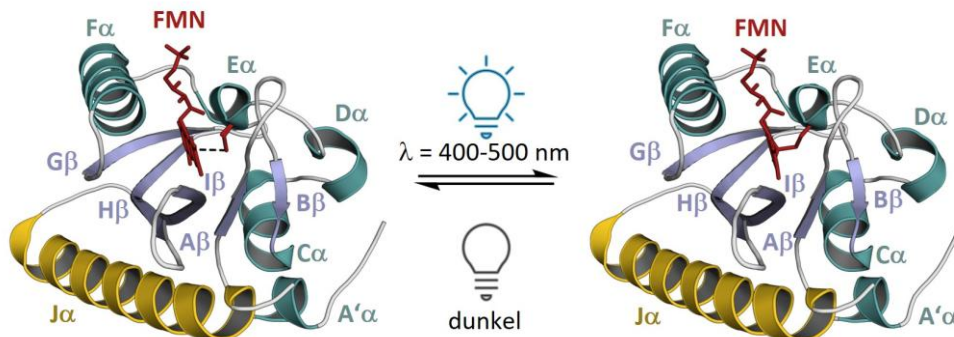


Abbildung 6: Kristallstrukturen der AsLOV2-Domäne im Dunkelzustand (links, PDB 2V1A<sup>[26]</sup>) und Lichtzustand (rechts, PDB 2V1B<sup>[26]</sup>). Hellblau:  $\beta$ -Faltblätter, blaugrün:  $\alpha$ -Helices, gold:  $J\alpha$ -Helix, rot: Kofaktor Flavin-Mononukleotid (FMN) und Cys450 in der  $E\alpha$ -Helix. Bei Anregung mit blauem Licht erfolgt die Ausbildung einer kovalenten Bindung (rechts).

Die umliegenden  $\beta$ -Faltblätter leiten diese Strukturänderung weiter,<sup>[36]</sup> die letztlich die Dissoziation der  $J\alpha$ -Helix zur Folge hat.<sup>[37-38]</sup> Durch Lichtabsorption ergibt sich somit eine Hebelwirkung auf Strukturen, die mit der LOV-Domäne verbunden sind. Da die AsLOV2-Domäne zudem relativ klein ist (16.5 kDa) und ihre C- und N-Termini nur durch ca. 10 Å<sup>[26,29,39]</sup> voneinander separiert sind, eignet sie sich hervorragend als Sensordomäne für die Erzeugung lichtabhängiger Schaltbarkeit von Enzymen.

#### 1.2.4 Allosterische Regulation von Modellsystemen

Die oben vorgestellten lichtabhängigen Domänen kommen in der Natur in der Regel als terminal fusionierte Strukturen vor. Die erste dokumentierte Fusionierung eines Photorezeptors mit einer Effektor-domäne gelang Strickland *et al.* im Jahre 2008.<sup>[40]</sup> Dabei wurde der C-Terminus der AsLOV2-Domäne<sup>[26]</sup> erfolgreich mit dem N-Terminus des bakteriellen Tryptophan-Repressors (TrpR) fusioniert und eine Aktivitätsänderung bei Bestrahlung mit blauem Licht ( $\lambda = 470 \text{ nm}$ ) beobachtet.<sup>[40]</sup> In der Folgezeit wurde eine Vielzahl an unterschiedlichen Effektorproteinen untersucht darunter Guanylatzyklasen,<sup>[41]</sup> N-Acyltransferasen,<sup>[14]</sup> Myosin und Kinesin.<sup>[42]</sup> Vide *et al.* zeigten 2023 die lichtinduzierte Aktivierung der Di-Guanylatzyklase-Domäne GGDEF durch die Fusionierung mit einer LOV-Domäne.<sup>[41]</sup> Dabei konnte die Arbeitsgruppe eine bis zu 17000-fache Aktivierung im Vergleich zum Dunkelzustand beobachten.<sup>[41]</sup> Reynolds *et al.* gelang es im gleichen Jahr, die AsLOV2-Domäne mit einer N-Acyltransferase zu fusionieren und die Aktivität im Dunkel- und Lichtzustand durch Kolorimetrie für drei unterschiedliche Substrate zu bestimmen.<sup>[14]</sup> Dabei konnte die Arbeitsgruppe für das Substrat 2-Aminophenol eine etwa fünffache lichtinduzierte Aktivierung der N-Acyltransferase im Vergleich zum Dunkelzustand nachweisen.<sup>[14]</sup> Nakamura *et al.* untersuchten ein fusioniertes System aus der AsLOV2-Domäne, Myosin VI und dem  $\alpha$ -Actinin 1R und detektierten die reversible Beschleunigung, Verlangsamung oder die Richtungswechsel bei Bestrahlung mit blauem Licht.<sup>[42]</sup> Zudem wurden zelluläre Prozesse wie der BMP-Signalweg<sup>[43]</sup> oder der Metabolismus und der Signalweg der Phosphatidsäure<sup>[44-45]</sup> mithilfe von LOV-Domänen durch Licht beeinflusst. Sogar innerhalb der Antikörperforschung finden lichtschtbare Domänen Anwendung, wobei dimerisierende LOV-Domänen (Vivid- oder Mag-Domänen) mit unterschiedlichen Antikörpern bzw. *Nanobodies* zur optischen Kontrolle fusioniert wurden.<sup>[19]</sup>

Dieses breite und vielseitige Spektrum der Anwendungsgebiete verdeutlicht die Relevanz von lichtschtbaren Domänen für das Verständnis von biologischen Reaktionskaskaden und die gezielte Steuerung von Reaktionen. Zusätzlich zu den bereits vorgestellten Fusionsproteinen besteht die Möglichkeit, Reaktionen durch die Fusion mit dimerisierenden Domänen gezielt zu aktivieren. Dabei werden so genannte *split*-Proteine, welche in Fragmenten unabhängig voneinander exprimiert werden können und sich anschließend zu einem funktionierenden Enzym zusammenlagern, mit jeweils einer monomeren Einheit des photoaktivierbaren Dimers fusioniert. Bei Bestrahlung mit Licht geeigneter Wellenlänge kommt es zur Dimerisierung und zur Rekonstitution des *split*-Proteins.<sup>[46]</sup> Im Gegensatz zur Dimerisierung kann es bei anderen Domänen wie dem UVR8-Photorezeptor durch Bestrahlung mit Licht zur Dissoziation des Dimers kommen. Dadurch könnte eine Freigabe des Zielproteins oder die Inaktivierung von *Split*-Proteinen erfolgen.<sup>[46]</sup>

Als Effektorprotein für die optische Kontrolle dient in der vorliegenden Arbeit die RNA-Polymerase des Bakteriophagen T7, die im Folgenden detailliert vorgestellt wird.

### 1.3 Die T7-RNA-Polymerase

Polymerasen katalysieren die Polymerisationsreaktion von Nucleinsäuren. Dabei wird zwischen vier Proteinklassen unterschieden, den DNA- oder RNA-abhängigen DNA-Polymerasen und den DNA- oder RNA-abhängigen RNA-Polymerasen. DNA-abhängige DNA-Polymerasen kopieren DNA und stellen somit die Weitergabe des Erbguts der Organismen sicher, während DNA-abhängige RNA-Polymerasen DNA in RNA transkribieren und dabei maßgeblich an der Proteinbiosynthese beteiligt sind. Nach erfolgter Transkription der DNA in RNA kann die Translation der entstandenen mRNA in Proteine erfolgen. Eine sehr gut studierte und in der Forschung und technologischen Anwendung häufig verwendete Polymerase ist die DNA-abhängige RNA-Polymerase aus dem Bakteriophagen T7. Das 98 kDa große Enzym wurde erstmals 1970 von Chamberlin *et al.* isoliert.<sup>[47]</sup> Es benötigt für die Funktion keine weiteren Kofaktoren und ähnelt im Aufbau den DNA-Polymerasen der Polymerasefamilie I<sup>[48]</sup> wie z.B. der *E.-coli*-DNA-Polymerase I. Strukturell lässt sich die T7-RNA-Polymerase (T7-RNAP) in eine N-terminale Domäne und eine Polymerase-Domäne unterteilen. Die dreidimensionale Struktur der Polymerase-Domäne ähnelt der Form einer rechten Hand mit drei Subdomänen, die als Daumen-, Handflächen- und Fingerdomäne bezeichnet werden (Abbildung 7).

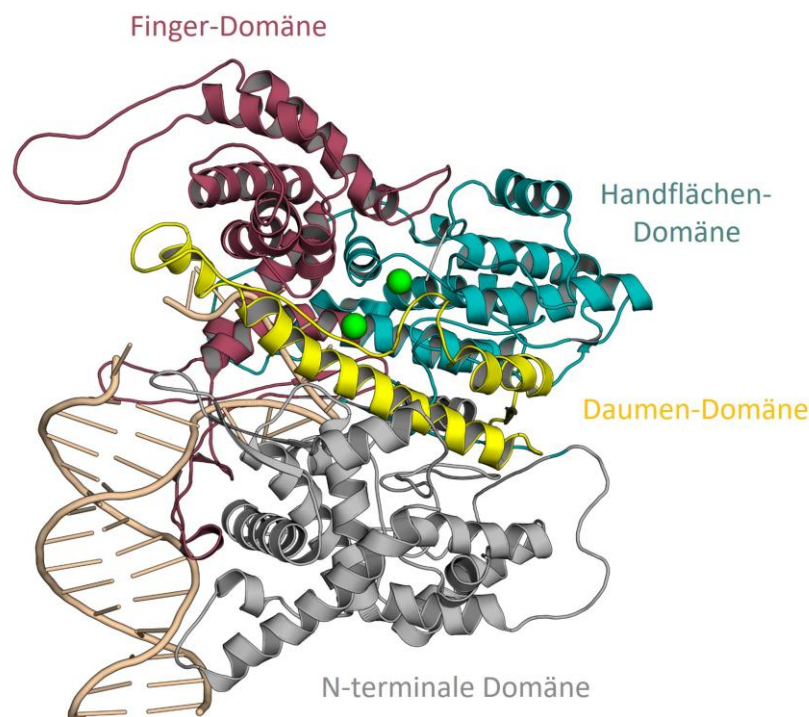


Abbildung 7: Initiationskomplex der T7-RNAP (PDB 2PI4<sup>[49]</sup>). Silber: N-terminale Domäne, gelb: Daumen-Domäne, rot: Fingerdomäne, blaugrün: Handflächendomäne mit dem aktiven Zentrum und  $Mg^{2+}$ -Kationen (grün). Die doppelsträngige T7-Promoter-DNA ist ockerfarben dargestellt.

Die N-terminale Domäne spielt eine Rolle in der Erkennung der spezifischen Sequenz des T7-Promoters und der Öffnung der zu kopierenden DNA-Helix. Die Daumen-Domäne bildet eine lange  $\alpha$ -Helix, welche während der Transkription als „Klammer“ zur Fixierung der DNA und Erhöhung der Prozessivität dient. Die Finger-Domäne spielt ebenfalls eine signifikante Rolle bei der Erkennung und Öffnung des T7-Promoters.

Das aktive Zentrum innerhalb der Handflächen-Domäne enthält die für die Transkription essenziellen, katalytisch aktiven Aminosäuren (AS) (Asp537, Asp812), welche die  $Mg^{2+}$ -Kationen komplexieren. Die Funktionsweise von T7-RNAP wird im Folgenden detailliert dargelegt.

### 1.3.1 Funktionsweise der T7-RNA-Polymerase

Während der Transkriptionsreaktion nimmt die Polymerase nacheinander zwei strukturell unterschiedliche Komplexe ein, den Initiations- und den Elongationskomplex. Zunächst wird der spezifische T7-Promoter (Abbildung 8) durch die AT-Erkennungsschleife (AS 93-101, Abbildung 9, lila) und die Spezifitätsschleife (AS 746-761, Abbildung 9, blau) erkannt. Diese wechselwirken mit der großen Furche (Spezifitätsschleife) und kleinen Furche (AT-Erkennungssequenz) der T7-Promoter-DNA an den Promoterpositionen -16 bis -14 bzw. -11 bis -8 (Abbildung 9).<sup>[50]</sup>

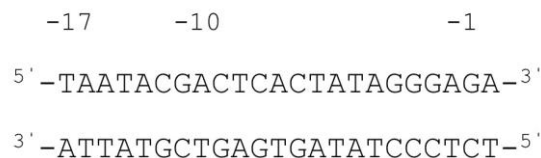


Abbildung 8: Sequenz der doppelsträngigen T7-Promoter-DNA.<sup>[51-53]</sup>

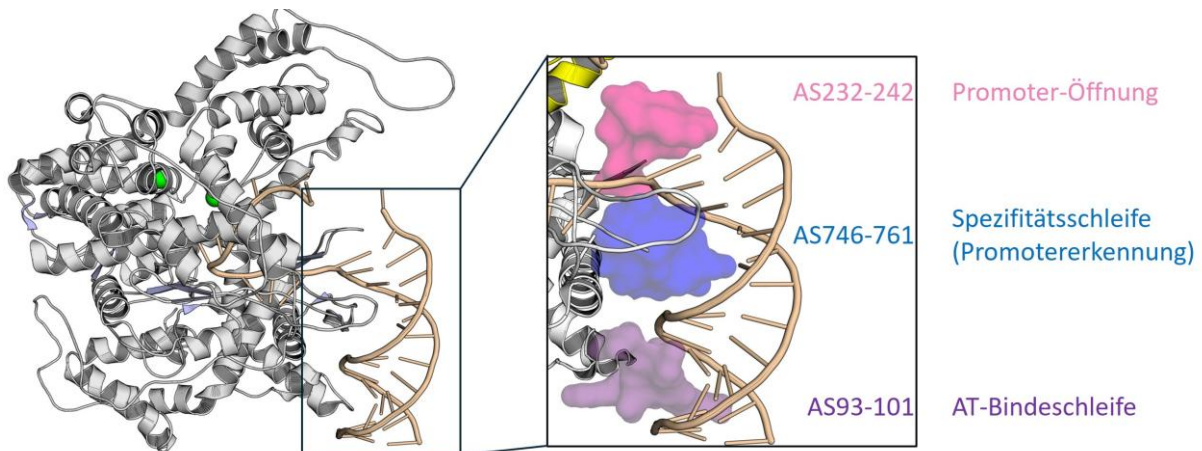


Abbildung 9: Initiationskomplex der T7-RNA-Polymerase (PDB 2PI4<sup>[49]</sup>) mit der spezifischen T7-Promoter-dsDNA (ockerfarben). Pink:  $\beta$ -Haarnadelschleife zur Öffnung der Duplex-DNA, blau: Spezifitätsloop zur Erkennung des Promoters, lila: AT-Erkennungsschleife bindet an die AT-Reichen Bereiche der dsDNA.

In der Folge wird die DNA-Helix durch die interkalierende  $\beta$ -Haarnadelschleife (AS 232-242) geschmolzen, wodurch der *Template*-DNA-Strang in das aktive Zentrum geführt werden kann (Abbildung 9, pink).<sup>[50]</sup> Daraufhin erfolgt die Synthese einer 8-9 bp langen DNA/RNA-Heteroduplex-DNA,<sup>[54]</sup> die in einigen Fällen aus dem Komplex dissoziiert und zu kurzen mRNA-Abbruchprodukten führt. Diese Phase wird auch als abortive Initiierung (*abortive initiation*, *abortive cycle*) bezeichnet.<sup>[55]</sup>

Die Synthese längerer mRNA durch T7-RNAP setzt eine erfolgreiche Umlagerung in den Elongationskomplex voraus,<sup>[54]</sup> bei der die Polymerase signifikante strukturelle Veränderungen erfährt. Die größten Änderungen finden innerhalb der N-terminalen Domäne statt.

Die von den AS 170-180 gebildete Schleife legt dabei die weiteste Strecke ( $\approx 70 \text{ \AA}$ ) zurück (Abbildung 10, grün), während die Spezifitätsschleife (AS746-761), welche innerhalb des Initiationskomplexes für die Promotererkennung verantwortlich ist, über eine Distanz von ca.  $20 \text{ \AA}$  umgelagert wird und nun den Ausgangstunnel für die synthetisierte mRNA bildet (Abbildung 10, blau).<sup>[54]</sup> Die AT-Erkennungsschleife (AS93-101) und die  $\beta$ -Haarnadelschleife (AS 232-242) legen innerhalb der Komplexänderung eine Strecke von  $35 \text{ \AA}$  bzw.  $50 \text{ \AA}$  zurück und sind an der nachfolgenden Elongation nicht mehr direkt beteiligt (Abbildung 10, pink und lila). Die Daumendomäne übernimmt fortan die Separation der beiden DNA-Stränge (Abbildung 10B, gelb).

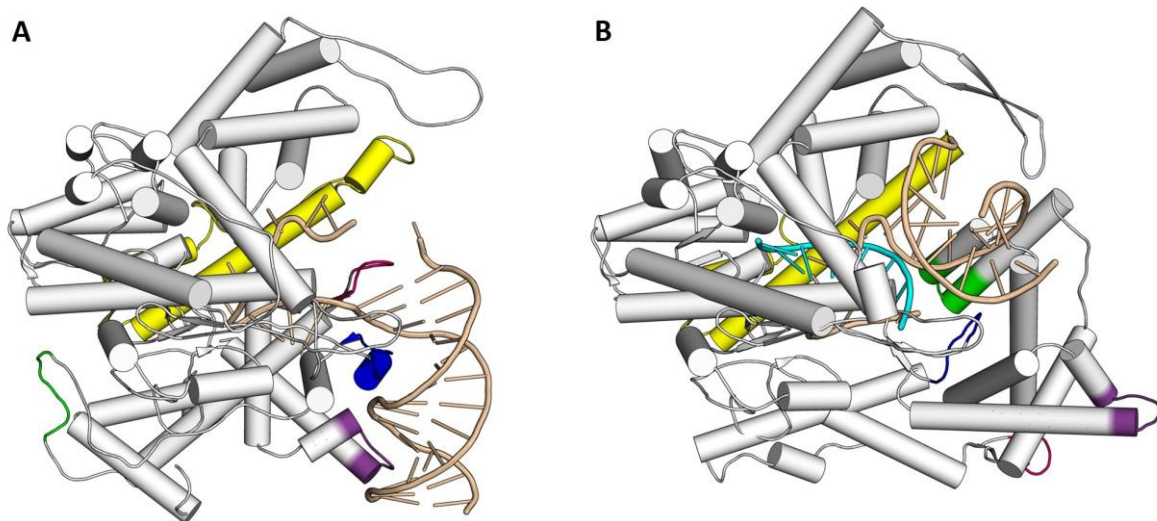


Abbildung 10: Strukturelle Änderungen beim Übergang vom Initiations- (A, PDB 2PI4<sup>[49]</sup>) in den Elongationskomplex (B, PDB 1H38<sup>[56-57]</sup>). Gelb: Daumen-Domäne, grün: AS 170-180, pink:  $\beta$ -Haarnadelschleife, blau: Spezifitätsschleife, lila: AT-Erkennungsschleife.

Nach der Umlagerung in den Elongationskomplex wird die entstehende mRNA mit hoher Prozessivität (ca. fünffache Geschwindigkeit im Vergleich zur *E.-coli*-RNA-Polymerase)<sup>[58]</sup> und geringer Fehlerrate<sup>[59]</sup> verlängert. Dabei kann jeder Zyklus eines Nukleotideinbaus in vier Zwischenschritte unterteilt werden, den Insertionsschritt, die Prä- und Post-Translokation und die Prä-Insertion (Abbildung 11A).<sup>[60-61]</sup> Das rNTP (Abbildung 11B, grün) ist über die Phosphorylgruppe an die O-Helix und die Asparaginsäurereste im aktiven Zentrum in der rNTP-Bindestelle (N-Stelle) gebunden. Im Anschluss erfolgt der Phosphoryltransfer, wobei das Nebenprodukt  $PP_i$  abgespalten wird. Dieses wird nun von den Seitenketten Asp537 und Arg627 komplexiert (Abbildung 11B). Daraufhin findet die Translokation des 3'-Endes der entstehenden mRNA von der N-Stelle zur Primer-Endstelle (P-Stelle) statt, wobei  $PP_i$  und  $Mg^{2+}$  dissoziieren (Abbildung 11C und D). Im finalen Schritt des Zyklus wird das nächste rNTP an der freien N-Stelle gebunden (Abbildung 11E).<sup>[61]</sup>

Zusätzlich zu den zwei Aspartat-Resten, die die  $Mg^{2+}$ -Kationen komplexieren, spielt Tyr639 eine wichtige Rolle bei der Inkorporation von Nucleotiden. Dieses Tyrosin ist maßgeblich an der Differenzierung zwischen dNTPs und rNTPs beteiligt.<sup>[54,58,60-61]</sup>

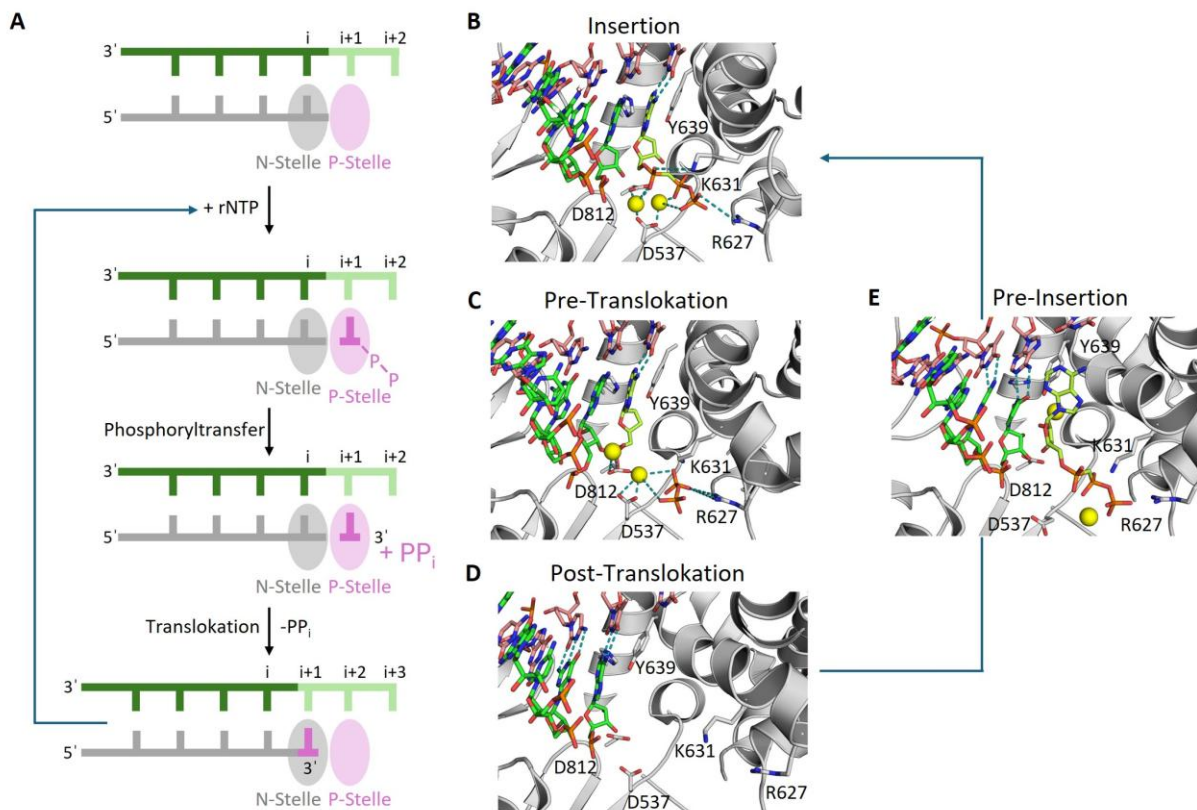


Abbildung 11: Schrittweiser Einbau eines Nucleotids der T7-RNAP. **A:** Schematischer Ablauf der Reaktion am aktiven Zentrum, zuerst erfolgt die Bindung eines Nucleosidtriphosphats im aktiven Zentrum (**B**, PDB 1S76<sup>[61]</sup>) gefolgt von dem Phosphoryltransfer (**B** → **C**, geschlossene Konformation (closed state), PDB 1S77<sup>[61]</sup>) zum Pre-Translokationszustand. Nach erfolgter Translokation und Abspaltung des Pyrophosphats (**D**, offene Konformation (open state), PDB 1MSW<sup>[62]</sup>) wird das nächste Nucleosidtriphosphat am aktiven Zentrum gebunden (**E**, PDB 1SOV<sup>[60]</sup>). Dabei wird die Konformation der O-Helix von dem offenen (**E**) erneut in den geschlossenen Zustand (**B**) umgelagert.<sup>[54]</sup>

### 1.3.2 Split-T7-RNA-Polymerase

Im Zuge der Expression und Reinigung der T7-RNAP wurde bereits im Jahre 1985 festgestellt, dass das Enzym von einer Protease der *E. coli*-Wirtszellen zwischen den AS 172 und 173 geschnitten wird. Die beiden Fragmente (19.5 kDa und 79.4 kDa) blieben während der Reinigung jedoch miteinander assoziiert und das gespaltene Enzym zeigte Aktivität.<sup>[63]</sup> Diese Beobachtung motivierte in den nachfolgenden Jahren weitere Untersuchungen zu sogenannten Spaltungsstellen (*split sites*) der T7-RNAP. Es zeigte sich, dass T7-RNAP in drei Fragmente unterteilt werden kann, ein  $\alpha$ -Fragment (AS 1-67), ein  $\beta$ -Kern-Fragment (AS 67-600) und ein  $\sigma$ -Fragment (AS 601-883) (Abbildung 12), wobei das  $\beta$ -Kernfragment nochmals in zwei Bereiche aufspaltbar ist (AS 179/180). Die gefundenen Spaltungsstellen befinden sich alle in oberflächennahen, ungeordneten Schleifen des Proteins. Die entstehenden Fragmente können unabhängig voneinander exprimiert werden und lagern sich anschließend wieder zu einem funktionierenden Enzym zusammen.<sup>[64]</sup>

Für die Entwicklung optogenetischer Methoden zur Steuerung der Transkriptionsaktivität wurden in einer früheren Arbeit die Spaltpositionen AS 67/68, AS 179/180, AS 600/601 als besonders wichtig identifiziert.<sup>[65]</sup>

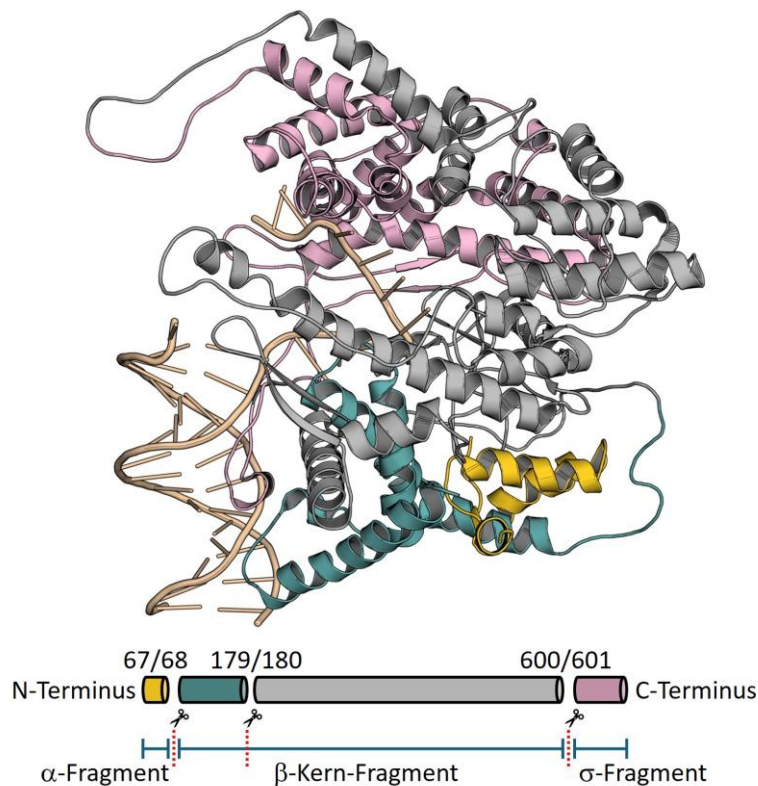


Abbildung 12: Initiationskomplex der T7-RNAP (PDB 2PI4<sup>[49]</sup>) und schematische Darstellung der Fragmente der T7-RNA-Polymerase. An den gekennzeichneten Positionen kann die Polymerase in drei Fragmente gespalten werden. Gelb:  $\alpha$ -Fragment, rosa:  $\sigma$ -Fragment. Das  $\beta$ -Kernfragment kann in zwei weitere Unterbereiche aufgeteilt werden (blaugrün, silber).<sup>[64,66]</sup>

In diesem Kontext konnte die *in-vitro*-Transkription (IVT) durch T7-RNAP nach der Fusion zweier Fragmente mit lichtabhängigen, heterodimerisierenden Mag-Domänen von Baumschlager *et al.* erfolgreich mit Hilfe von Licht gesteuert werden. Mag-Domänen sind modifizierte LOV-Domänen,<sup>[67]</sup> welche aus der homodimerisierenden Vivid-Domäne des Pilzes *Neurospora crassa*<sup>[68]</sup> entwickelt wurden. Die Arbeitsgruppe konnte weitere Spaltungsstellen identifizieren (AS 302/303, AS 563/564)<sup>[17]</sup> und zu einem späteren Zeitpunkt zusätzlich zeigen, dass die Opto-T7RNAP-Varianten ebenfalls *in vivo* (in Säugetierzellen) mit Hilfe von Licht reguliert werden können.<sup>[18]</sup>

### 1.3.3 Anwendungsgebiete der T7-RNA-Polymerase

Aufgrund ihrer hohen Spezifität gegenüber dem T7-Promoter<sup>[52]</sup> und ihrer hohen Prozessivität und Effektivität findet die T7-RNA-Polymerase in vielen Bereichen der Forschung und Industrie Anwendung. Dazu zählen vor allem T7-basierte Expressionssysteme<sup>[69]</sup> und mRNA-Impfstoffe.<sup>[70-72]</sup> In den sehr häufig verwendeten *E.-coli*-BL21(DE3)-Zellen befindet sich das Gen für T7-RNAP unter einem IPTG-induzierbaren *lac*-Promoter/Operator im Genom der Bakterien. Die Kombination aus der Möglichkeit der IPTG-induzierten Aktivierung des Systems und der starken Promoterabhängigkeit der T7-RNA-Polymerase prädestiniert diese für den Einsatz als zur Wirtszelle orthogonales Transkriptionssystem zur Expression einer Vielzahl von Proteinen.<sup>[69,73-74]</sup> Auf dieser Basis wurde bereits das kommerziell erhältliche pET-Expressionssystem entwickelt.

Auch in der Impfstoffherstellung findet T7-RNAP Anwendung. Die Produktion mRNA-basierter Impfstoffe hat in den letzten Jahren einen signifikanten Anstieg verzeichnet. Während der Corona-Pandemie wurden innerhalb der Europäischen Union seit Dezember 2020 ca. 916 Mio. Impfdosen verabreicht.<sup>[75]</sup> Der Anteil an mRNA-basierten Impfstoffen belief sich auf 90 % (669 Mio. Impfdosen BioNTech/Pfizer, 157 Mio. Impfdosen Moderna),<sup>[75]</sup> was bei einer Konzentration von 30 µg/Dosis (BioNTech/Pfizer<sup>[76]</sup>) bzw. 50 µg/Dosis (Moderna<sup>[77]</sup>) einer für die EU verwendeten Gesamtmenge von rund 28 kg mRNA entspricht. Diese immense Menge an mRNA wurde *in vitro* u. a. mithilfe von T7-RNA-Polymerase synthetisiert, die die Transkription einer Matrize schnell und effizient katalysiert ( $60 \text{ nt s}^{-1}$  bis  $100 \text{ nt s}^{-1}$ )<sup>[78-80]</sup> und die Herstellung des Enzyms durch heterologe Expression einfach realisiert werden kann.<sup>[81-82]</sup>

Ein weiteres Anwendungsgebiet der T7-RNA-Polymerase ist die Verwendung in zellfreien *in-vitro*-Transkriptions- und Translationssystemen (*cell-free protein synthesis*, CFPS).<sup>[69]</sup> Um eine Expression erfolgreich außerhalb von Zellen durchzuführen, müssen neben einer RNA-Polymerase auch weitere biologische Makromoleküle wie Ribosomen, tRNAs und Aminoacyl-tRNA-Synthetasen vorhanden sein.<sup>[83-84]</sup> Gegenstand aktueller Forschung in diesem Bereich ist insbesondere die Selbstreplikation des zellfreien Expressionssystems (Recycling der Ressourcen).<sup>[85]</sup> Mit Hilfe einer T7-RNA-Polymerase, welche durch Bestrahlung mit Licht einer geeigneten Wellenlänge aktiviert oder (teil-)inhibiert wird, könnte die Transkription in zellfreien *in-vitro*-Transkriptions- und Translationssystemen reguliert werden.

Die unterschiedlichen Anwendungsgebiete unterstreichen die signifikante Rolle des Enzyms in biotechnologischen und medizinischen Anwendungen, wodurch es von großem wissenschaftlichem Interesse ist, die Aktivität der T7-RNAP regulieren zu können. Mittels optogenetischer Strategien ist eine kosteneffiziente und minimalinvasive Inhibition oder Aktivierung der Enzyme möglich. In einer ersten Untersuchung wurden innerhalb dieser Arbeitsgruppe bereits photoaktive Varianten der T7-RNA-Polymerase erzeugt und ihrer Aktivität und lichtabhängige Schaltbarkeit analysiert. Dabei konnte eine lichtinduzierte Inhibition der Polymerasevarianten um bis zu 40 Prozentpunkte detektiert werden.<sup>[65,86]</sup>

### 1.3.4 Lichtschaltbare T7-RNA-Polymerasevarianten – Erste Ergebnisse

In der Natur treten lichtschaltbare Domänen meist terminal mit einer Effektor-domäne fusioniert auf. In vorangegangenen Studien wurde die AsLOV2-Domäne zunächst N- (J. Benninghoff, TU Dortmund, unveröffentlicht), und C-terminal (P. Dollinger, TU Dortmund, unveröffentlicht) mit der Effektor-domäne, der T7-RNA-Polymerase, fusioniert. Jedoch konnte in keinem der beiden Arbeiten ein aktives oder lichtschaltbares Enzym erhalten werden, da beide Termini an der Transkriptionsreaktion beteiligt sind. In der Folge wurde die AsLOV2-Domäne erstmalig in die RNA-Polymerase inseriert.<sup>[65,86]</sup> Die Auswahl der Insertionsstelle erfolgte durch Inspektion der räumlichen Struktur der T7-RNAP (AS 346/347). Auch diese Verbindung aus LOV-Domäne und T7-RNAP resultierte in inaktivem Protein.<sup>[65,86]</sup> Um aktive und lichtschaltbare Varianten der T7-RNA-Polymerase zu erhalten, wurde dann die C-terminal um 9 AS verkürzte (im Folgenden mit dem Index  $v$  gekennzeichnete) LOV-Domäne in vier bereits bekannte *Split*-Positionen der T7-RNAP inseriert (Abbildung 13).<sup>[65,86]</sup> Drei der vier Varianten waren löslich und aktiv, während das Fusionsprotein mit der Insertion zwischen den AS 564 und 565 bei der Expression unlöslich anfiel.

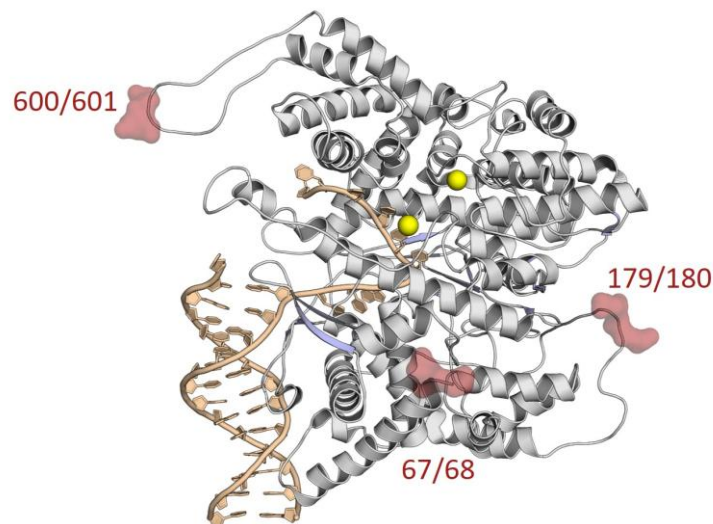


Abbildung 13: Initiationskomplex der WT-T7-RNAP (PDB 2PI4<sup>[49]</sup>), ockerfarben: dsDNA des T7-Promoters, grün: Magnesiumkationen im aktiven Zentrum, rot: Insertionspositionen der LOV-Domäne.<sup>[65]</sup>

Im Rahmen der Untersuchung wurde die Aktivität und Schaltbarkeit der drei erhaltenen Varianten der T7-RNAP analysiert und bei allen Varianten eine Transkriptionsaktivität beobachtet (Abbildung 14). Darüber hinaus konnte bei sämtlichen Varianten eine Beeinflussung der Aktivität durch Licht festgestellt werden. Bei den Varianten 67/68 $_v$  und 179/180 $_v$  wurde eine Inhibierung der Aktivität von bis zu 40 Prozentpunkten beobachtet. Im Falle der Insertion der Domäne in die Position 600/601 $_v$  konnte eine leichte Steigerung der Aktivität (um 8 Prozentpunkte) beobachtet werden.<sup>[65]</sup>

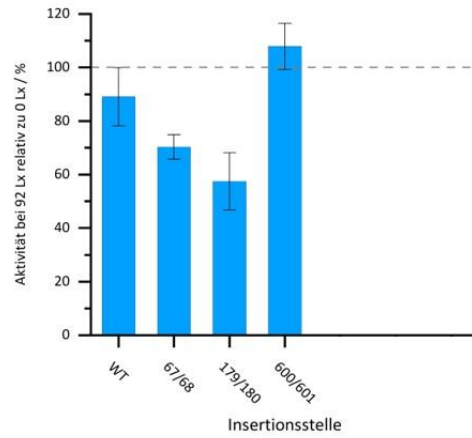


Abbildung 14: Aktivität der verkürzten, photoaktiven Varianten bei 92 Lx in Bezug zu 0 Lx.<sup>[65,86]</sup>

## 2. Zielstellung und Motivation

In einer vorhergehenden Studie<sup>[65]</sup> wurde gezeigt, dass die allosterische AsLOV2-Domäne des Phototropins (*Avena sativa*) erfolgreich in die T7-RNAP unter Erhalt der Aktivität inseriert werden kann. Zudem konnte eine lichtabhängige Inhibition der Polymerase um bis zu 40 Prozentpunkte beobachtet werden. Aufbauend auf diesen Erkenntnissen sollte in der vorliegenden Arbeit eine umfassende kinetische Charakterisierung der LOV-T7-RNAP-Fusionsvarianten erfolgen, um den spezifischen Einfluss der LOV-Domäne auf die Polymerase-Aktivität zu analysieren und die kinetischen Parameter mit denen verwandter Enzymen zu vergleichen.

Zu diesem Zweck sollten die photoaktiven Varianten (67/68, 179/180, 600/601) mit nativer Länge der LOV-Domäne kloniert, exprimiert und gereinigt werden. Anschließend sollte ein enzymatischer Assay zur Bestimmung der Aktivität anhand der Michaelis-Menten-Kinetik entwickelt werden, mit dem die kinetischen Parameter der Varianten und des Wildtyps reproduzierbar bestimmt und ausgewertet werden können.

Darüber hinaus ergab sich aus den Vorarbeiten die Fragestellung, ob weitere Insertionspositionen identifiziert und aktive, lichtschtbare Varianten der T7-RNAP generiert werden können. Hierzu sollten computergestützte Methoden zur Identifikation neuer potenzieller Insertionsstellen eingesetzt werden. Die Aktivität und Schaltbarkeit der neu entwickelten Varianten sollten anschließend in IVT analysiert werden.

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der lichtabhängigen Regulation der Polymerase in zellulären Systemen. Dabei sollte überprüft werden, ob die *in vitro* beobachtete lichtinduzierte Inhibition der Polymerase *in cellulo* (*E. coli*) in vergleichbarem Maße erfolgte. Hierfür sollte eine vielversprechende Variante hinsichtlich ihrer Aktivität und Lichtschaltbarkeit in Zellen analysiert werden. Zur Quantifizierung der Lichtschaltbarkeit in lebenden Zellen sollte ein Assay zur Analyse der Zellen durch Fluoreszenzmikroskopie entwickelt werden.

Abschließend sollte der strukturelle Einfluss der allosterischen Domäne auf die Polymerase-Aktivität untersucht werden. Dazu waren zunächst Strukturmodellierungen geplant, gefolgt von Kristallisationsexperimenten zur Aufklärung möglicher Konformationsänderungen der Polymerase durch die LOV-Domäne.

Die vorliegende Arbeit diene der Erlangung eines tieferen Verständnisses der Mechanismen der lichtregulierten Varianten der T7-RNA-Polymerase.

### 3. Ergebnisse und Diskussion

#### 3.1 Konstruktdesign und Etablierung der Proteinexpression und -Reinigung

Um die zuvor formulierten Ziele zu erreichen, war es zunächst erforderlich, die verfügbaren Expressionskonstrukte für T7-RNAP-LOV-Varianten für die geplanten Experimente zu optimieren. Für die kristallographische Aufklärung der Enzymstrukturen sollte der vorhandene 6x-His-Tag durch eine Protease abgetrennt werden können. Zusätzlich mussten zwei Mutationen (F55S und A234V), welche in jedem Konstrukt vorlagen, mit der Quikchange-PCR (QC-PCR)<sup>[87]</sup> auf die Ursprungssequenz zurückgeführt werden. Im Anschluss wurde mit Hilfe der restriktionsfreien Klonierung (engl. *restriction-free cloning*, RFC)<sup>[88]</sup> eine Proteaseschnittstelle zwischen dem 6x His-Tag und der Gensequenz des Zielproteins eingefügt, um diesen während der Reinigungsprozedur proteolytisch abtrennen zu können. Für diesen Schritt wurde zunächst die Faktor-Xa-Protease ausgewählt. Der Vorteil der Faktor-Xa-Protease gegenüber anderen Proteasen besteht in ihrer Eigenschaft, nach der Proteolyse keine Aminosäuren am Zielprotein zu hinterlassen. Dazu wurden die Plasmide mit dem Restriktionsenzym *Bam*HI direkt hinter der His-Tag-codierenden Sequenz linearisiert und die RFC-PCR mit den Oligonukleotiden DH\_Xa\_Fw und DH\_Xa\_Rev (Tabelle 22) durchgeführt. Diese Klonierungen wurden für sämtliche vorliegenden LOV-Varianten der T7-RNAP durchgeführt (vgl. Tabelle 1).

Tabelle 1: Übersicht über Konstrukte, Insertionspositionen und Längen der J $\alpha$ -Helix, Index V: Um 9 AS verkürzte J $\alpha$ -Helix im Vergleich zur nativen Länge.

| Insertionsposition der AsLOV2 | Länge der J $\alpha$ -Helix |
|-------------------------------|-----------------------------|
| WT                            | -                           |
| 67/68 <sub>v</sub>            | 16 AS                       |
| 67/68                         | 25 AS                       |
| 179/180 <sub>v</sub>          | 16 AS                       |
| 179/180                       | 25 AS                       |
| 600/601 <sub>v</sub>          | 16 AS                       |
| 600/601                       | 25 AS                       |

Die erfolgreiche Durchführung der Klonierung wurde durch die Analyse der resultierenden DNA-Sequenzen belegt. Im Anschluss wurden die modifizierten Plasmide durch Transformation in *E. coli* BL21[pRep4] eingebracht, die Transformanden kultiviert und die Proteine exprimiert. Das hier verwendete zweite Plasmid, pRep4, codiert den *lac*-Repressor, durch den die Transkription der T7-RNAP-codierende Sequenz (unter einem *lac*/UV5-Promoter; Vektor pQE-30; Plasmide aus Vorarbeiten bereitgestellt von Swantje Seifert<sup>[86]</sup>, Fakultät für Chemie und Chemische Biologie, TU Dortmund) steuerbar ist.

Nach der Expression, Zelllyse, Polyethylenimin-(PEI) und (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Fällung erfolgte die Nickel-Nitrilotriessigsäure-Affinitätschromatographie (Ni-NTA-Chromatographie, Abbildung 15). Im Anschluss wurde eine Dialyse mit der Faktor-Xa-Protease, gefolgt von einer reversen Ni-NTA-Chromatographie durchgeführt. Zuletzt wurden die vereinigten Fraktionen der Proteinlösung einer weiteren Größenausschlusschromatographie (SEC, engl. *size exclusion chromatography*) unterzogen. Die detaillierte Durchführung ist in Abschnitt 5.2.3 gegeben.

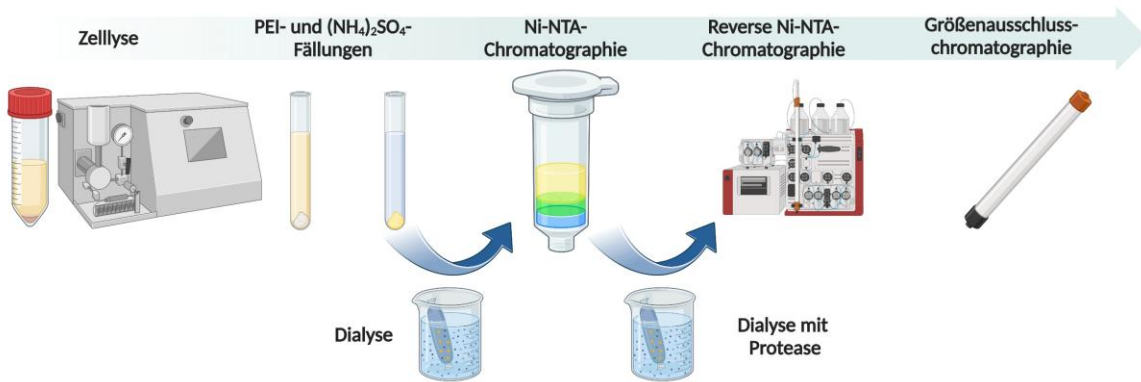


Abbildung 15: Schematischer Überblick über die Reinigungsprozedur.<sup>[89]</sup>

Die Reinigung des Wildtyps mit Faktor-Xa-Proteaseschnittstelle wird nachfolgend beschrieben (Abbildung 16). Im Rahmen der Ni-NTA-Affinitätschromatographie (Abbildung 16A/B) konnte bereits eine Separation von einigen Verunreinigungen beobachtet werden. Die Bande des Zielproteins ist in den Elutionsfraktionen deutlich zu erkennen (zwischen den Banden des PageRulers bei 70 und 100 kDa). Nach erfolgter Dialyse mit der Faktor Xa Protease (3 d, 4 °C) wurde die reverse Ni-NTA-Chromatographie durchgeführt (Abbildung 16C/D). Dabei wurde festgestellt, dass sich das Zielprotein, welches durch Proteolyse verdaut worden war und keinen 6x His-Tag mehr aufwies, wie erwartet in der Durchflussfraktion befand. Die Ergebnisse der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophoresen (*Sodium dodecyl sulfate gel electrophoresis*, SDS-PAGE) zeigten, dass die Proteinlösung nach wie vor Verunreinigungen (bei einer Größe von ca. 35 kDa und 65 kDa) aufwies. Die vereinten Fraktionen des Zielproteins wurden nachfolgend der Größenausschlusschromatographie unterzogen. Die Analyse des Chromatogramms ergab, dass zwei Peaks erkennbar waren (Abbildung 16E). Im Rahmen der Größenausschlusschromatographie erfolgt eine Trennung der Proteine nach ihrer Größe bzw. genauer, ihres hydrodynamischen Volumens. Aufgrund der Präsenz der Wildtyp-T7-RNAP in beiden Reinigungs-Peaks konnte angenommen werden, dass Peak 1 entweder Komplexe mit anderen Proteinen oder Oligomere des Zielproteins enthielt. Zusätzlich zu dem Zielprotein waren die Verunreinigungen nach der dritten Chromatographie weiterhin präsent. Die bei der Reinigung der Wildtyp-T7-RNAP beobachteten Verunreinigungen konnten auch bei den Aufreinigungen der photoaktiven Varianten nicht abgetrennt werden. In der Folge war eine Optimierung der Reinigungsprozedur unabdingbar, um reine Proteinlösungen für nachfolgende Experimente zu generieren.

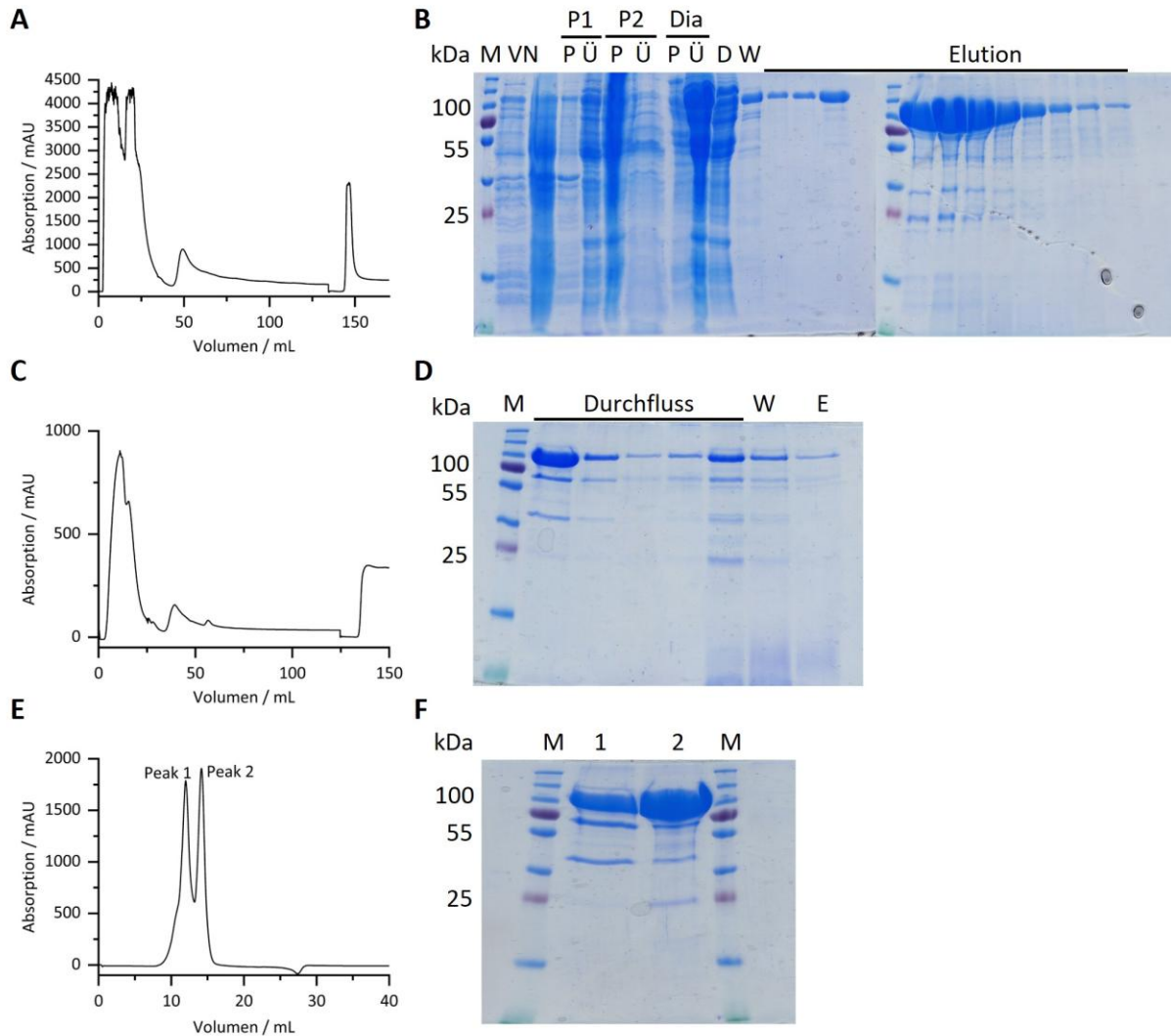


Abbildung 16: Ergebnisse der Reinigung der WT-Polymerase mit Faktor Xa-Proteaseschnittstelle zur Abtrennung des 6x-His-Tags. **A:** Chromatogramm der Ni-NTA-Chromatographie, **B:** SDS-PAGE der Ni-NTA-Chromatographie, M: 3  $\mu$ L PageRuler Plus prestained Protein Ladder, V: Zellprobe vor Induktion mit IPTG, N: Zellprobe nach Expression des Zielproteins, P1: Proben der PEI-Fällungsreaktion, P2: Proben der Ammoniumsulfatfällung, Dia: Proben nach der Zentrifugation des Dialysats, P: Probe aus dem Pellet, Ü: Probe des Überstands, D: Durchfluss, W: Waschfraktion, **C:** Chromatogramm der reversen Ni-NTA-Chromatographie, **D:** SDS-PAGE der reversen Ni-NTA-Chromatographie, M: 3  $\mu$ L PageRuler Plus prestained Protein Ladder, W: Waschfraktion, E: Elutionsfraktionen, **E:** Chromatogramm der Gelfiltration, **F:** SDS-PAGE der Gelfiltration, M: 3  $\mu$ L PageRuler Plus prestained Protein Ladder, 1: Peak 1, 2: Peak 2.

In einem ersten Versuch, den Anteil der Verunreinigungen in der Proteinlösung zu reduzieren, wurde die Ni-NTA-Chromatographie mit doppeltem Volumen des Puffers im Waschschriff durchgeführt. Aufgrund der geringen Auswirkung des verlängerten Waschschriffes auf die Reinheit des Zielproteins wurde vermutet, dass die Verunreinigungen Hitzeschockproteine (Hsp) sein könnten, welche für die Proteinfaltung in den Zellen erforderlich sind und das Zielprotein z.B. auf Grund eines Mangels an Adenosintriphosphat (ATP) nicht freigegeben haben. Daher sollte die Reinheit durch die Zugabe von 10 mM ATP zum Waschpuffer erhöht werden. Auch dieser Optimierungsversuch führte nicht zur gewünschten Erhöhung der Reinheit. In Anlehnung an andere etablierte Proteinreinigungen<sup>[81,90-91]</sup> wurde eine Anionenaustauschchromatographie (engl. *Anion-exchange chromatography*, AEX) durchgeführt, um die Reinheit der Proteinlösung zu erhöhen.

Dabei erfolgte die AEX nach der ersten Ni-NTA-Affinitätschromatographie, durch die bereits ein Teil der Verunreinigungen von der Proteinlösung abgetrennt werden konnte, während mit der AEX weiterhin vorliegende, kationische Proteine vom Zielprotein getrennt werden sollten. Dieser Versuch führte zu einer Verbesserung des Reinheitsgrades von 80 % auf 85 % (Abbildung 17, jeweils Peak 2 der Gelfiltration), aber immer noch nicht zu einer vollständigen Abtrennung von Verunreinigungen.

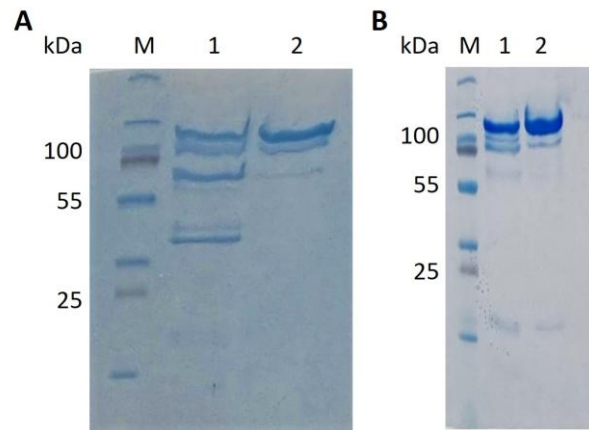


Abbildung 17: Vergleich der SDS-Gele nach der Gelfiltration ohne (A) und mit (B) DEAE-Anionenaustauschchromatographie in der Reinigungsprozedur. **A:** SDS-PAGE nach der SEC ohne AEX, 1: Peak 1 der Gelfiltration, 2: Peak 2 der Gelfiltration, **B:** SDS-PAGE nach der SEC mit nach der Ni-NTA-Chromatographie durchgeführter AEX, 1: Peak 1 der Gelfiltration, 2: Peak 2 der Gelfiltration.

Daher wurde angenommen, dass ein weiterer Grund für das Trennproblem vorlag. Eine Recherche zur verwendeten Faktor-Xa-Protease ergab, dass diese an einer sekundären Schnittstelle mit der Erkennungssequenz Gly-Arg $\uparrow$  hydrolysieren kann.<sup>[92]</sup> Diese Sequenz liegt im Wildtyp der T7-RNAP (M = 100 kDa) fünfmal vor. Mit einem proteolytischen Sekundärverdau an zwei dieser Stellen (G290/R291 und G556/R557) können zwei nicht abtrennbare Fragmente von ungefähr 65 kDa und 35 kDa erklärt werden. Aus diesem Grund sollte anstelle der Faktor-Xa-Protease die TEV-Protease verwendet werden. Dafür mussten die verwendeten Konstrukte ausgehend vom Wildtypenzym (Plasmid pQET7SBWT<sup>[86]</sup>) mit TEV-Proteaseschnittstelle neu kloniert werden. Dies erfolgte mithilfe einer RFC-PCR (s. Abschnitt 5.2.2.6), durch die die Codons für die TEV-Protease-Erkennungssequenz (Glu-Asn-Leu-Tyr-Phe-Gln $\uparrow$ Gly) eingefügt wurden. Anschließend wurde an den Stellen der Wildyp-T7-RNAP-Sequenz, an welchen die AsLOV2-codierende Sequenz eingefügt werden sollte, eine QC-PCR durchgeführt, um die Schnittstelle des Restriktionsenzym *Sma*I einzufügen. Nach erfolgter Restriktion konnte an den Insertionspositionen (Tabelle 1) die Sequenz der LOV-Domäne durch RFC-PCR eingefügt werden. Der Erfolg der Klonierungen der photoaktiven Varianten der T7-RNA-Polymerase wurde durch Restriktionsanalyse und Sequenzierung belegt. Im Anschluss wurden die Plasmide, welche die unterschiedlichen Proteinvarianten codieren, durch Transformation in *E. coli* BL21[pRep4] eingebracht, kultiviert und gemäß der unter 5.2.3.1 beschriebenen Methode exprimiert.

Die verschiedenen Varianten der T7-RNA-Polymerase wurden analog zum oben beschriebenen Verfahren (Abbildung 15) gereinigt und dabei mit TEV-Protease von ihrem 6x-His-Tag befreit. Die Resultate der Reinigung werden im Folgenden am Beispiel der WT-T7-RNAP (Abbildung 18) beschrieben, die Reinigungen der übrigen Varianten sind im Anhang zu finden (Abschnitt 7.2.2).

Die Chromatogramme der Ni-NTA- und der reversen Ni-NTA-Chromatographie zeigen jeweils drei Peaks (Abbildung 18A und 18C). Diese repräsentieren die Fraktionen des Durchflusses, des Waschschritts und der Elution. Das Gelbild der Ni-NTA-Chromatographie (Abbildung 18B) zeigt das Zielprotein (M = 100 kDa) deutlich an der ausgeprägten Bande zwischen 130 und 100 kDa. Ein geringer Anteil des Zielproteins ist zudem in der Waschfraktion erkennbar. Als mögliche Ursache wird das sogenannte *Bleeding* der stationären Phase in Betracht gezogen, bei dem das Säulenmaterial nicht mehr in der Lage ist, das Protein vollständig zu binden. Dies hat zur Folge, dass das Protein nach der Auftragung stetig aus der Säule „blutet“. *Bleeding* tritt insbesondere durch Abnutzung des Säulenmaterials oder durch Aufgabe zu großer Mengen des Zielproteins (Überladung der Säule) auf. - Nach der ersten durchgeführten Chromatographie konnten in den Elutionsfraktionen Verunreinigungen durch zelleigene Proteine festgestellt werden. Diese könnten entweder durch die Bildung eines Komplexes mit der T7-RNA-Polymerase oder durch unspezifische Bindung an die stationäre Phase zusammen mit dem Zielprotein eluiert worden sein.

Im Anschluss an die Dialyse in Gegenwart von TEV-Protease wurde eine reverse Ni-NTA-Affinitätschromatographie durchgeführt, um weitere Verunreinigungen sowie den 6x-His-Tag und die 6x-His-Tag-tragende Protease abzutrennen. Die WT-T7-RNAP konnte dabei bereits in reiner Form in den Fraktionen des Durchflusses erhalten werden (Abbildung 18D). Zuletzt wurde eine Größenausschlusschromatographie durchgeführt, um zu analysieren, ob das gereinigte Protein ausschließlich in monomerer Form vorliegt und ob die Polymerase mit weiteren Proteinen assoziiert ist. Dabei konnten zwei Peaks identifiziert werden (Abbildung 18E), deren weitere Analyse durch SDS-PAGE ergab, dass das Zielprotein in monomerer Form nur in den zu Peak 1 gehörenden Fraktionen vorliegt (Abbildung 18F).

Durch die Änderung der Proteaseschnittstelle war es möglich, die Reinheit der Proteinlösung von 85 % (WTXa) auf > 99 % (WTTEV) zu erhöhen. Auch die photoaktiven Varianten konnten auf analoge Weise in Ausbeuten von 5 mg bis 38 mg pro Liter Expressionskultur mit Reinheiten von 95 % bis > 99 % erhalten werden (Tabelle 2).

*Tabelle 2: Ausbeuten und Reinheiten der Proteinvarianten nach erfolgter Aufreinigung. Aufgrund der wiederholten Reinigungen der jeweiligen Proteine im Rahmen dieser Arbeit sind die Obergrenzen angegeben.*

| Variante             | Reinheit    | Ausbeute / mg L <sup>-1</sup> Kultur |
|----------------------|-------------|--------------------------------------|
| WT                   | > 99 %      | Bis zu 12.5                          |
| 67/68                | Bis zu 95 % | Bis zu 35.0                          |
| 68/68 <sub>v</sub>   | > 99 %      | Bis zu 18.4                          |
| 179/180              | Bis zu 97 % | Bis zu 38.0                          |
| 179/180 <sub>v</sub> | > 99 %      | Bis zu 12.0                          |
| 600/601              | Bis zu 99 % | Bis zu 8.3                           |
| 600/601 <sub>v</sub> | > 99 %      | Bis zu 5.0                           |

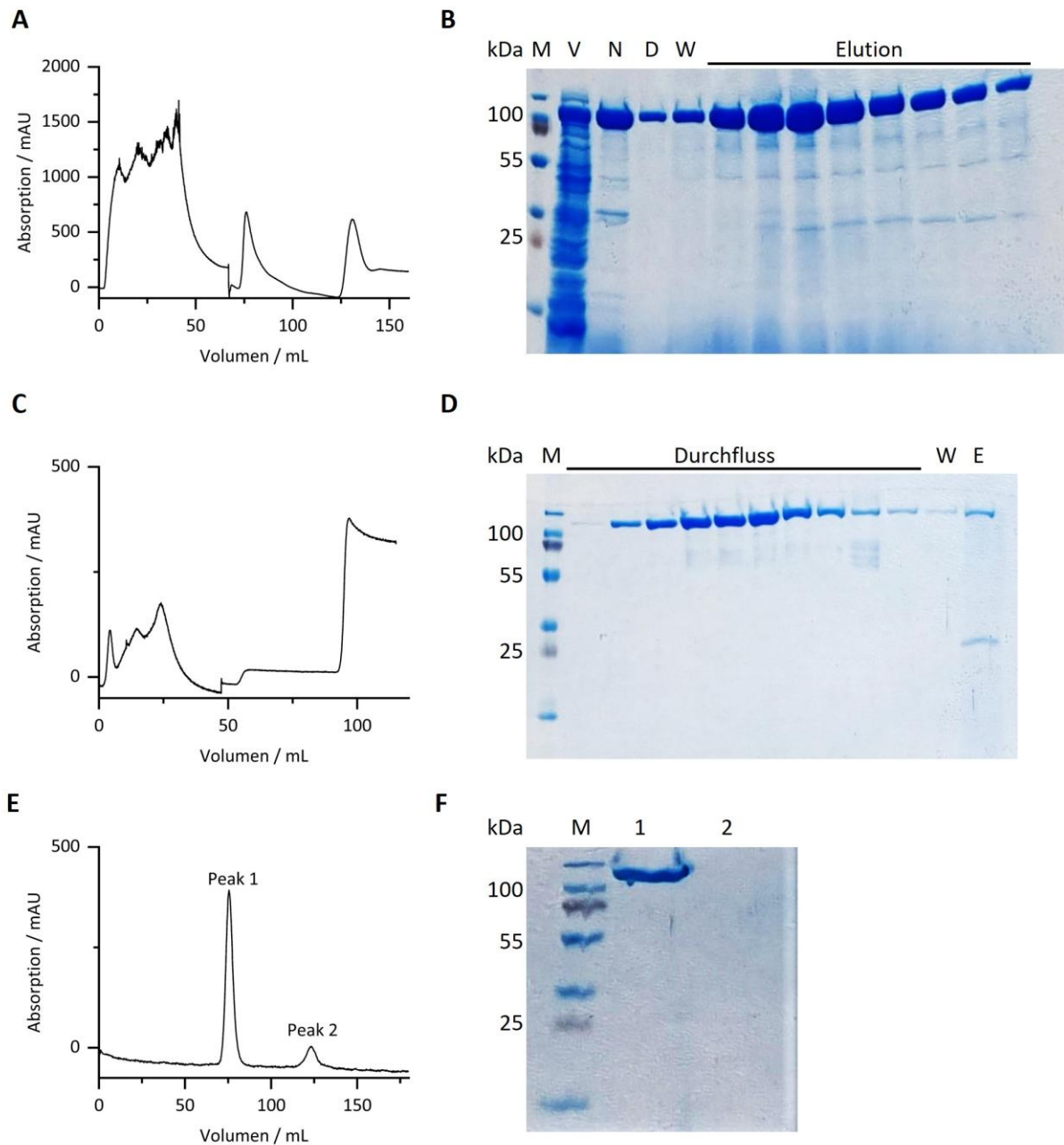


Abbildung 18: Ergebnisse der Reinigung der WT-Polymerase mit TEV-Proteaseschnittstelle zur Abtrennung des 6x-His-Tags. **A:** Chromatogramm der Ni-NTA-Chromatographie, **B:** SDS-PAGE der Ni-NTA-Chromatographie, M: 3  $\mu$ L PageRuler Plus prestained Protein Ladder, V: Zellprobe vor Induktion mit IPTG, N: Zellprobe nach Expression des Zielproteins, D: Durchfluss, W: Waschfraktion, **C:** Chromatogramm der reversen Ni-NTA-Chromatographie, **D:** SDS-PAGE der reversen Ni-NTA-Chromatographie, M: 3  $\mu$ L PageRuler Plus prestained Protein Ladder, W: Waschfraktion, E: Elution, **E:** Chromatogramm der Gelfiltration, **F:** SDS-PAGE der Gelfiltration, M: 3  $\mu$ L PageRuler Plus prestained Protein Ladder, 1: Peak 1, 2: Peak 2.

Aus Vorarbeiten<sup>[65]</sup> war bekannt, dass die Varianten mit jeweils verkürzter J $\alpha$ -Helix eine lichtsichtbare Inhibition von bis zu 40 Prozentpunkten aufweisen. Um diese Resultate um die Varianten mit nativer Länger der J $\alpha$ -Helix zu erweitern und darüber hinaus detailliertere Aussagen zum mechanistischen Einfluss der insertierten LOV-Domäne machen zu können, sollten im Folgenden die kinetischen Parameter der Polymerasen in *in-vitro*-Transkriptionsreaktionen im sog. *steady state* bestimmt werden. Dazu musste zunächst ein reproduzierbarer Assay etabliert werden.

### 3.2 Polymerase-Assay und Michaelis-Menten-Kinetik

Zur Bestimmung der kinetischen Parameter der T7-RNAP und ihrer photoaktiven Varianten musste die über die Zeit entstehende Menge an mRNA in *in-vitro*-Transkriptionsreaktionen (IVT) quantitativ analysiert werden. Dabei sollten die kinetischen Parameter über alle Substrate (ATP, CTP, GTP, UTP, dsDNA) gemittelt werden, woraus sog. apparente Daten resultieren. Dafür wurden eine lineare Matrize (dsDNA) mit T7-Promoter und ein geeignetes Nachweisverfahren benötigt. Die Entscheidung fiel für den Nachweis der entstehenden RNA mithilfe des fluoreszenten Intercalators SYBR™ Green II<sup>[93-94]</sup> (SG), der in einem Gemisch aus RNA und DNA eine höhere Quantenausbeute bei der Bindung an RNA aufweist ( $Q_{\text{DNA}} = 0.36$ ,  $Q_{\text{RNA}} = 0.54$ , Faktor:1.5).<sup>[94]</sup> Als Matrize wurde das Plasmid pAlterGC<sup>[95]</sup> (Abbildung 85) verwendet, das im Milligramm-Maßstab aus *E. coli* XL1-Blue isoliert und mit HindIII-HF® linearisiert wurde (Abschnitt 5.2.2.2 und Abbildung 90). Der schematische Ablauf der Reaktion ist in Abbildung 19 dargestellt. Es zeigte sich, dass das Plasmid statt durch standardisierte Präparation (Macherey-Nagel, NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Maxi Kit) mittels Phenol-Chloroform-Extraktion und DNA-Ethanol-fällung gereinigt werden musste, um die DNA weitestgehend von noch anhaftendem Protein zu befreien und eine reproduzierbare IVT zu ermöglichen.

Im Zuge der Etablierung des Assays mussten verschiedene weitere Faktoren optimiert werden, darunter die Konzentration der linearisierten DNA-Matrize, des Enzyms und des verwendeten Intercalators (vgl. Abbildung 123A und B sowie Abbildung 123C). Da der Farbstoff SG, statistisch betrachtet, hinter jeder dritten Base der mRNA (920 bp) bindet,<sup>[94]</sup> war theoretisch ein ca. 230-facher molarer Überschuss erforderlich. Da diese Menge an Farbstoff sowohl ein starkes Hintergrundsignal liefert als auch prinzipiell die Reaktion beeinflussen kann, wurde die IVT zunächst mit steigenden Konzentrationen an SG durchgeführt und vermessen. Dabei zeigte sich, dass sowohl der Umsatz der Reaktion als auch die Menge an gebildeter mRNA mit zunehmender Konzentration des Fluoreszenzfarbstoffs SG abnahmen (Abbildung 123C; Anhang), der Farbstoff also eine inhibierende Wirkung auf die Reaktion ausübt. Dies verhinderte eine kontinuierliche Messung der Reaktionskinetik, sodass die Reaktionsparameter für alle T7-RNAP-Varianten in Abstoß-Experimenten (diskontinuierlich) bestimmt werden mussten. Dafür wurden zu den gegebenen Zeitpunkten (s. Abschnitt 5.2.3.18) Proben entnommen und die Reaktion sofort durch Zugabe von SG (20 µM) abgestoppt. Im Anschluss wurde die Fluoreszenz jeder Probe im Mikrotiterplatten-Lesegerät gemessen.

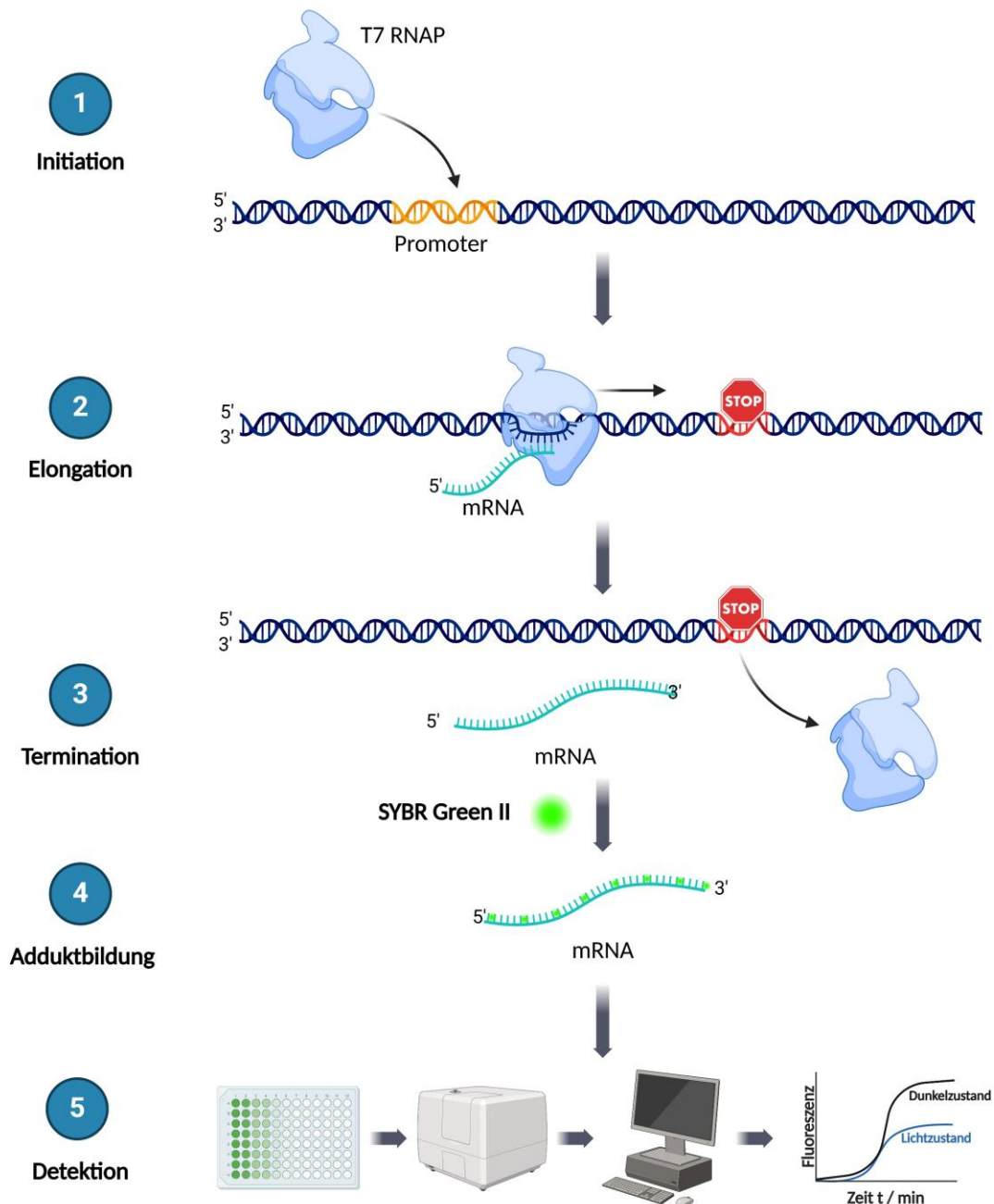


Abbildung 19: Schematische Übersicht über die IVT zur Bestimmung der apparenten Michaelis-Menten-Kinetik. Nach erfolgreicher *Initiation* (1) und *Elongation* (2) wird die gebildete mRNA bei der *Termination* (3) freigegeben. Der im Plasmid pAlterGC vorhandene T7-Terminator ist symbolisch als Stoppschild dargestellt. Anschließend erfolgt die Adduktbildung aus der entstandenen mRNA mit SYBR™-Green II (4) und die Detektion der Fluoreszenz des Adduktes mit dem Mikrotiterplatten-Lesegerät (5, Synergy2, BioTek).<sup>[89]</sup>

Um eine Umrechnung der willkürlichen Fluoreszenzeinheiten (engl. *arbitrary units*, a.u., *relative fluorescence units*, RFU) in Konzentrationseinheiten zu ermöglichen, wurde eine Kalibriergerade bestimmt (Abbildung 20A).

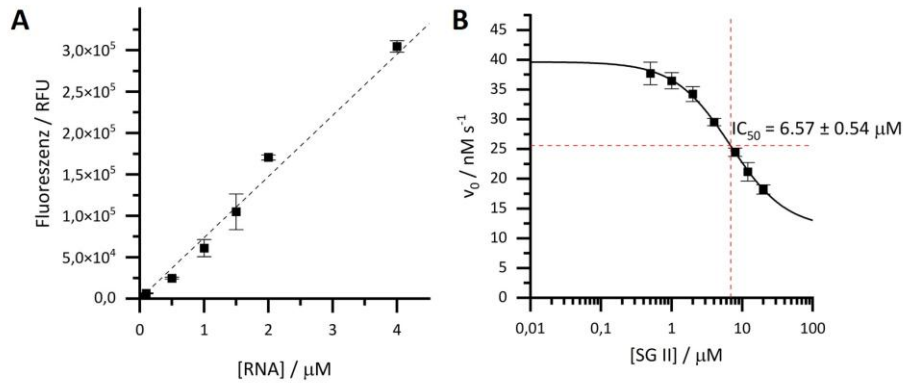


Abbildung 20: **A:** Fluoreszenz unterschiedlicher Konzentrationen der Produkt-mRNA mit 20  $\mu M$  SG. **B:** SG-Inhibitionskurve zur Bestimmung der mittleren inhibitorischen Konzentration. Die Anfangsgeschwindigkeit  $v_0/nM s^{-1}$  des Wildtypenzymys wurde gegen die variierende Konzentration an Interkalationsfarbstoff SG/ $\mu M$  aufgetragen und der  $IC_{50}$ -Wert mit Origin<sup>[96]</sup> berechnet.

Die für diese Untersuchungen erforderliche mRNA wurde in IVT synthetisiert (vgl. 5.2.3.17 *In-vitro*-Transkription) und durch Phenol-Chloroform-Extraktion und Ethanol-fällung gereinigt. Im Anschluss wurde die isolierte RNA in einer 96-Well-Mikrotiterplatte verdünnt (0.1  $\mu M$  – 4.0  $\mu M$ ), mit 20  $\mu M$  SG versetzt und die Fluoreszenz des mRNA-SG-Adduktes unter Verwendung eines Mikrotiterplatten-Lesegeräts (Synergy2, BioTek,  $\lambda_{EX} = 485 \pm 20$  nm,  $\lambda_{EM} = 528 \pm 20$  nm) bestimmt. Diese Messungen lieferten eine Kalibriergerade, aus der ein Umrechnungsfaktor von  $76.18 \pm 2.43 \frac{RFU}{nmol}$  ermittelt wurde. Im Anschluss erfolgte die Bestimmung der mittleren inhibitorischen Konzentration ( $IC_{50}$ ) des Farbstoffes SG. Dazu wurde die Anfangsgeschwindigkeit der Reaktion der WT-T7-RNAP in Abhängigkeit von der Farbstoffkonzentration gemessen. Durch ein logarithmisches Kurven-Fitting wurde aus den Daten eine inhibierende Konzentration  $IC_{50} = 6.57 \pm 0.54 \mu M$  ermittelt (Abbildung 20B). Für die geplanten Messungen wurde die SG-Konzentration auf mehr als das Dreifache des  $IC_{50}$ -Wertes festgelegt ( $c = 20 \mu M$ ), um eine vollständige Inhibierung der weiteren Transkriptionsreaktionen zu gewährleisten.

IVT-Reaktionen wurden zunächst gemäß der Beschreibung in Abschnitt 5.2.3.18 ohne eine Vorinkubation mit DTT durchgeführt und zu den vorgegebenen Zeitpunkten durch Zugabe von SG (20  $\mu M$ ) gestoppt. Die Fluoreszenz der SG-mRNA-Addukte wurde unmittelbar nach der Zugabe von SG gemessen und unter Zuhilfenahme des Umrechnungsfaktors in die entsprechende Konzentration an neu entstandener mRNA umgerechnet. Nachfolgend wurden die Anfangsgeschwindigkeiten der Reaktionen  $v_0$  durch lineare Regression der ersten 60 Sekunden aus der Auftragung der Konzentration  $c$  der RNA über die Zeit  $t$  bestimmt.

Im darauffolgenden Schritt wurden die in Triplikaten bestimmten Anfangsgeschwindigkeiten  $v_0$  gegen die Konzentration an Nukleosidtriphosphaten (rNTP) aufgetragen und mit der allgemeinen Michaelis-Menten-Gleichung gefittet (Gleichung 1):

$$v_0 = \frac{V_{Max}[rNTP]}{K_M + [rNTP]} \quad (1)$$

Die Ergebnisse dieser Messungen zeigten, dass die Anfangsgeschwindigkeit  $v_0$  bei Bestrahlung mit blauem Licht für jede Variante abnahm, also eine Inhibierung der Reaktion durch die strukturelle Änderung der allosterischen Domäne für alle Varianten erfolgt (s. Anhang, Abbildung 124). Im Rahmen dieser Experimente konnte jedoch festgestellt werden, dass eine 15-minütige Vorinkubation mit 10 mM DTT im Falle der photoaktiven Varianten die Anfangsgeschwindigkeit um einen Faktor von 1.5 bis 2 erhöht. Daher wurden die Messungen für alle Proteine mit der Vorinkubation mit 10 mM DTT wiederholt. Die Auswirkungen des DTT sind bei einem Vergleich der Michaelis-Menten-Kurven deutlich zu erkennen (Abbildung 21).

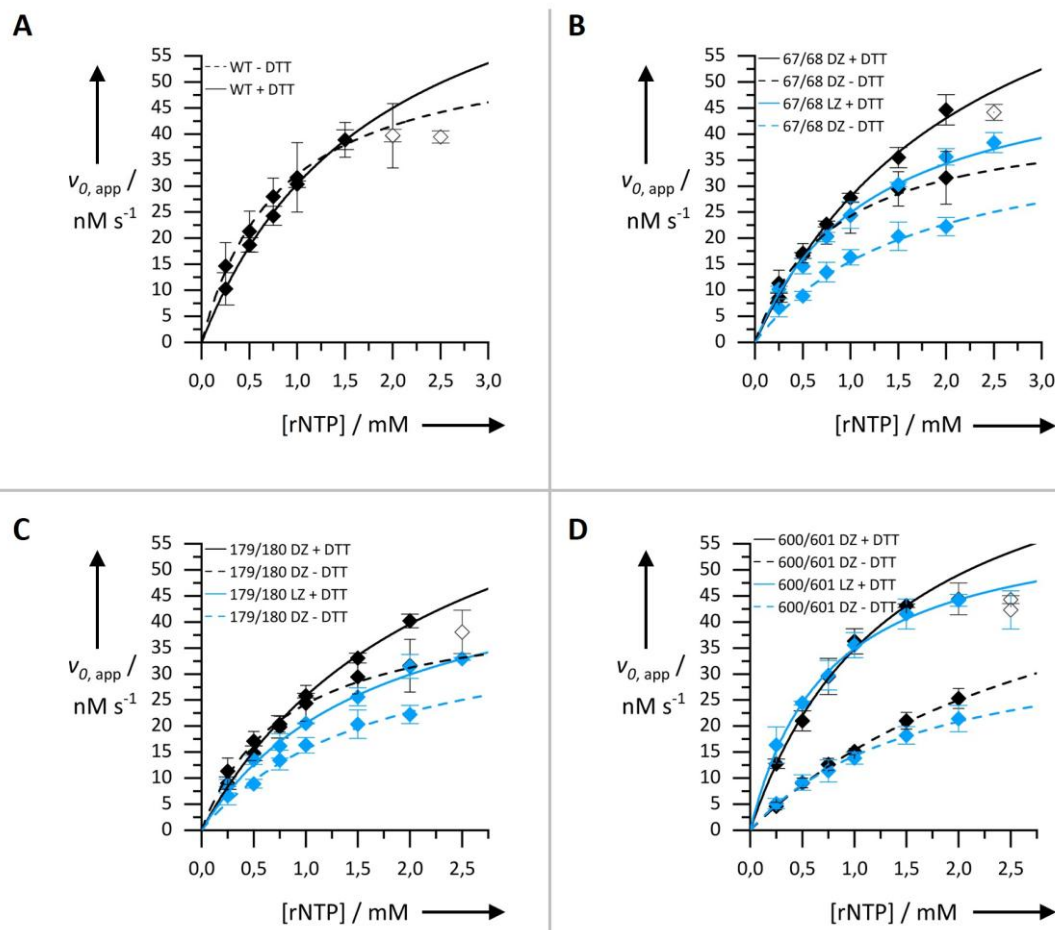


Abbildung 21: Ergebnisse der Michaelis-Menten-Kinetik mit (Volllinien) und ohne (Strichlinie) DTT im direkten Vergleich. Anfangsgeschwindigkeit  $v_0/\text{nM s}^{-1}$  aufgetragen gegen  $[\text{rNTP}]/\text{mM}$ . Kurven der Dunkelzustände sind in schwarz gezeigt (0 Lx), Kurven der Lichtzustände in hellblau ( $\lambda = 470 \text{ nm}$ , 92 Lx). In weiß markierte Datenpunkte wurden auf Grund von einsetzender Substratinhibition aus dem Fit ausgelassen. **A:** Kurven des Wildtypenzym, **B:** Michaelis-Menten-Kurven der photoaktiven Variante 67/68, **C:** Variante 179/180, **D:** Ergebnisse der Variante 600/601.

Da bei jedem Fusionsprotein sowohl der Dunkel- als auch der Lichtzustand betroffen ist, kann die Erhöhung der Anfangsgeschwindigkeit nicht mit einem Einfluss des DTT auf die kovalente Adduktbildung zwischen FMN und dem Cys450 in der  $E\alpha$ -Helix der LOV-Domäne zusammenhängen. Die strukturelle Analyse der T7-RNAP (PDB 2PI4<sup>[49]</sup>) mit Hilfe von PyMol<sup>[97]</sup> ergab die Präsenz von 13 Cysteinresten, von denen vier in der räumlichen Nähe zueinander liegen und somit die Möglichkeit besitzen, Disulfidbrücken auszubilden, die aufgrund einer Einschränkung der strukturellen Flexibilität eine inhibierende Wirkung zur Folge haben können.<sup>[98]</sup>

Im Falle der photoaktiven Varianten ist es möglich, dass der räumliche Anspruch der AsLOV2-Domäne die Abstände zwischen diesen Cysteinresten verkürzt und damit die Bildung von Disulfidbrücken begünstigt. Demnach wäre eine Erhöhung der Aktivität durch die Reduktion der Disulfidbrücken mit DTT eine schlüssige Erklärung für die Beobachtung.

Im Folgenden werden lediglich die Ergebnisse der Michaelis-Menten-Daten für IVT mit vorheriger DTT-Inkubation betrachtet. Diese Resultate wurden sowohl direkt (Abbildung 22) als auch doppelt reziprok aufgetragen (Abbildung 23) und zeigten, dass trotz der Insertion einer 144 AS großen Domäne die apparente, maximale Geschwindigkeit  $V_{max,app}$  im Dunkelzustand für alle untersuchten Varianten nahezu gleich der maximalen Geschwindigkeit des Wildtypenzym war. Darüber hinaus konnte für alle Varianten im Dunkelzustand sowie für das Wildtypenzym im Licht- und Dunkelzustand bei rNTP-Konzentrationen von  $\geq 2$  mM eine Substratinhibition beobachtet werden (Abbildung 22).

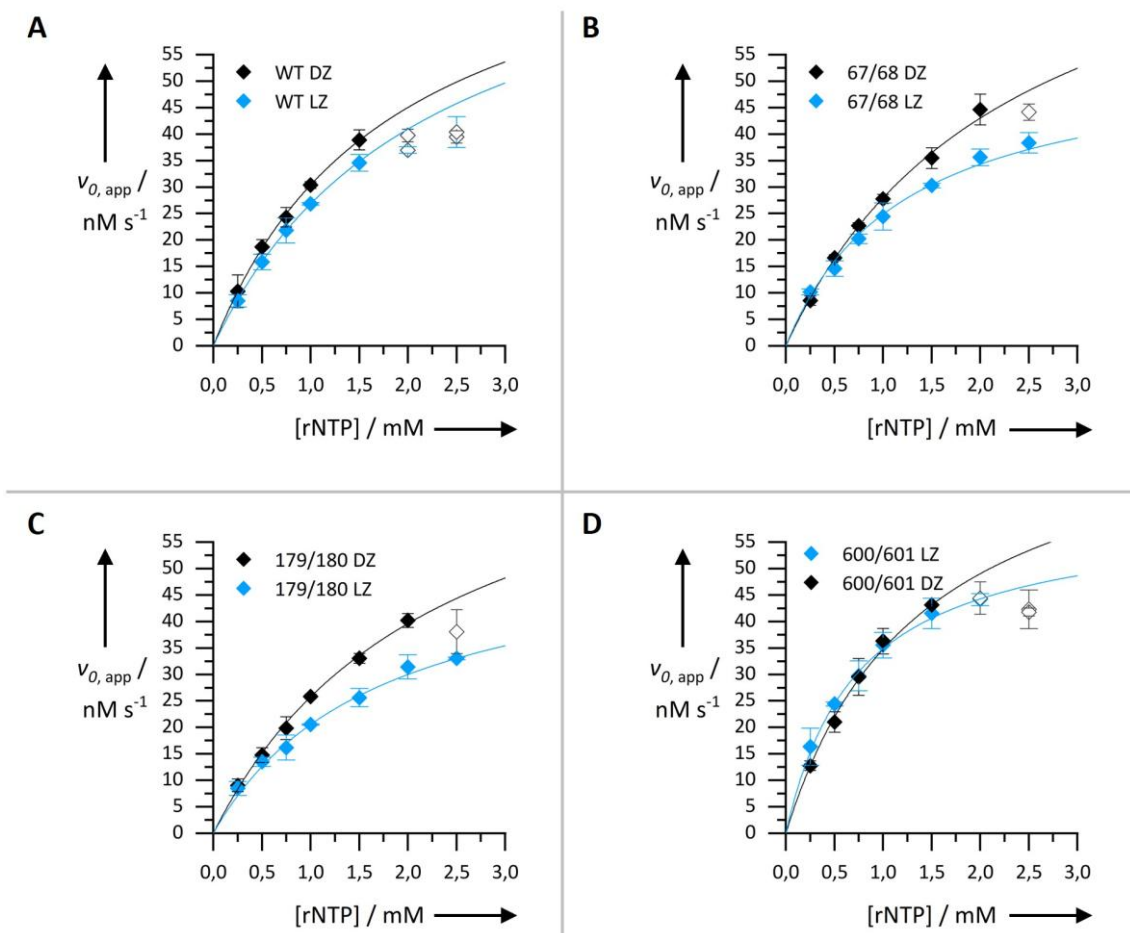


Abbildung 22: Ergebnisse der Michaelis-Menten-Kinetik. Die Anfangsgeschwindigkeit  $v_0/nM s^{-1}$  wurde gegen  $[rNTP]/mM$  aufgetragen. Kurven der Dunkelzustände sind in schwarz gezeichnet (0 Lx), Kurven der Lichtzustände in hellblau ( $\lambda = 470$  nm, 92 Lx). In weiß markierte Datenpunkte wurden auf Grund der einsetzenden Substratinhibition aus dem Fit ausgelassen. **A:** Kurven des Wildtypenzym, **B:** Michaelis-Menten-Kurven der photoaktiven Variante 67/68, **C:** Variante 179/180, **D:** Ergebnisse der Variante 600/601.

Die Anregung der photoaktiven Varianten mit blauem Licht ( $\lambda = 470 \text{ nm}$ ,  $92 \text{ Lx}$ , Abbildung 127) resultierte in einer Reduktion der maximalen Geschwindigkeit  $V_{max,app}$  um 30-40 %. Gleichzeitig wurde bei den Varianten 67/68 und 179/180 eine Abflachung der Michaelis-Menten-Kurven während der Bestrahlung mit Licht beobachtet. Bei der Variante 600/601 verlief die Kurve des Lichtzustands bei rNTP-Konzentrationen unterhalb von  $1.25 \text{ mM}$  nahezu identisch zu der des Dunkelzustands. Erst bei Konzentrationen oberhalb von  $1.25 \text{ mM}$  wurde ein abgeflachter Verlauf des Graphen sichtbar (Abbildung 22D), was in einer reduzierten maximalen Geschwindigkeit  $V_{max,app}$  von etwa 70 % des Dunkelzustandes resultierte.

Die aus der apparenten, maximalen Geschwindigkeit  $V_{max,app}$  abgeleiteten Wechselzahlen  $k_{cat,app}$  sowie die sich daraus ergebenden mittleren Transkriptionsraten sind in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3: Vergleich der Wechselzahlen  $k_{cat,app}/10^{-2} \text{ s}^{-1}$  und den daraus abgeleiteten Transkriptionsraten in  $\text{nt s}^{-1}$  (Template-Länge  $920 \text{ bp}$ ) für die jeweiligen Licht- und Dunkelzustände.

| Variante | $k_{cat,app}$ Dunkelzustand<br>/ $10^{-2} \text{ s}^{-1}$ | Transkriptionsrate<br>/ $\text{nt s}^{-1}$ | $k_{cat,app}$ Lichtzustand<br>/ $10^{-2} \text{ s}^{-1}$ | Transkriptionsrate<br>/ $\text{nt s}^{-1}$ |
|----------|---|--|--|--|
| WT       | $8.69 \pm 0.47$   | $80 \pm 4$                                 | $8.65 \pm 0.32$  | $80 \pm 3$                                 |
| 67/68    | $9.33 \pm 0.69$   | $86 \pm 6$                                 | $5.52 \pm 0.33$  | $51 \pm 3$                                 |
| 179/180  | $8.54 \pm 0.59$   | $79 \pm 5$                                 | $5.50 \pm 0.10$  | $51 \pm 1$                                 |
| 600/601  | $8.30 \pm 0.32$   | $76 \pm 3$                                 | $6.07 \pm 0.08$  | $56 \pm 1$                                 |

Die Transkriptionsraten des Wildtypenzym und der T7-RNAP-Varianten befinden sich für die  $920 \text{ bp}$  lange dsDNA zwischen  $51 \text{ nt s}^{-1}$  und  $86 \text{ nt s}^{-1}$  und liegen damit in dem in der Literatur beschriebenen Bereich ( $60 \text{ nt s}^{-1}$  bis  $100 \text{ nt s}^{-1}$ ).<sup>[78-80]</sup>

Im Vergleich zum Wildtypenzym resultiert die Insertion der LOV-Domäne an den Positionen 67/68 und 179/180 in einer Erhöhung der Michaelis-Menten-Konstante  $K_{M,app}$  und demzufolge in einer Abschwächung der Enzym-Substrat-Wechselwirkung. Im Gegensatz dazu führte die Insertion der LOV-Domäne zwischen den AS 600 und 601 zu einer Verringerung der Konstante  $K_{M,app}$ , also zu einer Förderung der Wechselwirkungen zwischen der Polymerase und ihren Substraten (Abbildung 24). Bei Bestrahlung mit blauem Licht konnte schließlich bei allen Varianten eine Reduktion des Wertes  $K_{M,app}$  um ca. 30-50 % beobachtet werden (Abbildung 24B). Die räumliche Umstrukturierung der Effektor-domäne bei Anregung mit Licht führte somit zu einer Begünstigung der rNTP-Bindung im Vergleich zum jeweiligen Dunkelzustand.

Bei der Variante 600/601 führte die moderate Reduktion der Geschwindigkeit  $V_{max,app}$  (Abbildung 24A) in Kombination mit der starken Reduktion der Michaelis-Menten-Konstante  $K_{M,app}$  zu einer signifikanten Erhöhung der katalytischen Effizienz  $k_{cat,app}/K_{M,app}$ , wobei sich diese um fast 100 % im Vergleich zur Wildtyp-Polymerase erhöhte (Abbildung 24D). Für die Varianten 67/68 und 179/180 konnte eine nahezu identische katalytische Effizienz beobachtet werden, die zu etwa gleichen Teilen auf die Reduktion der beiden Parameter  $V_{max,app}$  und  $K_{M,app}$  zurückzuführen ist (Abbildung 24D).

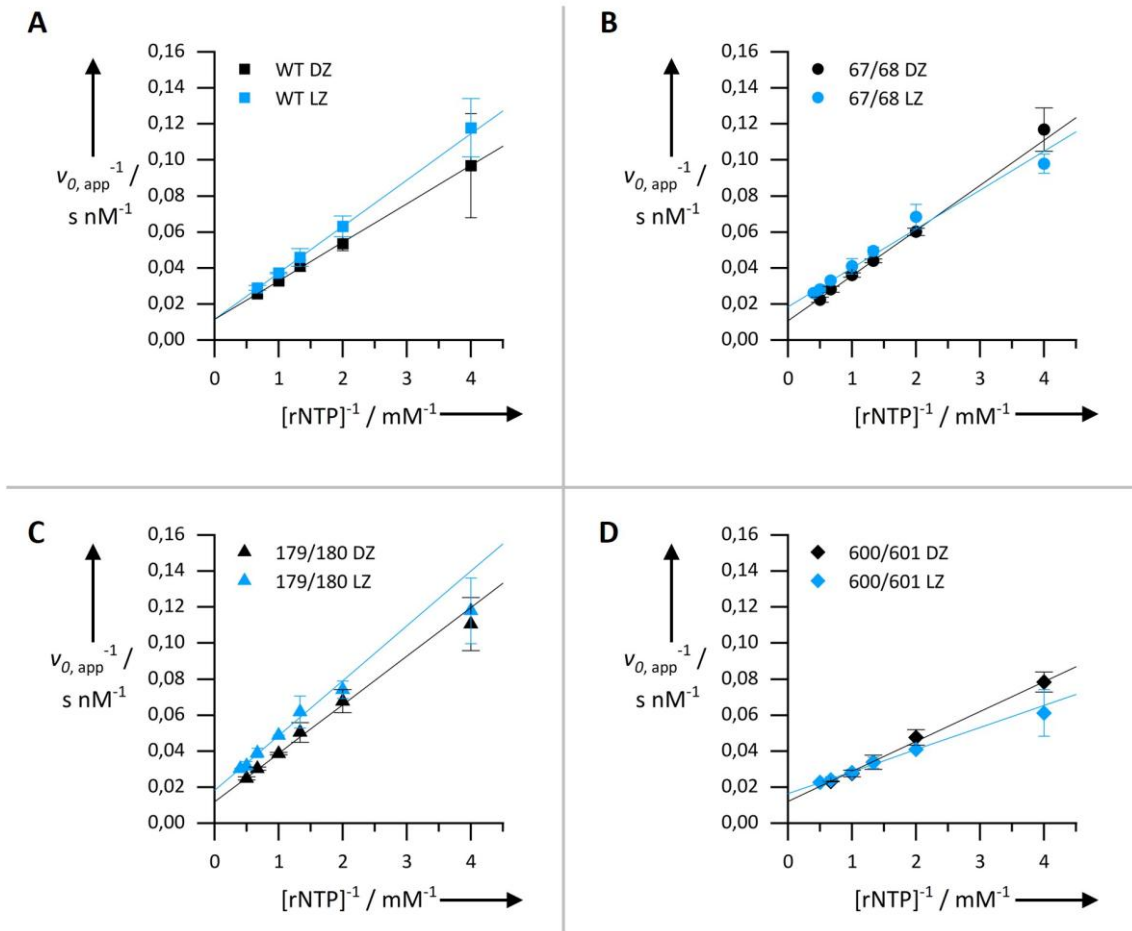


Abbildung 23: Lineweaver-Burk-Auftragung der Kinetikmessungen. Schwarz: Dunkelzustand, hellblau: Lichtzustand der jeweiligen Variante. **A:** Wildtyp-Enzym, **B:** Variante 67/68, **C:** Fusionsprotein 179/180, **D:** Variante 600/601.

Um den Einfluss der insertierten Domäne auf die Polymerase besser einordnen zu können, wurden die kinetischen Daten in einem Lineweaver-Burk-Plot dargestellt (Abbildung 23). Dadurch war es möglich, die Art der Inhibierung zu bestimmen, die als Folge des Lichtzustandes der LOV-Domäne beobachtet wurde. Aufgrund der kovalenten Verbindung zwischen der Domäne und T7-RNAP und der daraus resultierenden Beeinflussung sowohl des Enzyms als auch des Enzym-Substrat-Komplexes wurde eine gemischte Hemmung<sup>[99]</sup> der Polymerase bei Anregung mit blauem Licht erwartet. Eine solche konnte anhand der Lineweaver-Burk-Auftragung für zwei der drei LOV-T7-RNAP-Varianten (67/68 und 600/601, vgl. Abbildung 23B und D) bestätigt werden, erkennbar an einem Schnittpunkt der linearen Graphen für Dunkel- und Lichtzustand im ersten Quadranten des Plots.<sup>[99]</sup> Für die Variante 179/180 stellte sich die Situation jedoch anders dar: Hier musste aufgrund der nahezu parallelen Verschiebung des linearen Graphen vom Dunkel- zum Lichtzustand auf eine unkompetitive Inhibition<sup>[99]</sup> geschlossen werden.

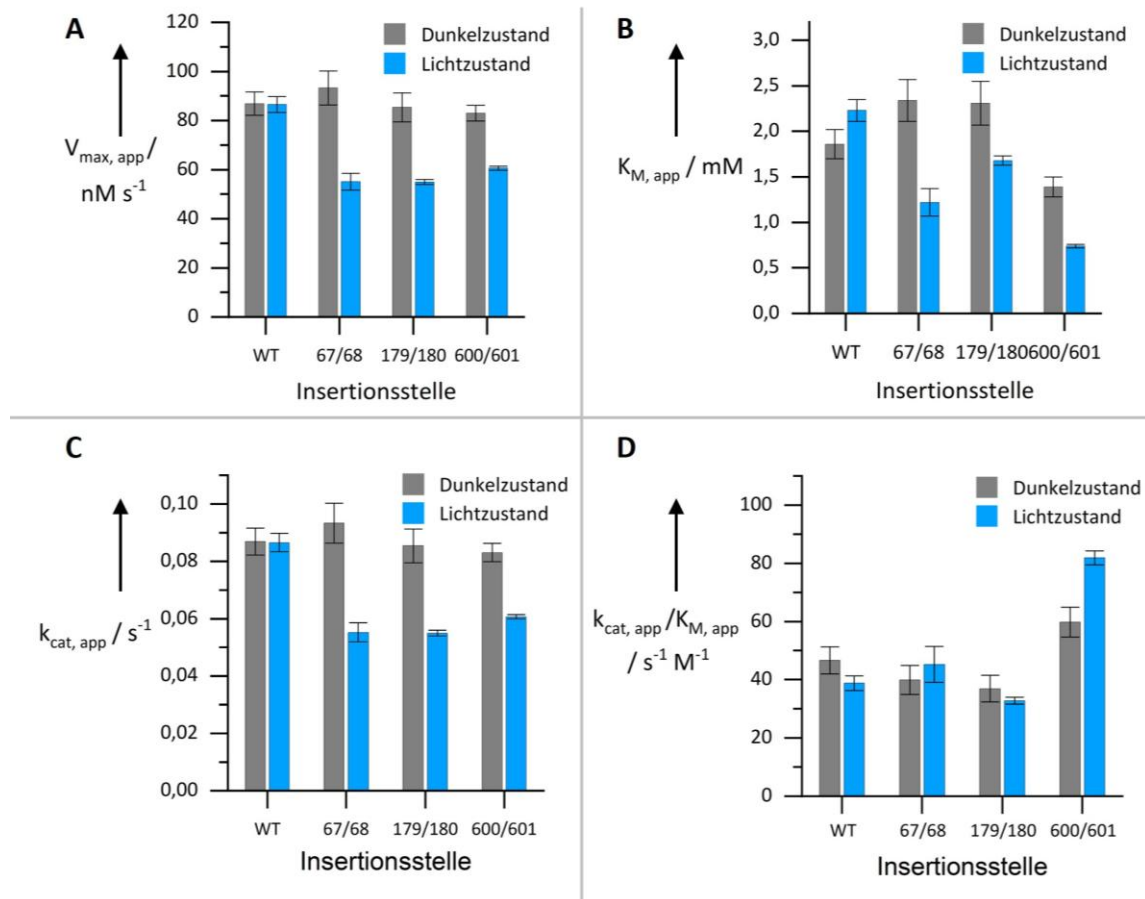


Abbildung 24: Aus der Michaelis-Menten-Kinetik berechnete apparente Parameter des Wildtypenzym und der photoaktiven Varianten bei Abwesenheit von Licht (0 Lx, dunkelgrau) und bei Bestrahlung mit blauem Licht ( $\lambda = 470 \text{ nm}$ , 92 Lx). **A:** Maximale Geschwindigkeit  $V_{max,app} / nM s^{-1}$ , **B:** Michaelis-Menten-Konstante  $K_{M,app} / mM$ , **C:** Wechselzahl  $k_{cat,app} / s^{-1}$ , **D:** Katalytische Effizienz  $k_{cat,app} / K_{M,app} / s^{-1} M^{-1}$ .

Dieses Resultat führte zu der Vermutung, dass sterische Hinderungen und strukturelle Veränderungen in der Gesamtstruktur des Enzyms eine Rolle spielen, und nicht nur relative strukturelle Veränderungen von LOV und Polymerase.

Im Anschluss an die detaillierte kinetische Betrachtung und Einordnung der Inhibierungsarten der bisherigen Varianten der T7-RNAP sollten neue photoaktive Varianten des Enzyms identifiziert werden, die nicht aus bisher bekannten *split*-Positionen resultieren. Im Rahmen des Proteindesigns wurden zwei verschiedene Ansätze zur Identifizierung neuer Insertionspositionen in Betracht gezogen.

### 3.3 Identifikation neuer Insertionspositionen

Bei der gerichteten Evolution<sup>[100]</sup> können geeignete Insertionspositionen durch zufällige Einbringung<sup>[101-102]</sup> der AsLOV2-Domäne identifiziert und anschließend aktive sowie schaltbare Varianten innerhalb der Proteinbibliothek selektiert werden. Da diese Methode jedoch mit einem erheblichen experimentellen Aufwand einhergeht, wurde eine rationale Designstrategie gewählt.<sup>[103-104]</sup> Bei diesem Ansatz wurden in Anlehnung an ein Protokoll von Dagliyan *et al.*<sup>[104]</sup> Kriterien formuliert, die die Insertionsstellen, an welchen eine regulatorische Domäne mit einer Effektor-domäne fusioniert werden soll, charakterisieren. Diese Kriterien umfassen erstens, dass die Aminosäuren, welche die Insertionsstelle flankieren, nicht konserviert sein sollen, zweitens, dass sich die Insertionsposition in einer lösemittel-exponierten (oberflächennahen) engen Schleife (*tight loop*) befindet und drittens zwischen zwei Sekundärstrukturelementen liegt.<sup>[104]</sup> Für T7-RNAP ergibt sich aus der Anwendung dieser Regeln exemplarisch das in Abbildung 25 gezeigte Bild. - Die Ergebnisse für die gesamte Primärstruktur der T7-RNAP sind im Anhang dargestellt (Abbildung 110-Abbildung 112).

Zunächst wurde die evolutive Konservierung der Primärstruktur der T7-RNAP (Uniprot: P00573) mit einer publizierten Kristallstruktur (PDB 2PI4<sup>[49]</sup>) auf dem Webserver MISTIC<sup>[105]</sup> bestimmt (Abbildung 25A, Abbildung 110). Hier wurde zunächst ein multiples Sequenzalignment (*multiple sequence alignment*, MSA) durchgeführt und die evolutive Konservierung anhand der Kullback-Leibler-Divergenz<sup>[106]</sup> (auch relative Entropie genannt) bestimmt. In Übereinstimmung mit dem publizierten Protokoll<sup>[104]</sup> wurden alle Aminosäuren mit einem Kullback-Leibler-Wert kleiner als zwei als „nicht konserviert“ klassifiziert (Abbildung 25A).

Im Anschluss wurde die lösemittelzugängliche Fläche (*solvent-accessible area*, SAA) mithilfe des Programms STRIDE<sup>[107-108]</sup> bestimmt. Jede AS mit einer Fläche  $> 30 \text{ \AA}^2$  wurde als lösemittelzugänglich klassifiziert (Abbildung 25B, Abbildung 111). Die Ergebnisse der ersten beiden Kriterien wurden im Folgenden ausgewertet und zusammengeführt, indem für jedes erfüllte Kriterium einer Aminosäure der Wert eins vergeben und die Bewertungen für jede Aminosäure addiert wurden. Folglich erfüllten alle AS mit einem Wert von zwei beide Kriterien und wurden einer detaillierteren Betrachtung unterzogen (Abbildung 25C, Abbildung 112). Im dritten Schritt erfolgte eine graphische Darstellung der Kontakte zwischen den Sekundärstrukturelementen innerhalb eines Radius von  $7 \text{ \AA}$  mittels einer Kontaktkarte (*contact map*), die von dem Programm CMView<sup>[109]</sup> erstellt wurde. Abbildung 26 zeigt, dass Kontakte zwischen Sekundärstrukturelementen hier als Signale senkrecht zur Diagonalen dargestellt werden. Im letzten Schritt wurden nicht-konservierte Aminosäuren, die sich in einer lösemittel-exponierten, engen Schleife zwischen zwei Sekundärstrukturelementen befinden, mit Hilfe von PyMol<sup>[97]</sup> validiert.

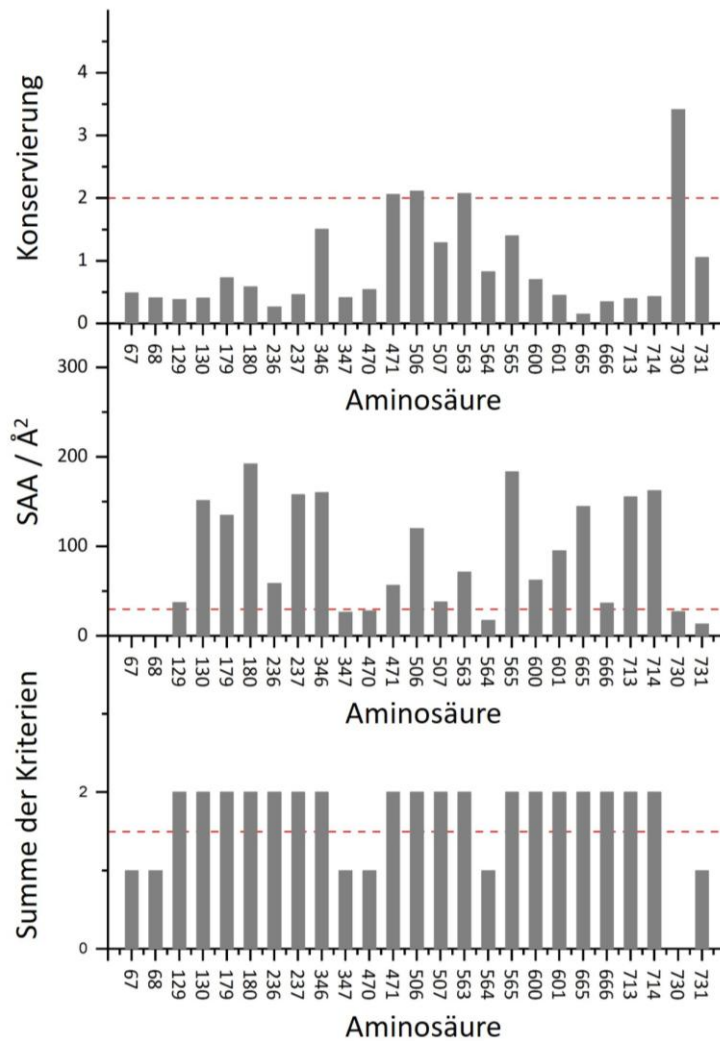


Abbildung 25: Darstellung der Ergebnisse der Anwendung der Kriterien für neue Insertionspositionen an ausgewählten Positionen der Primärstruktur von T7-RNAP. **A:** Mit Hilfe von MISTIC<sup>[105]</sup> berechnete Sequenzkonservierung, **B:** Durch Stride<sup>[107-108]</sup> berechnete lösemittelzugängliche Fläche SAA/Å<sup>2</sup>, **C:** Summe der Kriterien, jeweils um eins erhöht bei Erfüllung eines der vorherigen Kriterien.

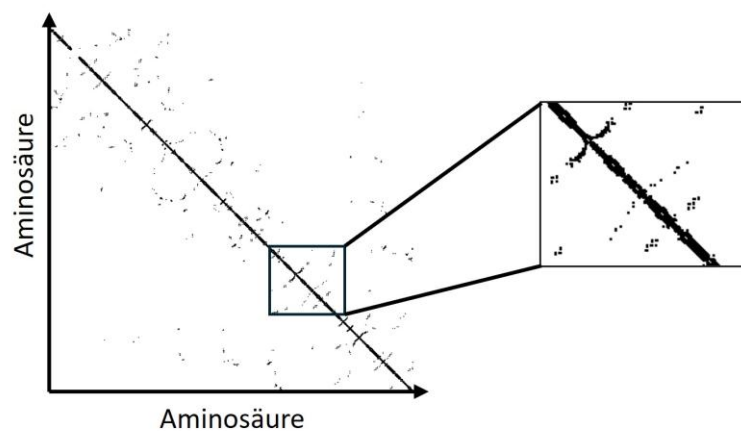


Abbildung 26: Mit CMView<sup>[109]</sup> erstellte Kontaktkarte der C $\alpha$ -Atome der AS mit einem Abstand von 7 Å. Kontakte zwischen Sekundärstrukturelementen sind durch Signale senkrecht zur Diagonalen zu erkennen. Zur Berechnung wurde die Kristallstruktur 2PI4<sup>[49]</sup> verwendet.

Insgesamt konnten durch diese Vorgehensweise sieben neue Insertionspositionen in T7-RNAP identifiziert werden (Abbildung 27). Zwei dieser Insertionspositionen befanden sich in der N-terminalen Domäne (129/130, 236/237), während die übrigen fünf Insertionspositionen in der Polymerasedomäne lagen (470/471, 506/507, 665/666, 713/714, 730/731). Zusätzlich sollte eine in Vorarbeiten unlöslich angefallene Variante (564/565)<sup>[65]</sup> durch Verschiebung der Insertionsposition um eine AS (auf die Position 563/564) innerhalb einer oberflächennahen Schleife zentriert werden.

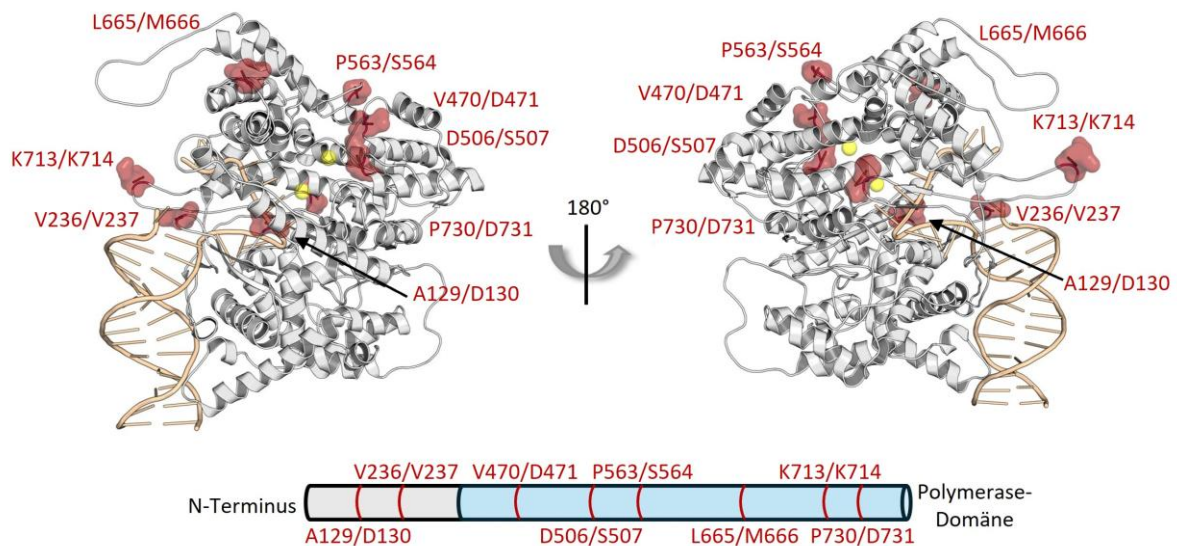


Abbildung 27: Darstellung der potenziellen neuen Insertionspositionen in der Kristallstruktur des Initiationskomplexes (PDB 2PI4<sup>[49]</sup>) sowie schematisch innerhalb der Primärstruktur der WT-T7-RNAP (unten).

Diese acht Varianten wurden für die Klonierung, Expression und Reinigung ausgewählt, gefolgt von einer abschließenden Analyse in *in-vitro*-Transkriptionsreaktionen.

In Tabelle 4 sind diese acht Varianten der T7-RNA-Polymerase noch einmal zusammengefasst.

Tabelle 4: Durch computerbasierte Methoden identifizierte Insertionspositionen mit Konstruktname, \* durch Verschiebung der bereits bekannten Insertionsposition um 1 AS entstanden.

| Konstrukt      | Insertionsposition bezogen auf die Uniprot-Sequenz (P00573) |
|----------------|---|
| T7LOV-129/130  | A129/D130   |
| T7LOV-236/237  | V236/V237   |
| T7LOV-470/471  | V470/D471   |
| T7LOV-506/507  | D506/S507   |
| T7LOV-563/564* | P563/S564   |
| T7LOV-665/666  | L665/M666   |
| T7LOV-713/714  | K713/K714   |
| T7LOV-730/731  | P730/D731   |

### 3.4 Klonierung, Expression und Reinigung neuer Varianten

Die Insertion der Gensequenz von AsLOV2 (NPH1-1, Uniprot: O49003, AS 404-546, PDB 2V1A<sup>[26]</sup>) erfolgte analog zur Erzeugung der Varianten 67/68, 179/180 und 600/601 (Abschnitt 3.1). Der Klonierungserfolg wurde erneut durch Restriktionsanalyse (Abbildung 91) und Sequenzierung überprüft.<sup>[110-111]</sup> Die klonierten Varianten wurden nachfolgend im 1-L-Maßstab heterolog in *E. coli* BL21[pRep4] exprimiert und nach dem etablierten Verfahren gereinigt (Abschnitt 3.1, Abbildung 103-Abbildung 108).<sup>[110-111]</sup> Während der Aufreinigung fielen zwei der acht Varianten bereits während der ersten Dialyse unlöslich an (Abbildung 102).<sup>[111]</sup> Die übrigen sechs Varianten konnten mit einer Ausbeute von 0.5 mg bis 9.9 mg pro Liter Expressionskultur in Reinheiten von 78 % bis > 99 % erhalten werden (Abbildung 28<sup>[110]</sup> und Tabelle 5) und sind bei der Gelelektrophorese im Bereich zwischen 100 kDa und 130 kDa deutlich zu erkennen. Einzelne Varianten (236/237 und 713/714) wiesen nur geringe Verunreinigungen auf.

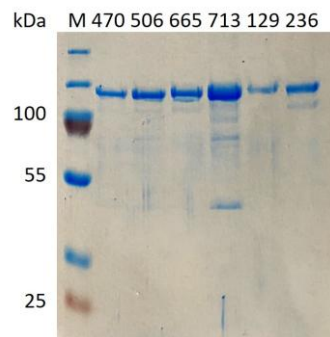


Abbildung 28: SDS-PAGE der gereinigten neuen T7-RNAP-Varianten. M: 3  $\mu$ L PageRuler Plus prestained Protein Ladder, die Beschriftung oberhalb der Spuren entspricht der ersten AS der Insertionsposition.<sup>[110]</sup>

Tabelle 5: Ausbeuten und Reinheiten der neuen Proteinvarianten nach erfolgter Aufreinigung.

| Variante | Reinheit | Ausbeute / mg L <sup>-1</sup> Kultur |
|----------|----------|--------------------------------------|
| 129/130  | 95 %     | 0.5                                  |
| 236/237  | 90 %     | 9.9                                  |
| 470/471  | > 99 %   | 3.6                                  |
| 506/507  | 92 %     | 2.7                                  |
| 665/666  | 95 %     | 6.1                                  |
| 713/714  | 78 %     | 3.6-7.1                              |

### 3.5 *In-vitro*-Transkriptionsreaktionen mit Endpunktbestimmung

Zur Bestimmung der Aktivität und der Lichtschaltbarkeit wurden die gereinigten His-Tag-tragenden Varianten der T7-RNAP in *in-vitro*-Transkriptionsreaktionen untersucht. Der N-terminale 6x-His-Tag blieb zur Vergleichbarkeit mit Ergebnissen aus Vorarbeiten<sup>[65,86]</sup> und zur Vereinfachung der Reinigung am Protein erhalten. Die Reaktionen wurden wie unter 5.2.3.17 beschrieben mit einer linearen Sequenz (920 bp, GFP-codierende Sequenz unter einem T7-Promoter, Abbildung 85) durchgeführt. Die Menge der gebildeten mRNA wurde auf denaturierenden Agarosegelen (sog. Bleichgelen, vgl. 5.2.2.9) analysiert (Abbildung 29) und mit der Software ImageJ<sup>[112]</sup> quantifiziert.

Erste Untersuchungen mit den Varianten 67/68, 179/180 und 600/601 zeigten, dass die Reaktionen sowohl im Dunkel- (0 Lx), als auch im Lichtzustand (92 Lx,  $\lambda = 470 \text{ nm}$ ) bereits nach fünf Minuten ihren Gleichgewichtszustand erreicht hatten.

Eine der sechs neuen Varianten, 665/666, zeigte ebenfalls nach fünf Minuten Reaktionszeit die Bildung des Produktes (Abbildung 31). Bei den übrigen fünf löslichen neuen Varianten ließ sich keine oder nur eine geringe Menge an gebildeter mRNA nachweisen. Durch die Bildung geringer Mengen des Produktes konnte bei den Varianten (506/507 und 713/714) von einer verlangsamten Reaktionsgeschwindigkeit ausgegangen werden. Daher wurden die Reaktionen für die Varianten, die nach fünf Minuten keine oder nur eine geringe Produktmenge bildeten, erneut, allerdings mit einer Reaktionszeit von einer Stunde durchgeführt. Dabei konnte für drei Varianten (470/471, 506/506, 713/714) die Bildung von mRNA nachgewiesen werden (Abbildung 30).

Die beiden Varianten, welche eine Insertion der LOV-Domäne in der N-terminalen Domäne der Polymerase aufweisen, zeigten weder nach fünf noch nach 60 Minuten Reaktionszeit eine RNA-Bildung (Abbildung 29C und E, Abbildung 30B und C) und wurden als inaktiv eingestuft (Abbildung 31).

Von den neu entwickelten Fusionsproteinen erwiesen sich vier als funktionell aktiv, wobei drei Varianten (470/471, 506/507 und 713/714) unter Bestrahlung mit blauem Licht eine teilweise Inhibition von bis zu 30 % zeigten (Abbildung 31). Im Vergleich zu zuvor erzeugten Varianten wies nur eines der neuen Fusionsproteine eine RNA-Bildung nach kurzer Reaktionszeit auf (Variante 665/666, Abbildung 31). Eine weitere Variante, 713/714, zeigte eine lichtabhängige Inhibition in ähnlichem Umfang wie die bereits detailliert untersuchten Proteine (Varianten 67/68, 179/180 und 600/601, s. Abschnitt 3.2). Eine stärkere Hemmung oder Aktivierung durch blaues Licht wurde nicht festgestellt.

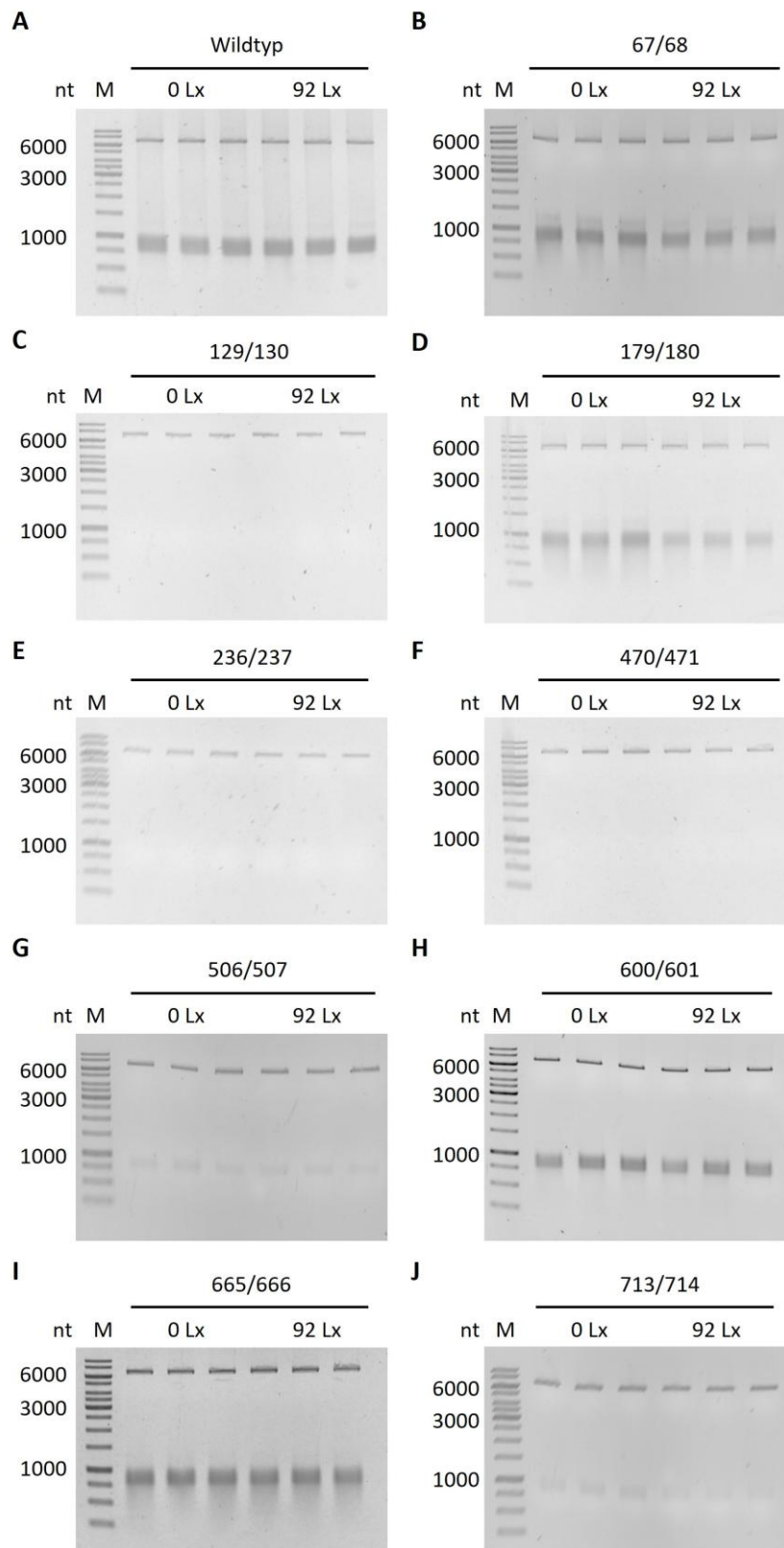


Abbildung 29: Denaturierende Agarosegele, die die Reaktionen der LOV-T7 RNAP-Fusionsvarianten im Dunkel- und Licht-Zustand nach fünf Minuten Reaktionszeit zeigen. Die Ergebnisse der Varianten sind in aufsteigender Reihenfolge der Aminosäuren-Nummerierung dargestellt.

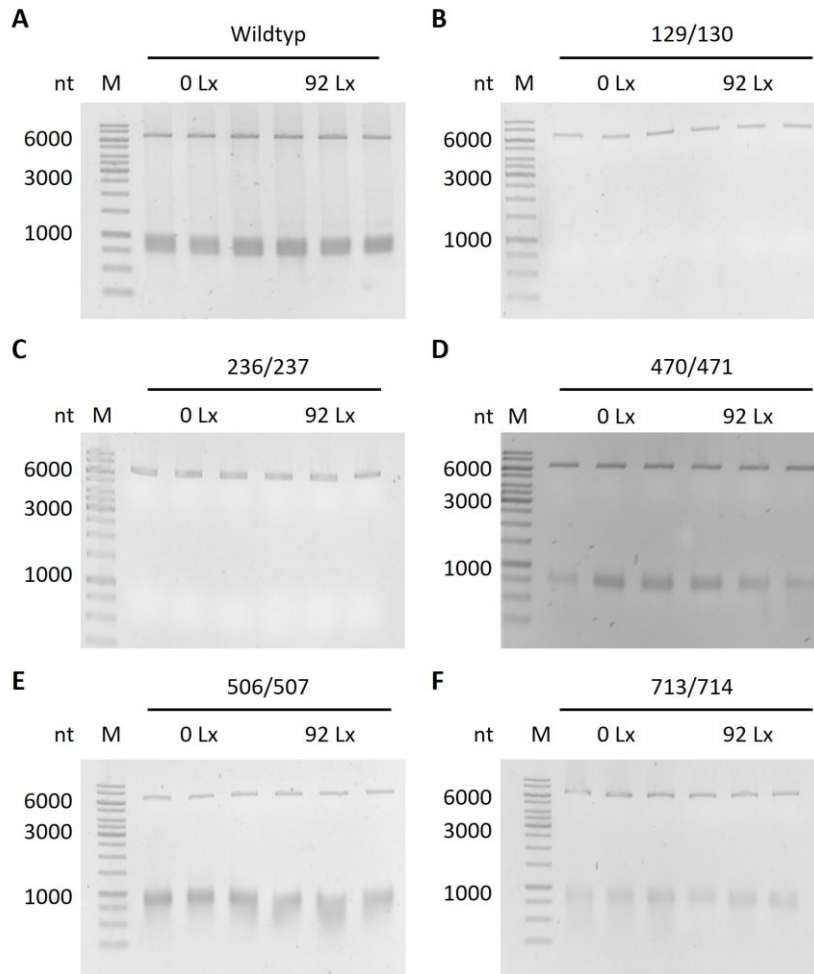


Abbildung 30: Denaturierende Agarosegele, die die Reaktionen der LOV-T7 RNAP-Fusionsvarianten im Dunkel- und Licht-Zustand nach 60 Minuten Reaktionszeit zeigen. Die Ergebnisse der Varianten sind in aufsteigender Reihenfolge der Aminosäuren-Nummerierung dargestellt.

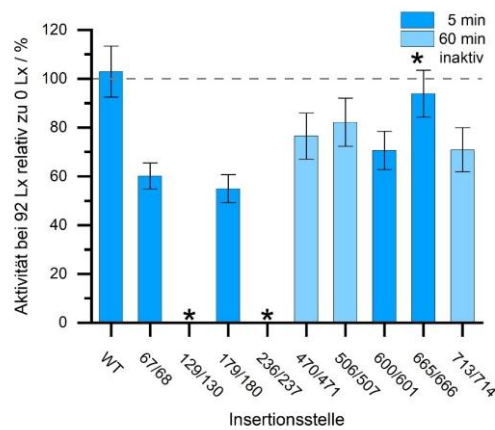


Abbildung 31: Relative Aktivität der Varianten bei Bestrahlung mit blauem Licht ( $\lambda = 470 \text{ nm}$ , 92 Lx) im Vergleich zum Dunkelzustand (0 Lx) nach fünf (dunkelblau) bzw. 60 Minuten (hellblau) Reaktionszeit, inaktive Varianten sind durch \* gekennzeichnet. Der Dunkelzustand wurde zur Auswertung auf 100 % gesetzt und ist durch die gestrichelte Linie verdeutlicht.

Für die Analyse der Insertionsstellen unter Berücksichtigung der angewandten Kriterien wurden zusätzlich die B-Faktoren (auch Temperatur-Faktoren oder Debye-Waller-Faktoren genannt<sup>[113]</sup>) der AS einbezogen. Die B-Faktoren werden bei der Lösung von Kristallstrukturen berechnet und geben die mittlere quadratische Verschiebung eines Atoms von seiner Position innerhalb der Kristallstruktur an. Sie dienen als Maß für die thermische Bewegung und strukturelle Unordnung und werden als Indikator für die Flexibilität verwendet.<sup>[113-115]</sup> Die B-Faktoren der WT-T7-RNAP wurden dabei aus einer publizierten Kristallstruktur des Initiationskomplexes entnommen (PDB 2PI4<sup>[49]</sup>). Aus der Korrelation der Aktivität mit den ermittelten Schaltbarkeiten (vgl. Anhang, Tabelle 39), den Kriterien für die Insertionsposition und den B-Faktoren konnten einige Regeln für die Insertion der LOV-Domäne in die T7-RNAP abgeleitet werden:

1. Eine für Lösemittel zugängliche Fläche einer oder beider AS an der Insertionsstelle von  $< 20 \text{ \AA}^2$  führt zu unlöslichem Protein.
2. Die Insertion der AsLOV2-Domäne in für die Polymerase essenzielle Strukturelemente führt zu inaktiven Fusionsproteinen (z.B. DNA-bindende Region in der N-terminalen Domäne, siehe Variante 129/130 und 236/237).
3. Aktive Varianten mit signifikanter lichtabhängiger Inhibition ( $\geq 30 \%$ ) werden nur erhalten, wenn alle Kriterien erfüllt sind und der B-Faktor der Insertionsstelle  $> 100$  ist.

Diese Regeln könnten auch für strukturell ähnliche Polymerasen (Polymerasefamilie I, PFAM-ID: PF00476) gelten.

Die insgesamt größte lichtabhängige Veränderung wurde bei der Variante 179/180 beobachtet, deren Aktivität durch blaues Licht um etwa 45 % reduziert wurde (vgl. Abbildung 31). Hier stellte sich die Frage, ob die strukturelle Beeinflussung<sup>[26,29,37]</sup> der Polymerase-Aktivität durch Licht mithilfe weiterer Modifikationen, z.B. Verlängerung der  $\alpha$ -Helix der LOV-Domäne, erhöht werden kann. Im Folgenden werden zwei Ansätze beschrieben, die verfolgt wurden, um dieses Ziel zu erreichen.

### 3.6 Optimierung der Schaltbarkeit der Polymerase-Aktivität

Eine Annahme zur Wirkung der LOV-Domäne auf das mit ihr verbundene Effektorprotein ist, dass die  $J\alpha$ -Helix nach Anregung mit Licht dissoziiert<sup>[29,37]</sup> und wie ein Hebelarm fungiert, der die Struktur des Effektors beeinflusst. Um diesen Effekt am Beispiel der T7-RNAP-Variante 179/180 zu verstärken, sollte in dieser Proteinsequenz die C-terminale  $J\alpha$ -Helix der AsLOV2 durch rigide helikale Strukturelemente verlängert werden. Dafür wurden zwei verschiedene Sequenzen ausgewählt, das Collagen-ähnliche Motiv  $(GPP)_2$ <sup>[116]</sup> und ein acht bzw. 18 AS langes Fragment aus der Myosin-VI-Helix (PDB 6OBI<sup>[117]</sup>, Abbildung 32A). Die codierende DNA-Sequenzen wurden zwischen dem C-Terminus der LOV-Domäne und der C-terminalen Domäne der T7-RNAP eingefügt.

Dazu wurde eine Reaktionssequenz aus QC-PCR, Restriktionsverdau und RFC-PCR verwendet (Abschnitt 5.2.2 Molekularbiologische Methoden). Der Erfolg der Klonierung wurde durch die Sequenzierung des Gens bestätigt.

Die modifizierten Varianten wurden anschließend im 1-L-Maßstab in *E. coli* exprimiert und gereinigt (s. Abschnitt 3.4 und Abbildung 99 sowie Abbildung 100), wobei der 6x-His-Tag hier ebenfalls am Protein verblieb, um die Vergleichbarkeit mit früheren Experimenten<sup>[65,86]</sup> (s. Abschnitt 3.5) zu gewährleisten. Dabei konnte jede der modifizierten Varianten als lösliches Protein erhalten werden (Reinheiten 96 % bis > 99 %, Tabelle 6). Im Anschluss wurden die gereinigten Enzyme in IVT (Vorgehensweise analog zu Abschnitt 3.5) eingesetzt und die synthetisierte RNA-Menge auf denaturierenden Agarosegelen analysiert (Abbildung 92). Hierbei konnte bei allen Varianten bereits nach einer Reaktionszeit von fünf Minuten die Bildung von RNA sowohl im Dunkel- als auch im Lichtzustand beobachtet werden (Abbildung 32B).

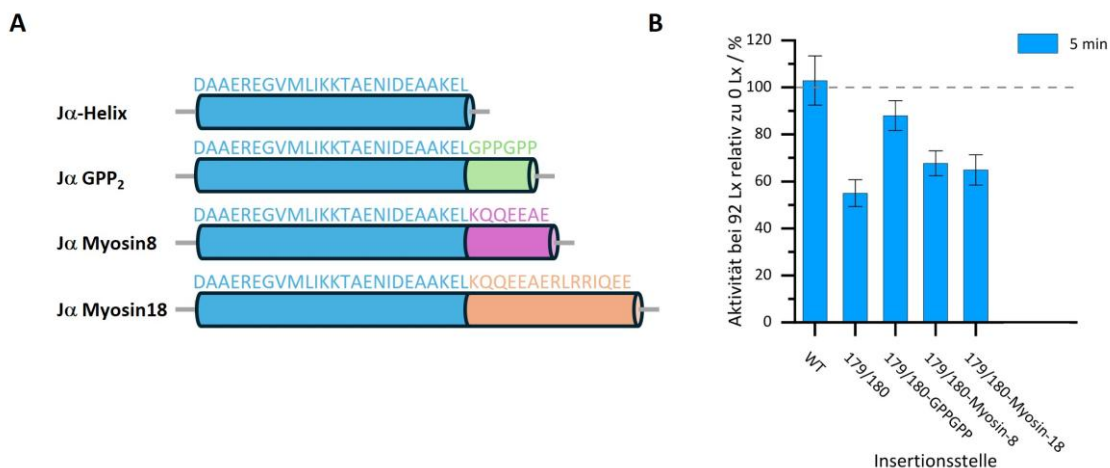


Abbildung 32: **A:** Schematische Darstellung der zur Verlängerung der  $J\alpha$ -Helix der LOV-Domäne verwendeten Sequenzen. **B:** Ergebnisse der Endpunktbestimmungen der verlängerten Varianten des Fusionsproteins 179/180 bei Bestrahlung mit blauem Licht ( $\lambda = 470$  nm, 92 Lx) im Vergleich zum Dunkelzustand (0 Lx). Der Dunkelzustand wurde zur Auswertung auf 100 % gesetzt und ist durch die gestrichelte Linie verdeutlicht.

Tabelle 6: Ausbeuten und Reinheiten der modifizierten Proteinvarianten nach erfolgter Aufreinigung.

| Variante                                    | Reinheit | Ausbeute / mg L <sup>-1</sup> Kultur |
|---|----------|--------------------------------------|
| 179/180-(GPP) <sub>2</sub> <sup>[116]</sup> | 96 %     | 24.8                                 |
| 179/180-Myo8                                | > 99 %   | 6.0                                  |
| 179/180-Myo18                               | > 99 %   | 0.2                                  |

Zwar konnte bei allen untersuchten Modifikationen (Abbildung 32) der Variante 179/180 eine lichtabhängige Inhibierung beobachtet werden, jedoch zeigte keines der modifizierten Proteine eine höhere Schaltbarkeit als die Ausgangsvariante 179/180 (Abbildung 32B). Während bei der (GPP)<sub>2</sub>-verlängerten Variante die lichtinduzierte Inhibition nahezu vollständig verloren ging (12 %), blieb bei den Varianten mit Myosin-Modifikation eine Inhibierung um maximal 35 % erhalten. Die Verlängerung der  $\alpha$ -Helix führte nicht zu einer Erhöhung der Hebelwirkung der LOV-Domäne auf die Effektordomäne. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Verlängerung der Helix den räumlichen Abstand zwischen der LOV-Domäne und der Effektordomäne vergrößert, wodurch die LOV-Domäne aus dem Protein herausgedrängt wird, was die Hebelwirkung entgegen der Erwartung abschwächt.

Da keine modifizierte Variante der T7-RNAP eine verbesserte Schaltbarkeit im Vergleich zu den aus den *split positions* hervorgegangenen Varianten (67/68, 179/180, 600/601) zeigte, konzentrierten sich weitere Untersuchungen ausschließlich auf diese Varianten. Diese sollten im nächsten Schritt *in cellulo* untersucht werden, um zu klären, ob auch dort die *in vitro* beobachtete lichtinduzierte Inhibierung der T7-RNAP-Varianten erfolgt.

### 3.7 Zelluläre Analyse der Lichtschaltbarkeit

Um die Transkriptionsaktivität der T7-RNAP bzw. ihrer Varianten in *E.-coli*-Zellen sichtbar machen zu können, wurde ein geeignetes Reportersystem gesucht. Prinzipiell kommt hierfür die Expression von Luciferasen<sup>[118]</sup> und fluoreszierenden Proteinen wie z.B. GFP<sup>[119]</sup> in Frage. Die Entscheidung fiel hierbei für das rotfluoreszierende Protein (RFP) mApple, da dessen Anregungs- und Emissionsmaxima ( $\lambda_{\text{Ex}} = 568 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{Em}} = 592 \text{ nm}$ ) außerhalb des Absorptionsbereiches der AsLOV2-Domäne ( $\lambda_{\text{Abs}} = 420\text{-}470 \text{ nm}$ ) liegen<sup>[120]</sup> und somit eine differenzierte Betrachtung des Dunkel- und Lichtzustandes mittels Fluoreszenzmikroskopie ermöglichen. Dafür sollte die T7-Promoter-abhängige Expression des rotfluoreszierenden Proteins von der IPTG-induzierten Expression der photoaktiven Variante 179/180 abhängig gemacht werden. Als Organismus wurde *E. coli* BL21 gewählt. Das vom mOrange (PDB 2H5O<sup>[121]</sup>) abstammende RFP mApple<sup>[122]</sup> unterscheidet sich von diesem (Abbildung 33) durch 18 Mutationen (siehe Datenbank FPbase<sup>[123]</sup> und Anhang, Abbildung 128).<sup>[122]</sup>

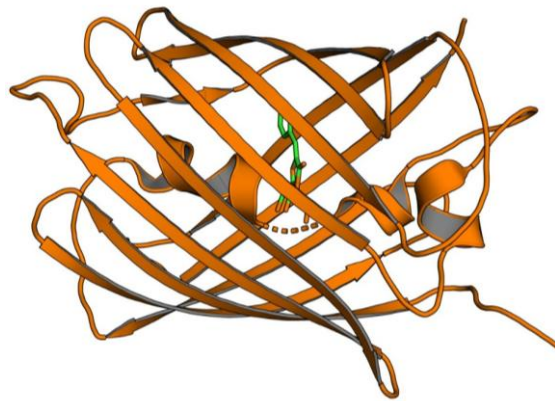


Abbildung 33: Kristallstruktur des mit mApple strukturell verwandten Fluoreszenzproteins mOrange (PDB 2H5O<sup>[122]</sup>).

Die Struktur fluoreszierender Proteine besteht in der Regel aus elf  $\beta$ -Faltblättern, welche ein  $\beta$ -Fass bilden. Das  $\beta$ -Fass enthält eine  $\alpha$ -Helix, in welcher sich das aus Aminosäuren (hier Thr, Tyr, Gly) bestehende Chromophor befindet. Die Proteine unterscheiden sich durch verschiedene Primärstrukturen in ihren Absorptions- und Emissionsmaxima.

Durch die an die Aktivität der T7-RNAP-Variante gekoppelte Expression von mApple sollte die Fluoreszenz der Zellen sowohl im Dunkel- als auch im Lichtzustand bestimmt werden (Abbildung 34). Die detaillierte Durchführung ist in 5.2.3.20 beschrieben. Dabei sollte die lichtabhängige Inhibition der Variante 179/180 aus den Endpunktbestimmungen (Abbildung 31) und der Michaelis-Menten-Kinetik (Abbildung 24) in *E. coli* reproduziert werden.

Für das Reporterplasmid wurde ausgehend vom Plasmid pAlterGC<sup>[95]</sup> ein Austausch der GFP-codierenden Sequenz durch die Gensequenz von mApple (aus pcDNA3-Apple, bereitgestellt von Priv.-Doz. Dr. Leif Dehmelt, Fakultät für Chemie und Chemische Biologie, TU Dortmund) vorgenommen (Abbildung 89). Mit dem resultierenden Plasmid pAlter\_mApple (Abbildung 87) wurde *E. coli* BL21 transformiert und zur Herstellung elektrokompetenter Zellen BL21[pAlter\_mApple] verwendet, wie unter 5.2.1.2 beschrieben. Diese Zellen wurden mit einem weiteren, kompatiblen Plasmid, pQET7-LOV-179/180 (Abbildung 62), transformiert, durch das die Expression von T7-RNAP (induzierbar durch IPTG) mit der von mApple (unter Kontrolle des T7-Promoters) gekoppelt wurde.

Um dies zu überprüfen, wurden erste Expressionsversuche unter dem Fluoreszenzmikroskop durchgeführt, die jedoch zeigten, dass es bereits ohne Zugabe von IPTG zu einer Expression von mApple kommt (*leaky expression*). Der Grund dafür war das Fehlen des *lac*-Repressors, weshalb das Zwei-Plasmidsystem (Abbildung 34) durch Einbringen der für den *lac*-Repressor codierenden Sequenz (*lacI*) erweitert werden sollte. Dafür wurde die Expressionskassette von mApple in das Plasmid pRep4 (Abbildung 86), das die *lacI*-Sequenz enthält, eingefügt. Da erste Kultivierungsversuche von Zellen BL21[pRep4-mApple\_RBS]/pQET7-LOV-179/180 trotz der Anwesenheit des *lac*-Repressors sowohl in flüssigen als auch auf festen Medien eine vorzeitige Expression von mApple zeigten, wurde den Kulturmedien ab diesem Zeitpunkt 1 % (w/v) Glucose (als Katabolit-Repressor) zugesetzt.<sup>[124]</sup>

Nachfolgende Experimente auf festem Nährmedium (Abbildung 113) zeigten dabei bereits deutlich die Unterdrückung der *leaky expression*. Die zugesetzte Glucose unterbindet die Bildung von cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP), einem sekundären Signalstoff, der unter anderem an der Transkription beteiligt ist.<sup>[125]</sup> Nach der Optimierung der Kultivierungsbedingungen wurden weitere Expressionsversuche von mApple am Fluoreszenzmikroskop verfolgt, wobei sowohl der Licht- als auch der Dunkelzustand der Variante 179/180 gleichzeitig durch die partielle Bestrahlung mit einem blauen Laser analysiert werden sollte. Dabei konnten aufgrund des Absterbens der Zellen im Laser bestrahlten Bereich infolge eines zu hohem Energieeintrags keine auswertbaren Daten erzeugt werden. Daher wurde die Strategie dahingehend modifiziert, dass die Expression von mApple in Licht- und Dunkelzustand der T7-RNAP-Variante separat, jedoch aus der identischen Kultur stammend, am Fluoreszenzmikroskop verfolgt wurde. Anstelle der Verwendung eines Lasers wurde dabei blaues Licht zur Anregung der photoaktiven Variante genutzt.

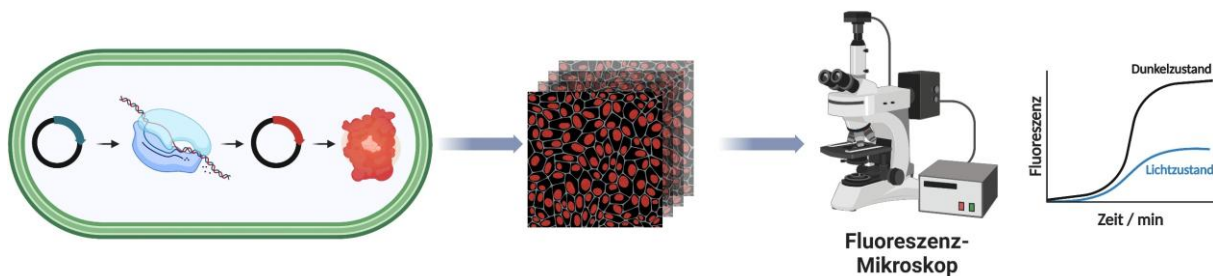


Abbildung 34: Schematische Darstellung der geplanten Zellexperimente: In *E. coli* verwendetes Zwei-Plasmid-System zur IPTG-induzierten Expression der T7-RNAP-Variante und T7-Promoter-abhängigen Transkription des fluoreszierenden Proteins mApple und anschließende zeitabhängige Auswertung am Fluoreszenzmikroskop.

Dazu wurden die Zellen auf einem Poly-L-Lysin-behandelten Objektträger immobilisiert und drei Stunden im Dunklen oder unter blauem Licht inkubiert, während mithilfe eines Mikroskops die Fluoreszenz bei  $629 \pm 53$  nm verfolgt wurde (s. Abschnitt 5.2.3.20 und Abbildung 35 und Abbildung 36). Dabei war sowohl für die im Dunkeln gehaltenen wie auch für die mit Blaulicht bestrahlten Zellen eine kontinuierliche Zunahme der Fluoreszenz von mApple über die Zeit zu beobachten. Die aufgenommenen Bild-/Video-Daten wurden anschließend mit ImageJ<sup>[112]</sup> und dem Plugin TrackMate<sup>[126-127]</sup> analysiert.

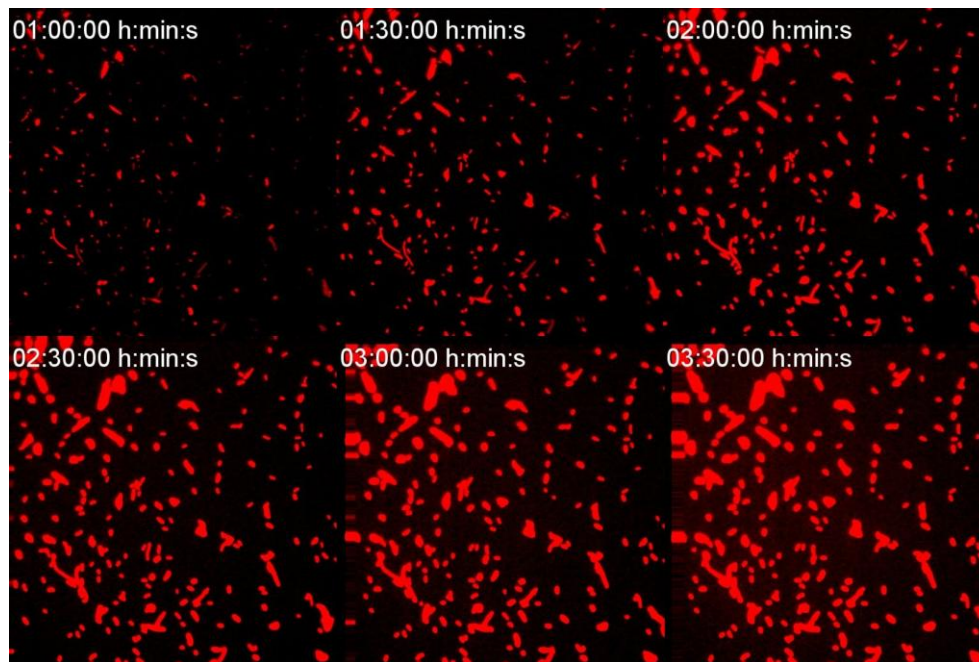


Abbildung 35: Zeitliche Abfolge (30 min/Intervall) von Aufnahmen der Fluoreszenz des Proteins mApple in *E. coli* BL21[pRep4\_mApple\_RBS] in der Abwesenheit von blauem Licht.

TrackMate ermöglicht die Analyse der Fluoreszenz in Abhängigkeit von Zeit und Ort, und somit die Bestimmung der Fluoreszenzintensität einzelner Zellen, hier im Licht- als auch im Dunkelzustand der LOV-Domäne (Abbildung 37A). Die erhöhte Standardabweichung bei den *in-cellulo*-Untersuchungen ist auf die unterschiedlich starke Fluoreszenz einzelner Zellen während der Messung zurückzuführen, was insbesondere bei der Betrachtung der Fehlerbalken der Mittelwertkurven deutlich wird (Abbildung 37A).

Die Reduktion des Fehlers wäre durch eine Erhöhung der Anzahl der Einzelmessungen möglich. Die Auftragung der Fluoreszenz über die Zeit zeigt deutlich, dass die in Dreifachbestimmung bestimmte und gemittelte Fluoreszenz des Dunkelzustandes im Vergleich zum Lichtzustand höher war, die untersuchte LOV-Variante der T7-RNAP (179/180) in *E. coli* also eine Inhibitionsreaktion auf blaues Licht zeigt. Für jeden Zeitpunkt  $t$  wurde das Verhältnis der Fluoreszenz im Lichtzustand zur Fluoreszenz im Dunkelzustand ermittelt und mit den Ergebnissen der *in-vitro*-Untersuchungen verglichen (Abbildung 37B). Hierbei zeigte sich, dass die lichtabhängige Schaltbarkeit der Variante 179/180 *in vitro* und *in cellulo* nahezu identisch ist.

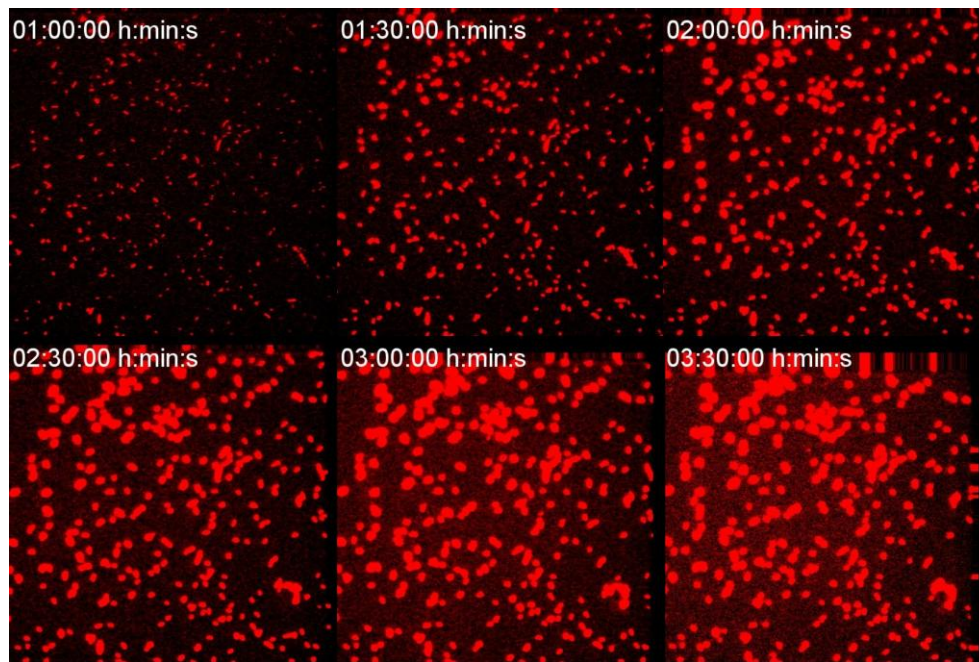


Abbildung 36: Zeitliche Abfolge (30 min/Intervall) von Aufnahmen der Fluoreszenz des Proteins mApple in *E. coli* BL21[pRep4\_mApple\_RBS] bei kontinuierlicher Bestrahlung mit blauem Licht ( $\lambda = 438$  nm, 535 mW, 10 % Intensität).

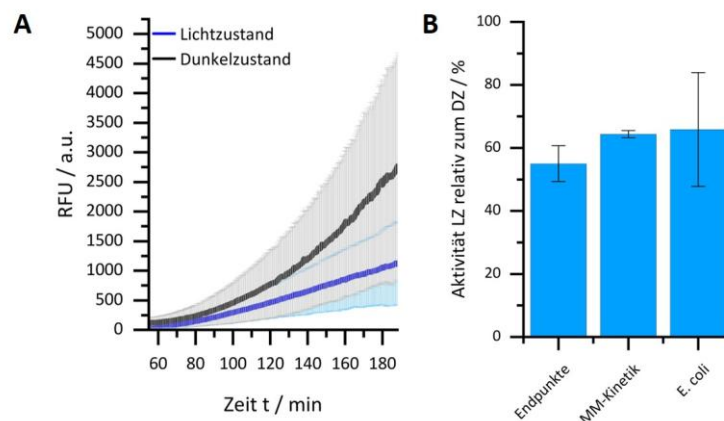


Abbildung 37: **A:** Statistische Auswertung der Fluoreszenzmikroskopie mit ImageJ<sup>[112]</sup> und TrackMate.<sup>[126-127]</sup> Aufgetragen ist die mittlere Fluoreszenz der *E. coli*-BL21-Zellen mit den Plasmiden pRep4\_mApple\_RBS und pQET7-LOV-179/180 in Abwesenheit von (schwarz) und bei Bestrahlung (blau) mit blauem Licht über die Zeit. **B:** Vergleich der Aktivitäten der Variante 179/180 bei Bestrahlung mit blauem Licht ( $\lambda = 470$  nm, 92 Lx) im Vergleich zum Dunkelzustand (0 Lx). Der Dunkelzustand wurde zur Auswertung auf 100 % gesetzt. Aufgeführt sind sowohl die Ergebnisse aus den IVT-Endpunktbestimmungen als auch das Verhältnis von  $V_{max,app}$  und die Ergebnisse der Zelleexperimente.

Die Summe der analytischen Daten (Kinetische Daten, insbesondere die Lineweaver-Burk-Auftragungen und mikroskopische Daten) zeigten zwar deutlich, dass die bisher erhaltenen LOV-Varianten der T7-RNAP durch Bestrahlung mit blauem Licht inhibiert wurden und welchem Typus der inhibitorische Mechanismus zugeordnet werden konnte, gaben jedoch noch keine Einsicht in die Natur der strukturellen Veränderungen, die zu diesem Phänotyp führten und somit auch keinen Hinweis auf Möglichkeiten, das Ausmaß der Inhibition zu verändern. Um diese strukturellen Veränderungen „sichtbar zu machen“ und zu analysieren, ist es erforderlich, Proteine zu kristallisieren und mithilfe der Röntgenstrukturanalyse zu untersuchen.

Da dieser Prozess insbesondere für flexible Proteine (wie Polymerasen) mit einem hohen Grad an konformationellen Freiheitsgraden langwierig sein kann, wurden die potenziellen 3D-Strukturen von Wildtyp-T7-RNAP und LOV-Varianten zunächst mithilfe von AlphaFold<sup>[128-130]</sup> untersucht.

### 3.8 Strukturbiologische Analyse der AlphaFold-Modellierungen

Die Analyse der dreidimensionalen Struktur von Proteinen durch Proteinkristallisation, Protein-NMR und Elektronenmikroskopie ist von großem experimentellem Aufwand geprägt. Die Veröffentlichungen von AlphaFold<sup>[131]</sup> im Jahr 2021 und insbesondere von AlphaFold2<sup>[128-129]</sup> im Jahr 2022 revolutionierten die strukturbiologische Analyse von Proteinen und ermöglichten die Modellierung von Proteinen mithilfe von künstlicher Intelligenz. Dieser Meilenstein, der die wissenschaftliche Gemeinschaft nachhaltig veränderte, wurde 2024 mit dem Nobelpreis für Chemie ausgezeichnet.<sup>[132]</sup>

Zur strukturbiologischen Analyse der photoaktiven Varianten der T7-RNAP wurden die dreidimensionalen Strukturen der photoaktiven Polymerasevarianten mit AlphaFold2<sup>[128-129]</sup> (AF2) unter den in 5.1.11 angegebenen Standardbedingungen modelliert. Diese Modellierungen ermöglichten erste Einblicke in die räumliche Anordnung der Polymerasevarianten mit insertierter LOV-Domäne. Allerdings hatte die Verwendung von AF2 auch einen entscheidenden Nachteil: Eine Modellierung im Komplex mit DNA und/oder RNA, wie in den publizierten Initiations- oder Elongationskomplexen, war mit AF2 nicht realisierbar. Mit der Veröffentlichung von AlphaFold3<sup>[130]</sup> (AF3) änderte sich diese Situation, denn hiermit war es möglich, für die Modellierung Nukleinsäuresequenzen als Liganden anzugeben. Dies war ein entscheidender Fortschritt, wie aus einem *Alignment* der mit AF2 und AF3 modellierten Strukturen deutlich wurde (Abbildung 38).

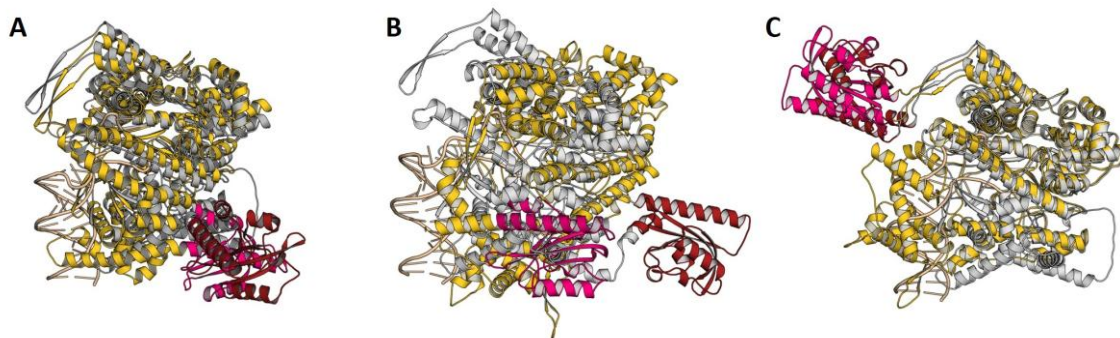


Abbildung 38: Überlagerung der mit AlphaFold2 und AlphaFold3 modellierten Strukturen der photoaktiven Varianten der T7-RNA-Polymerase. Die AF3-Modelle wurden zusätzlich zur Proteinsequenz mit der Sequenz des T7-Promoters (Abbildung 8) modelliert. Gold: AF2-Modellierungen<sup>[128-129]</sup>, pink: Orientierung der LOV-Domäne innerhalb des AF2-Modells, silber: AF3-modellierte Strukturen<sup>[130]</sup> der Fusionsproteine, rot: Räumliche Anordnung der AsLOV2 innerhalb des AF3-Modells. **A:** Variante 67/68, **B:** Fusionsprotein 179/180, **C:** Strukturen der Variante 600/601.

Bei der Überlagerung beider Modelle konnten insbesondere bei den Varianten 67/68 und 179/180 (Abbildung 38A und B) Unterschiede in den Modellierungen festgestellt werden, während bei der Variante 600/601 (Abbildung 38C) nur marginale Differenzen zwischen den Strukturen beobachtbar waren.

Die größten Unterschiede zwischen den beiden Modellen zeigten sich bei der Variante 179/180 (Abbildung 38B), bei der sowohl hinsichtlich der Position und Orientierung der insertierten AsLOV2-Domäne als auch hinsichtlich der Polymerasedomäne signifikante Unterschiede gefunden wurden. Daher wurden für die weiteren strukturellen Analysen nur die AF3-Modelle herangezogen und für die bisher beschriebenen Varianten jeweils sowohl der Initiations- (Anhang, Abbildung 109) als auch der Elongationskomplex modelliert (Abbildung 39). Die verwendeten Nukleinsäuresequenzen wurden den publizierten Kristallstrukturen entnommen (IC: 2PI4<sup>[49]</sup>; EC: 1H38<sup>[56-57]</sup>). Die Modellierungen der Elongationskomplexe ermöglichten die Erklärung der in der apparenten Michaelis-Menten-Kinetik beobachteten Effekte. In jeder der drei photoaktiven Varianten übt die insertierte LOV-Domäne einen Einfluss auf einen oder mehrere der für die Funktion der Polymerase essenziellen Tunnel aus (Substrattunnel: rNTPs, *Template*-DNA, Produkttunnel: mRNA), deren Beeinträchtigung über eine Behinderung der Substratzufuhr oder Produktabfuhr zu einer Reduktion der Polymeraseaktivität führen könnte. AlphaFold3<sup>[130]</sup> generiert fünf verschiedene Modelle des jeweiligen Proteins und ordnet diese basierend auf einem Ranking-Score von 0 (bestes Modell) bis 4 (niedrigster Score). Im Rahmen der Analyse des Einflusses der AsLOV2-Domäne auf die Polymerase wurde für jede Variante das Modell mit dem besten Score (Modell 0) verwendet. Das Modell für die Variante 67/68 zeigt, dass hier offenbar der Ausgangstunnel für die gebildete mRNA durch die LOV-Domäne blockiert wird (Abbildung 39A). Diese Beobachtung korreliert zum einen mit der beobachteten Reduktion der maximalen Geschwindigkeit  $V_{max,app}$  dieses Enzyms und zum anderen mit der Verringerung der Affinität zwischen Substrat und Enzym, sichtbar an einer Erhöhung der Michaelis-Menten-Konstante ( $K_{M,app}$ ) (Abbildung 24A und B), sodass für die Reaktion eine höhere Substratkonzentration benötigt wird. Das Modell der Variante 179/180 (Abbildung 39B) zeigt keine direkte Blockierung der vorhandenen Tunnel. Allerdings ist bei dieser Variante die lichtschtbare Domäne „auf der Polymerase“ positioniert und staucht das gesamte Enzym sowie die vorhandenen Tunnel, was zu der beobachtbaren, vermeintlichen unkompetitiven Inhibition führen könnte.

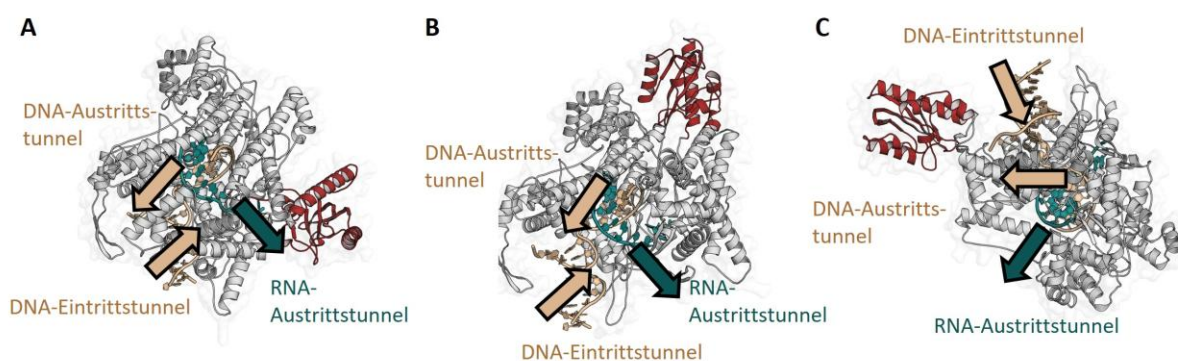


Abbildung 39: AF3 Modellierungen der Elongationskomplexe der Fusionsprotein, ockerfarben: DNA-Eintritts und Austrittstunnel sowie DNA-Doppelhelix, blaugrün: Entstehende RNA und RNA-Austrittstunnel, rot: Insertierte AsLOV2-Domäne. **A:** Modellierung der Variante 67/68, **B:** Insertionsposition 179/180, **C:** Fusionsprotein 600/601.

Hinsichtlich der dritten Variante 600/601 (Abbildung 39C) ließen sich aus den Modellierungen keine Hinweise auf eine Behinderung bzw. Inhibition der Polymerase ableiten. Dies korrelierte mit den kinetischen Daten (Abschnitt 3.2), die u.a. auf eine Begünstigung der Substratbindung

durch Verringerung von  $K_{M,app}$  hinwiesen. Interessant ist, dass sich die LOV-Domäne in der Variante 600/601 in der Nähe des DNA-Eintrittstunnels der Polymerase befindet und eine sterische Komplementarität zur großen Furche der DNA ausbildet (Abbildung 40). Hier könnten sich Wechselwirkungen ergeben, die einen Beitrag zur Stabilisierung der DNA-Bindung leisten und dadurch den Einbau eines rNTP im aktiven Zentrum erleichtern (Abbildung 24B).

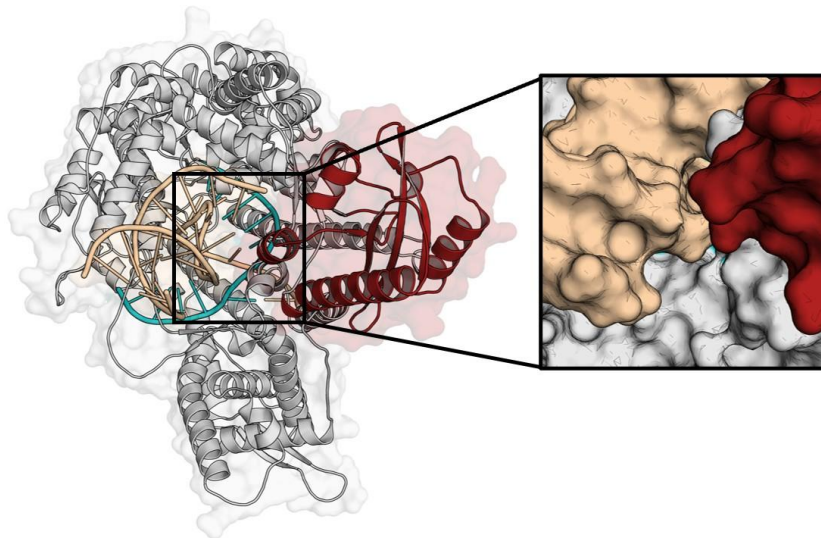


Abbildung 40: Modellierter Elongationskomplex der Variante 600/601 mit Nahaufnahme der Oberfläche zwischen der DNA-Doppelhelix (ockerfarben) und der LOV-Domäne (rot), die RNA ist in blaugrün dargestellt.

AlphaFold3 ist noch nicht in der Lage, zwischen dem Licht- und dem Dunkelzustand der hier untersuchten Fusionsproteine zu unterscheiden. Daher sah der weitere Plan vor, die Strukturen der erhaltenen T7-RNAP-Varianten sowie des Wildtyp-Enzyms durch die Proteinkristallisation und Röntgenstrukturanalyse aufzuklären.

### 3.9 Kristallisationsstudien

#### 3.9.1 Kristallisation der Wildtyp-T7-RNA-Polymerase

In der PDB sind zur Zeit 19 gelöste Kristallstrukturen der T7-RNAP allein oder im Komplex mit dem T7-Promoter, einem DNA/RNA-Hybrid oder dem T7-Lysozym abrufbar.<sup>[49-50,56,60-62,133-137]</sup>

Bei einem Vergleich der Kristallisationsbedingungen (Tabelle 7) fällt auf, dass sowohl für die gelösten Strukturen des Initiationskomplexes als auch für die Strukturen des Elongationskomplexes Polyethylenglykol 8000 (PEG 8000) als Präzipitant und Tris bzw. Tris-HCl als Puffersubstanz verwendet wurde. Darüber hinaus wurde ein Großteil der Kristallisationsexperimente bei 20 °C durchgeführt.

Tabelle 7: Übersicht über die Kristallisationsbedingungen der in der PDB vorhandenen gelösten Kristallstrukturen.

| PDB-Code  | Kristallisationsbedingungen   | T/°C | Komplex            |
|---|---|------|--------------------|
| 1ARO <sup>[134,138]</sup>                           | 2.5 mM Tris-HCl pH 7.8, 5 mM KHPO <sub>4</sub> /KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7.0, 12-15 % Sarkosin 60 mM NaCl, 25 mM MgCl <sub>2</sub> , 1 mM DTT, 1 mM Na <sub>3</sub> EDTA, 0.05 % β-Hexylglykosid, 0.02 % NaN <sub>3</sub> | 12   | T7-Lysozym         |
| 1CEZ <sup>[50]</sup>                                | 100 mM Tris-HCl pH 8.7, 20 % PEG 8000, 200 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 0.25 % Octyl-β-D-Glucopyranosid   | -    | Initiationskomplex |
| 1H38 <sup>[56-57]</sup>                             | 100 mM Tris pH 8.1, 10 % PEG 8000, 8 % Glycerol, 5 mM β-Mercaptoethanol   | 20   | Elongationskomplex |
| 1MSW <sup>[62]</sup>                                | 50 mM Tris-HCl pH 7.0, 6 % PEG 8000, 200 mM Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 10 mM Mg(OAc) <sub>2</sub> , 5 mM DTT   | 21   | Elongationskomplex |
| 1QLN <sup>[135]</sup>                               | 100 mM Tris-HCl pH 8.7, 20 % PEG 8000, 200 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 0.25 % Octyl-β-D-Glucopyranosid   | -    | Initiationskomplex |
| 1SOV <sup>[57,60]</sup>                             | 100 mM Tris pH 7.9, 7 % PEG 8000, 6 % 2-Methyl-2,4-pentandiol, <i>microseeding</i>  | 20   | Elongationskomplex |
| 1S76, 1S77 <sup>[61]</sup>                          | 50 mM Tris-HCl, pH 7.0, 8 % PEG 8000, 200 mM Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 10 mM Mg(OAc) <sub>2</sub> , 10 mM DTT   | 21   | Elongationskomplex |
| 2PI4, 2PI5 <sup>[49]</sup>                          | 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 20 % PEG 8000, 200 mM Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 5 % Glycerol, 15 mM Mg(OAc) <sub>2</sub>   | 20   | Initiationskomplex |
| 3E2E, 3E3J <sup>[137]</sup>                         | Tris pH 8.0-8.5, 16-18 % PEG 6000, 100-200 mM MgCl <sub>2</sub>   | 12   | Übergangskomplex   |
| 4RNP <sup>[91,133]</sup>                            | 30 % ges. (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> pH 8.2-8.3, 1 mM EDTA, 1 mM DTT   | 16   | -                  |
| 8DH0, 8DH1, 8DH2, 8DH3, 8DH4, 8DH5 <sup>[136]</sup> | 100 mM Tris pH 8.1, 10 % PEG 8000, 8 % Glycerol, 5 mM β-Mercaptoethanol   | 22   | Elongationskomplex |

Im Rahmen dieser Arbeit sollten die bereits bekannten Kristallisationsbedingungen des Initiationskomplexes und des Elongationskomplexes der WT-T7-RNAP repliziert werden. Dazu sollte die flexible Polymerase während des Kristallisationsprozesses durch die Cokristallisation mit den dafür nötigen DNA- bzw. RNA-Oligonukleotiden stabilisiert werden. Die in diesen Experimenten verwendeten DNA- und RNA-Sequenzen entsprechen den in der Literatur<sup>[49,57]</sup> beschriebenen Oligonukleotiden (Tabelle 22 und Abbildung 41). Zur Darstellung des Initiationskomplexes wurde die Sequenz des T7-Promoters und für die Kristallisation des Elongationskomplexes ein Hybrid aus DNA und RNA gewählt, da die Polymerase nach der Polymerisation von 8 bis 12 Basen in den Elongationskomplex übergeht.

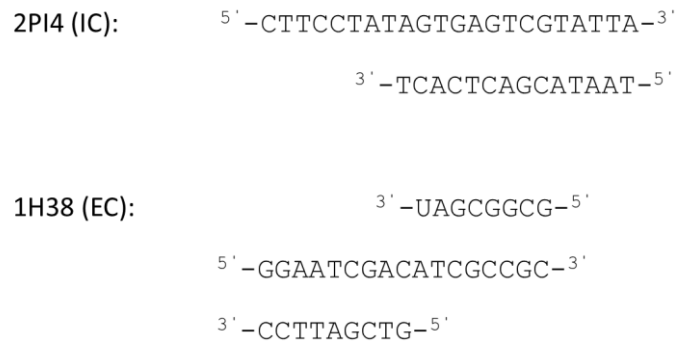


Abbildung 41: Aus den Kristallstrukturen entnommene Sequenzen der bei der Kristallisation verwendeten Oligonukleotide zur Imitierung des Initiations- (PDB 2PI4<sup>[49]</sup>) und des Elongationskomplexes (PDB 1H38<sup>[56-57]</sup>).

Die in der vorliegenden Arbeit beschriebene Reinigung der WT-T7-RNAP (Abbildung 15) wurde durchgeführt (Reinheit > 99 %, siehe Tabelle 2) und das Zielprotein nach der Gelfiltration im Kristallisationspuffer A<sup>[57]</sup> (10 mM Tris pH 8.1, 200 mM NaCl, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, Tabelle 20) aufkonzentriert. Im Anschluss erfolgte die Komplexierung der Polymerase mit den gemäß 5.2.3.11 vorbereiteten Oligonukleotiden (10 min, 0 °C) und beide Komplexe wurden ähnlich zu den in der PDB vorhandenen Bedingungen<sup>[49,56-57,61,136]</sup> in Kristallisationsexperimenten angesetzt (100 mM Tris pH 8.5, 5 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol, 15 % Glycerol, 6-14 % PEG 8000, 20 °C, Abbildung 42A). Nach einer Inkubationszeit von zehn Wochen konnten dünne, plättchenartige Kristalle des Initiationskomplexes der Wildtyp-T7-RNA-Polymerase beobachtet werden (ca. 500-750  $\mu\text{m}$ , Abbildung 42B). Die im Haus durchgeführten Röntgenbeugungsexperimente (Bruker D8 Venture,  $\lambda = 1.54 \text{ \AA}$ ) resultierten in einem ersten vollständigen Datensatz über 360° (0.5°/Bild) mit einer Auflösung von 3.5  $\text{\AA}$  (Abbildung 42C). Dieser wurde mit XDS<sup>[139]</sup> prozessiert und der molekulare Ersatz mit der publizierten Struktur (PDB 1QLN<sup>[135]</sup>) mit Phenix Phaser<sup>[140]</sup> durchgeführt (s. Anhang, Abbildung 114). Die Analyse des erhaltenen Modells ergab, dass eine weitere Optimierung der Kristallqualität erforderlich war, da mehrere Schleifen und viele Seitenketten der Aminosäuren in der Elektronendichtekarte nicht hinreichend aufgelöst wurden. Darüber hinaus konnten in der Struktur der T7-RNAP nicht alle Sekundärstrukturelemente bestimmt werden (Abbildung 114).

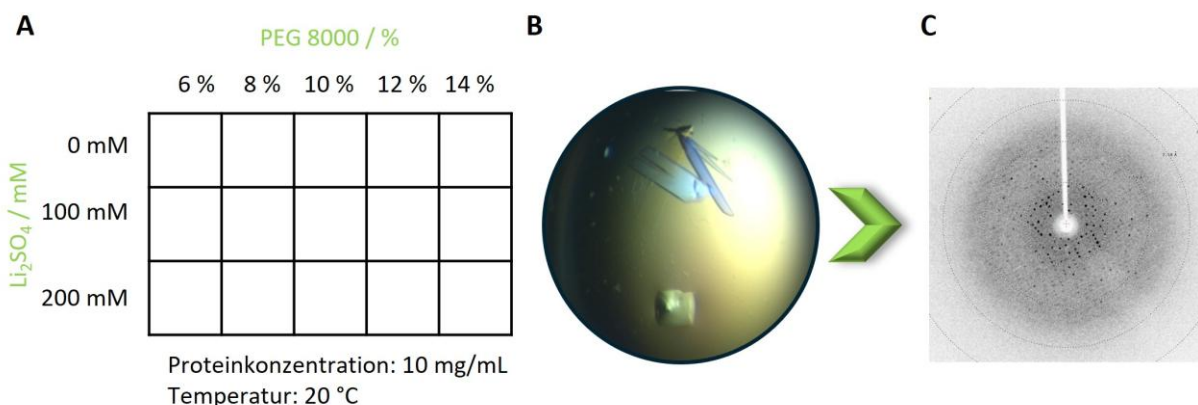


Abbildung 42: Kristalle und Kristallisationsbedingungen des Initiationskomplexes der WT-T7-RNAP. **A:** Kristallisationsbedingungen des Finescreens, 100 mM Tris pH 8.5, 5 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol, 15 % Glycerol, 0-200 mM Li<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 6-14 % PEG 8000, 20 °C. **B:** Plättchenförmige Kristalle des T7-RNAP Initiationskomplexes, erhalten nach ca. zwei Monaten, Diffraction ca. 3.5  $\text{\AA}$ .

Zur Imitation des Elongationskomplexes wurde ein Hybrid aus DNA und RNA zur Komplexierung verwendet und der Komplex unter zum Initiationskomplex identischen Bedingungen in Kristallisationsexperimenten eingesetzt (Abbildung 41 und Abbildung 42A). Nach einer Inkubationszeit von zwölf Tagen konnten dünne, nadelförmige Plättchen aus dem Tropfen isoliert (ca. 150-200  $\mu\text{m}$ , Abbildung 43), eingefroren und an der europäischen Synchrotronstrahlungsanlage (*European Synchrotron Radiation Facility*, ESRF, Grenoble, Frankreich) Röntgenbeugungsexperimenten unterzogen werden. Ein Datensatz über 180° (0.1°/Bild,  $\lambda = 1.00 \text{ \AA}$ ) mit einer Auflösung von 4.5  $\text{\AA}$  wurde aufgenommen. Nach erfolgreicher Prozessierung und molekularem Ersatz mit einem Monomer der publizierten Kristallstruktur 1H38<sup>[56-57]</sup> konnte ein vorläufiges Modell des Elongationskomplexes erhalten werden (s. Anhang, Abbildung 115). Dieses Modell konnte allerdings wegen einer unvollständigen Elektronendichte nicht weiter verfeinert werden.

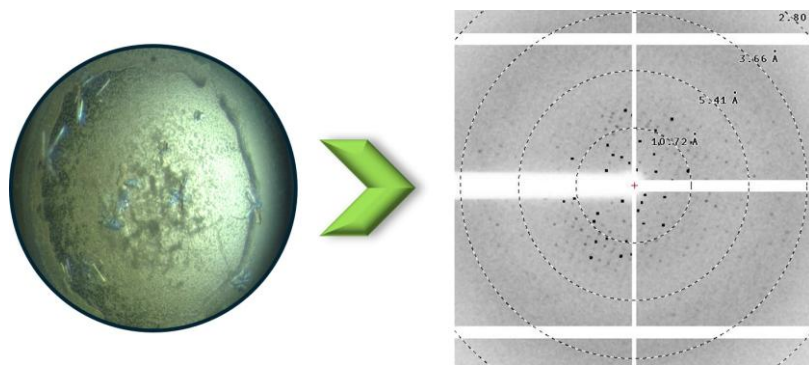


Abbildung 43: Nach zwölf tägiger Inkubation (20 °C) erhaltenen plättchenartige, leicht verwachsene Kristalle und Diffraktionsmuster des Elongationskomplexes der WT-T7-RNAP, Diffraction ca. 4.5  $\text{\AA}$ .

Aufgrund der moderaten Auflösung der beiden erhaltenen Datensätze des Wildtyp-Enzyms (Initiationskomplex 3.5  $\text{\AA}$  und Elongationskomplex 4.5  $\text{\AA}$ ) sollte die Stabilität der Polymerase während der Kristallisation erhöht werden. Dazu wurde eine Schmelzpunktanalyse (*thermal shift assay*, TSA) durchgeführt, bei der die Denaturierungstemperaturen des Proteins in diversen Puffersystemen untersucht werden.

Die Höhe des Schmelzpunkts im jeweiligen Puffer reflektiert dabei die Stabilität des Enzyms,<sup>[141]</sup> welche bei der Kristallisation von Proteinen eine entscheidende Rolle spielt. Für die Durchführung des TSAs wurde das kommerziell erhältliche Kit *Solubility & Stability Screen 2* von *Hampton Research* gemäß der Herstellerangaben verwendet. Zusätzlich wurde das Protein zur besseren Interpretation der Ergebnisse im Kristallisationspuffer A (10 mM Tris pH 8.1, 200 mM NaCl, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT) analysiert, in welchem eine Schmelztemperatur der WT-T7-RNAP von 43 °C beobachtet wurde. Aus den Ergebnissen (Tabelle 8) geht eindeutig hervor, dass die T7-RNA-Polymerase mit zunehmender Konzentration an Natriumchlorid bei einem neutralen bis leicht basischen pH-Wert einen höheren Schmelzpunkt und damit eine höhere Stabilität aufweist. Dabei lag die maximale Differenz der Schmelztemperatur  $T_m$  im Vergleich zum Kristallisationspuffer A bei ca. 8 °C. Allerdings wurde auch festgestellt, dass eine Salzkonzentration von 1 M bei der Kristallisation zu Problemen, wie der Bildung von Salzkristallen, führen kann.

Infolgedessen wurde für den neuen, optimierten Kristallisationspuffer B eine Salzkonzentration von 0.5 M NaCl gewählt und die Konzentration der Puffersubstanz Tris von 10 mM auf 50 mM erhöht, da diese Konzentration für Puffersubstanzen im kommerziellen *Screening* vorlag. Die weitere Kristallisation der Wildtyp-T7-RNAP erfolgte mit dem Kristallisationspuffer B (50 mM Tris pH 8.1, 500 mM NaCl, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM DTT).

*Tabelle 8: Resultate der Schmelzpunktanalyse der Wildtyp-T7-RNA-Polymerase. Dargestellt ist die jeweilige Schmelztemperatur  $T_m$ /°C in Abhängigkeit vom jeweiligen pH-Wert und der entsprechenden NaCl-Konzentration. Farbcodierung von rot (niedrig) nach blau (hoch).*

|        | 0 mM NaCl | 50 mM NaCl | 100 mM NaCl | 150 mM NaCl | 200 mM NaCl | 250 mM NaCl | 500 mM NaCl | 1 M NaCl |
|--------|-----------|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|----------|
| Wasser | 48.5      | 49         | 50          | 50.5        | 50          | 50          | 50          | 49.5     |
| pH 4.5 | 48.5      | 48.5       | 47.5        | 36          | 50          | 50          | 50.5        | 48.5     |
| pH 5.0 | 48        | 48.5       | 48.5        | 48.5        | 49.5        | 49          | 51          | 50.5     |
| pH 5.5 | 50        | 50         | 50.5        | 49.5        | 50.5        | 51.5        | 52          | 49.5     |
| pH 6.0 | 47.5      | 48.5       | 48.5        | 48.5        | 49.5        | 49.5        | 50          | 49.5     |
| pH 6.5 | 48.5      | 48.5       | 49          | 48.5        | 49.5        | 49.5        | 51          | 51.5     |
| pH 7.0 | 48        | 48.5       | 48.5        | 49          | 49.5        | 49.5        | 50.5        | 50.5     |
| pH 7.5 | 49        | 49.5       | 49.5        | 50          | 50          | 50.5        | 51.5        | 50.5     |
| pH 8.0 | 49        | 49.5       | 49          | 50          | 49.5        | 50          | 50.5        | 50.5     |
| pH 8.5 | 48.5      | 49         | 49.5        | 49          | 49.5        | 49.5        | 50.5        | 50       |
| pH 9.0 | 47.5      | 49         | 48          | 48.5        | 49          | 49          | 49.5        | 50       |
| pH 9.5 | 48        | 48         | 48          | 48.5        | 48.5        | 49          | 50          | 49.5     |

Im Anschluss an die Schmelzpunktanalyse wurden die Kristallisationsexperimente des Initiationskomplexes der WT-T7-RNAP mit dem optimierten Kristallisationspuffer B unter gleichen Bedingungen wiederholt (100 mM Tris pH 8.1-8.7, 5 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol, 15 % Glycerol, 8-16 % PEG 8000, 20 °C, Abbildung 44A). Dabei konnte nach einer Inkubationszeit von drei Tagen bei 20 °C die Bildung von plättchenförmigen, dünnen und leicht verwachsenen Kristallen beobachtet werden (ca. 200-300  $\mu$ m, Abbildung 44B).

Die Kristalle des Initiationskomplexes wurden isoliert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend in Röntgenbeugungsexperimenten an der Synchrotron Lichtquelle Schweiz (SLS, Paul-Scherrer-Institut, Villigen, Schweiz) vermessen. Dabei konnte ein vollständiger Datensatz über 360° (0.1°/Bild,  $\lambda = 1.00$  Å) mit einer Auflösung von 2.8 Å gewonnen werden (Abbildung 44C). Die Prozessierung der Daten erfolgte mit XDS<sup>[139]</sup> und der molekulare Ersatz wurde mit Phenix Phaser auf Basis von 1QLN<sup>[135]</sup> durchgeführt.

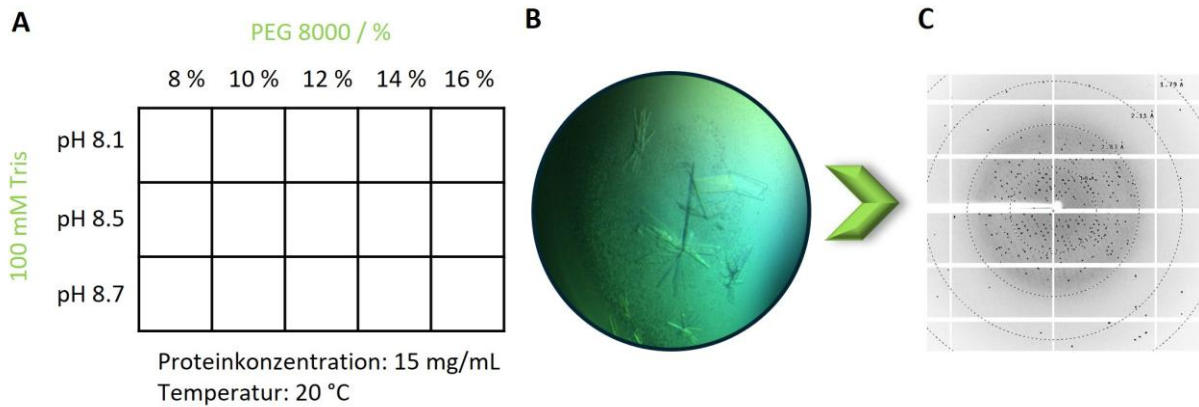


Abbildung 44: Kristalle und Kristallisationsbedingungen des Initiationskomplexes der WT-T7-RNAP nach Pufferoptimierung. **A:** Kristallisationsbedingungen des Finescreens: 100 mM Tris pH 8.1-8.7, 5 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol, 15 % Glycerol, 8-16 % PEG 8000, 20 °C. **B:** Plättchenförmige Kristalle des T7 RNAP Initiationskomplexes, erhalten nach ca. drei Tagen, Diffraction 2.8 Å.

Durch den Wechsel des Puffers konnte die Kristallisationsdauer von zehn Wochen auf drei Tage reduziert und die Auflösung der Kristallstruktur des Initiationskomplexes um 0.7 Å verbessert werden. Zusätzlich wurden die oberflächennahen Schleifen besser aufgelöst und die essenziellen Magnesiumkationen im aktiven Zentrum der Polymerase eindeutig zugeordnet (Abbildung 46). Die Zellparameter der gelösten Struktur zeigen keine Abweichungen zu den bereits publizierten Strukturen des Initiationskomplexes,<sup>[49,135]</sup> sowohl die Raumgruppe als auch die Zellkonstanten konnten reproduziert werden (Tabelle 9, Tabelle 40). Die Kristalle des Initiationskomplexes wurden unter Bedingungen erhalten, die den bereits publizierten ähnelten<sup>[57]</sup> (100 mM Tris pH 8.5, 5 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol, 15 % Glycerol, 14 % PEG 8000, 20 °C); lediglich die Konzentrationen des Puffers, in dem das Protein vorlag, wurden nach der Schmelzpunktanalyse abgeändert.

Tabelle 9: Vergleich der Raumgruppen und Zellkonstanten.

|                           | <b>T7WT IC</b>                         | <b>1QLN<sup>[135]</sup></b>            | <b>2PI4<sup>[49]</sup></b>             | <b>1CEZ<sup>[50]</sup></b>             |
|---------------------------|--|--|--|--|
| Raumgruppe                | P 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 (18) | P 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 (18) | P 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 (18) | P 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 (18) |
| Zellkonstanten            |  |  |  |  |
| a, b, c (Å)               | 74.0, 80.9, 222.7                      | 73.6, 80.9, 221.2                      | 73.8, 80.3, 224.5                      | 73.3, 80.9, 220.1                      |
| A, $\beta$ , $\gamma$ (°) | 90.0, 90.0, 90.0                       | 90.0, 90.0, 90.0                       | 90.0, 90.0, 90.0                       | 90.0, 90.0, 90.0                       |
| Auflösung (Å)             | 2.8                                    | 2.4                                    | 2.5                                    | 2.4                                    |

Bei einem strukturellen Vergleich der gelösten Kristallstruktur mit einer publizierten Struktur des Initiationskomplexes (PDB 2PI4<sup>[49]</sup>, Abbildung 45) fällt auf, dass der Großteil der Sekundärstrukturen deckungsgleich und die komplexierte T7-Promoter-DNA an der identischen Position gebunden ist. Unterschiede ergaben sich bei oberflächennahen, flexiblen Schleifen, die in beiden Strukturen nicht vollständig aufgelöst sind und bei den Magnesiumkationen, die nicht in den gleichen Positionen gebunden sind. Im Gegensatz zu der in dieser Arbeit gelösten Kristallstruktur ist in der PDB-Struktur (2PI4<sup>[49]</sup>) eines der Kationen nicht in der räumlichen Nähe zu den komplexierenden Aminosäuren Asp537 und Asp812.

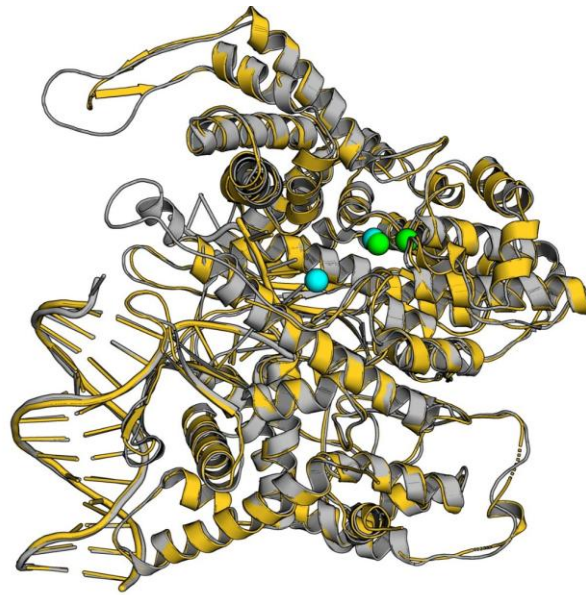


Abbildung 45: Alignment der in dieser Arbeit gelösten Kristallstruktur (gold) mit einer in der PDB veröffentlichten Struktur des Initiationskomplexes (PDB 2PI4<sup>[49]</sup>, silber). Die Mg<sup>2+</sup>-Kationen der gelösten Struktur sind in grün dargestellt, die Magnesium-Kationen der PDB-Struktur in cyan.

Die in dieser Arbeit gelöste Kristallstruktur der T7-RNAP stellt die erste Struktur des Initiationskomplexes dar, in welcher beide Mg<sup>2+</sup>-Kationen an den korrekten Positionen im aktiven Zentrum nachgewiesen wurden (Abbildung 46). Hier wurde zudem sichtbar, dass drei konservierte Aminosäuren (Asp471, Asp537, Asp812) an der Koordination der Magnesiumkationen beteiligt sind.

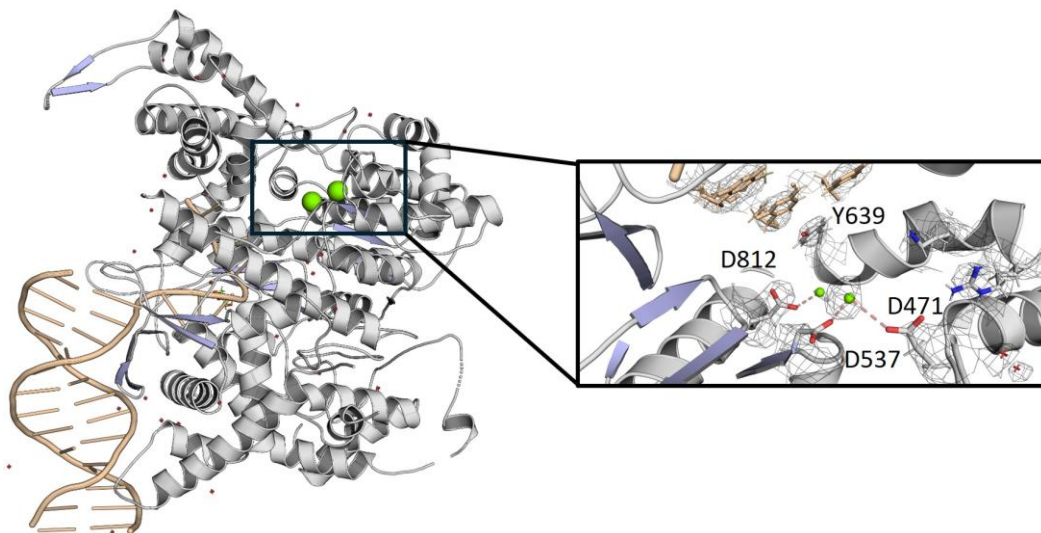


Abbildung 46: Gelöste Kristallstruktur des Initiationskomplexes der WT-T7-RNA-Polymerase. Ockerfarben: T7-Promoter, hellblau:  $\beta$ -Faltblätter, grün: Magnesiumkationen. Rechts: Nahaufnahme des aktiven Zentrums mit den Magnesiumkoordinierenden essenziellen Aminosäuren Asp471, Asp537 und Asp812 und der Elektronendichtekarte (schwarz) für ausgewählte Bereiche. Auflösung 2.8 Å.

### 3.9.2 Kristallisation photoaktiver Varianten der T7-RNA-Polymerase

Nachdem die experimentellen Bedingungen für die Reinigung, Kristallisation und Röntgenstrukturanalyse anhand des Wildtypenzym der T7-RNAP etabliert worden waren, sollten die Strukturen der photoaktiven Varianten analog aufgeklärt werden. Dabei lag der Fokus zunächst auf den Varianten 67/68 und 179/180, welche in den *in-vitro*-Transkriptionsreaktionen die größte Inhibierung bei Bestrahlung mit Licht zeigten (Abbildung 31). Die beiden Varianten wurden analog zum WT-Enzym gereinigt, konzentriert und im Kristallisationspuffer A (10 mM Tris pH 8.1, 200 mM NaCl, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT) mit den Oligonukleotiden (Initiations- und Elongationskomplexe, Abbildung 41) komplexiert. Da keine Kristallisationsbedingungen für die T7-RNA-Polymerase mit insertierter AsLOV2-Domäne bekannt waren, wurden kommerziell erhältliche *Screenings* der Firma Qiagen (jetzt NeXtal) verwendet, um für jede Variante geeignete Kristallisationsbedingungen zu finden. Für die Variante 67/68 wurden dabei 768 verschiedene Bedingungen mit bis zu sechs verschiedenen Proteinkonzentrationen getestet (Tabelle 10). Für die Variante 179/180 wurden insgesamt 384 Kristallisationsbedingungen bei bis zu drei verschiedenen Konzentrationen ausgewertet (Tabelle 10). In keinem der durchgeführten Kristallisationsversuche konnte eine geeignete Bedingung für den Initiations- und den Elongationskomplex der beiden Varianten identifiziert werden. Dies ist auf die hohe Flexibilität der Polymerase und der insertierten LOV-Domäne zurückzuführen, sodass die getesteten Bedingungen nicht in der Lage waren, die hochflexiblen Fusionsproteine so zu stabilisieren, dass eine Kristallisation der Proteine möglich gewesen wäre.

Tabelle 10: Durchgeführte, kommerziell erhältliche 96-Well-Screenings: ● Variante 67/68, ● Variante 179/180.

| $C_{\text{Prot}} / \text{mg mL}^{-1}$ | Core I | Core II | Core III | Core IV | PACT | PEGs I | Classics I | pH Suite |
|---------------------------------------|--------|---------|----------|---------|------|--------|------------|----------|
| 2.5                                   |        |         |          |         | ●    | ●      |            |          |
| 5                                     | ●      | ●       | ●        | ●       | ●    | ●      |            |          |
| 10                                    | ●      | ●       | ●        | ●       | ●    | ●      |            |          |
| 15                                    |        |         | ●        |         |      |        |            |          |
| 20                                    |        |         |          |         | ●    | ●      |            |          |
| 40                                    |        |         |          |         | ●    | ●      |            |          |

Um die Kristallisation der photoaktiven Varianten (67/68, 179/180 und 600/601) dennoch zu realisieren, wurden anschließend die am C-Terminus der AsLOV2-Domäne um neun AS gekürzten Varianten verwendet (vgl. Tabelle 1). Ziel der Verwendung dieser verkürzten Varianten war es, die Flexibilität der Fusionsproteine einzuschränken, um die Kristallisation der Proteine zu ermöglichen.

### 3.9.3 Kristallisation verkürzter Konstrukte der photoaktiven Varianten

Die verkürzten Konstrukte (67/68<sub>v</sub>, 179/180<sub>v</sub>, 600/601<sub>v</sub>) wurden wie oben beschrieben exprimiert und gereinigt (Abbildung 96-Abbildung 98). Anschließend wurden Kristallisationsexperimente mit kommerziell erhältlichen Kits (*NeXtal Biotech*, *Molecular Dimensions*) wie unter 5.2.3.12 beschrieben, mithilfe eines Pipettierroboters (*Mosquito*<sup>[142]</sup>) angesetzt. Dabei wurden zuerst nur die Initiationskomplexe betrachtet und erste Kristallisationsversuche der komplexierten photoaktiven Varianten bei einer Proteinkonzentration von 10 mg/mL bei 20 °C durchgeführt (Tabelle 11).

Tabelle 11: Angesetzte 96-Well-Screenings der verkürzten Varianten: ● 67/68<sub>v</sub>, ● 179/180<sub>v</sub>, ● 600/601<sub>v</sub>.

| $c_{\text{Prot}} / \text{mg mL}^{-1}$ | PACT |  |  | PEGs I |  |  | Classics I |  |  | Nucleix |  |  |
|---------------------------------------|------|--|--|--------|--|--|------------|--|--|---------|--|--|
| 10                                    |      |  |  |        |  |  |            |  |  |         |  |  |

In diesen Experimenten konnte für den Initiationskomplex der Variante 179/180<sub>v</sub> nach einer Inkubationszeit von zwei Tagen die Bildung von kleinen Kristallen beobachtet werden (*Classics I Suite D12*, 4 M Natriumformiat, Abbildung 47A). Für die Variante 600/601<sub>v</sub> konnten sogar zwei unterschiedliche Kristallisationsbedingungen identifiziert werden. Zum einen konnte die Bildung von plättchenförmigen Kristallen nach einer Inkubationszeit von fünf Tagen dokumentiert werden (*PEGs I Suite D6*, 100 mM HEPES pH 7.5, 15 % (w/v) PEG 20000, Abbildung 47B), zum anderen wurde die Bildung von rundlichen Plättchen bereits nach einer eintägigen Inkubation beobachtet (*Classics I Suite F4*, 100 mM HEPES pH 7.5, 10 % (w/v) PEG 8000, Abbildung 47C).<sup>[143]</sup>

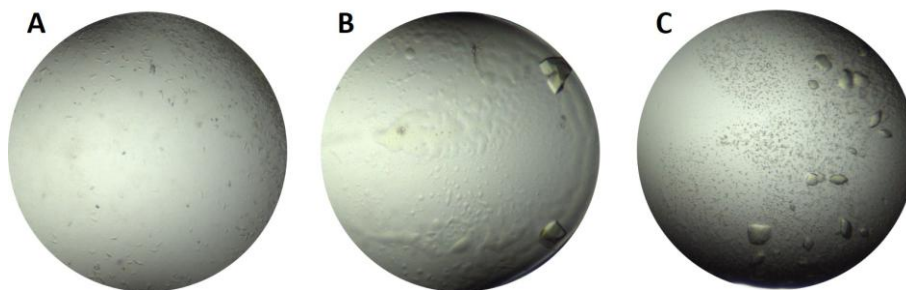


Abbildung 47: Im Rahmen der durchgeführten Screenings beobachtete Kristallbildung. **A:** Variante 179/180<sub>v</sub>, 10 mg/mL, *Classics I Suite Well D12*, 4 M Natriumformiat, 20 °C, 5 d. **B:** Variante 600/601<sub>v</sub>, 10 mg/mL, *PEGs I Suite Well D6*, 100 mM HEPES pH 7.5, 15 % (w/v) PEG 20000, 20 °C, 8 d. **C:** Variante 600/601<sub>v</sub>, 10 mg/mL, *Classics I Suite Well F4*, 100 mM HEPES pH 7.5, 10 % (w/v) PEG 8000, 20 °C, 8 d.

Die Bedingungen, unter denen die Kristalle in diesen Screenings erhalten wurden, sollten anschließend in *Finescreens* reproduziert werden. Im ersten Experiment zur Reproduktion der Kristallisationsbedingungen des Initiationskomplexes der Variante 179/180<sub>v</sub> konnte nach einwöchiger Inkubation das Wachstum kleiner, dünner Platten beobachtet werden (Abbildung 48A). Die Kristalle zeigten jedoch weder im Haus, noch am Paul-Scherrer-Institut<sup>[144]</sup> eine Diffraktion.

Eine der beiden entdeckten Kristallisationsbedingungen für die Variante 600/601<sub>v</sub> (*PEGs I Suite D6*, 100 mM HEPES pH 7.5, 15 % (w/v) PEG 20000, Abbildung 47B) konnte ebenfalls reproduziert werden (s. Anhang, Abbildung 117).

Nach einer Inkubationszeit von zehn Tagen bei einer Temperatur von 20 °C konnte die Bildung sehr kleiner Kristalle beobachtet werden (Abbildung 48B). Diese Kristalle waren zwar für Röntgenbeugungsexperimente zu klein ( $< 30 \mu\text{m}$ ), konnten aber in einem *Seeding* (vgl. Abschnitt 5.2.3.15) verwendet werden, um die Bildung größerer Proteinkristalle zu fördern. Die erneute Bildung von Kristallen der Variante 600/601<sub>v</sub> unter diesen Bedingungen konnte jedoch im weiteren Verlauf dieser Arbeit nicht mehr reproduziert werden.

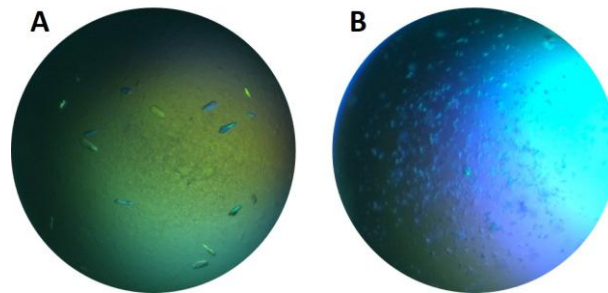


Abbildung 48: Im Rahmen der Reproduktion der Hits des Screenings beobachtete Kristalle. **A:** Variante 179/180<sub>v</sub>, 5 mg/mL, 3.5 M Natriumformiat, 20 °C, 7 d. **B:** Variante 600/601<sub>v</sub>, 10 mg/mL, 100 mM HEPES pH 7.5, 10 % Glycerin, 18 % (w/v) PEG 20000, 20 °C, 10 d.

Um die Kristallisationsbedingungen der verkürzten, photoaktiven Varianten zu optimieren, wurde mit den Fusionsproteinen ebenfalls ein TSA durchgeführt. Beispielhaft sind im Folgenden die Ergebnisse der Variante 67/68<sub>v</sub> dargestellt (Tabelle 12). Die Resultate des TSAs der übrigen Varianten sind im Anhang zu finden (Tabelle 34-Tabelle 38).

Für alle Varianten ergaben sich ähnliche Ergebnisse wie für das Wildtypenzym (vgl. Tabelle 8), die Schmelztemperatur erreichte bei hoher Salzkonzentration ( $> 0.5 \text{ M NaCl}$ ) und neutralem bis leicht basischem pH-Wert (pH 6.0 – 9.0) den höchsten Wert. Für die Kristallisation dieser Varianten wurde nachfolgend analog zum WT-Enzym der Kristallisationspuffer B (50 mM Tris pH 8.1, 500 mM NaCl, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM DTT) verwendet.

Tabelle 12: Resultate der Schmelzpunktanalyse der Variante 67/68<sub>v</sub>. Dargestellt ist die jeweilige Schmelztemperatur  $T_m/^\circ\text{C}$  in Abhängigkeit vom jeweiligen pH-Wert und der entsprechenden NaCl-Konzentration. Farbcodierung von rot (niedrig) nach blau (hoch).

|        | 0 mM NaCl | 50 mM NaCl | 100 mM NaCl | 150 mM NaCl | 200 mM NaCl | 250 mM NaCl | 500 mM NaCl | 1 M NaCl |
|--------|-----------|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|----------|
| Wasser | 39.5      | 41         | 45          | 39.5        | 46.5        | 46          | 46.5        | 48       |
| pH 4.5 | 35.5      | 35.5       | 35.5        | 35          | 35.5        | 33          | 35          | 36.5     |
| pH 5.0 | 37        | 35.5       | 38.5        | 40          | 40.5        | 40          | 42          | 45       |
| pH 5.5 | 38        | 39         | 40.5        | 41.5        | 42.5        | 40          | 44.5        | 46.5     |
| pH 6.0 | 39.5      | 38         | 39          | 40          | 41.5        | 41.5        | 42.5        | 43       |
| pH 6.5 | 39        | 39.5       | 41          | 42          | 43          | 43          | 44.5        | 46       |
| pH 7.0 | 38.5      | 40         | 42.5        | 43          | 43.5        | 44          | 45.5        | 47       |
| pH 7.5 | 39.5      | 41         | 43          | 44.5        | 45          | 45.5        | 46.5        | 48       |
| pH 8.0 | 39.5      | 42.5       | 43          | 44.5        | 44.5        | 45.5        | 46.5        | 47.5     |
| pH 8.5 | 40.5      | 42         | 42.5        | 44          | 44          | 44.5        | 45.5        | 47       |
| pH 9.0 | 41.5      | 42         | 42.5        | 43.5        | 44          | 44.5        | 45.5        | 46.5     |
| pH 9.5 | 40        | 41         | 42.5        | 42          | 42.5        | 42.5        | 45          | 46       |

Nach der durchgeführten Schmelzpunktanalyse wurden erneut Kristallisationsexperimente mit kommerziell erhältlichen Kits (*NeXtal Biotech*, *Molecular Dimensions*) durchgeführt. Der Fokus der Experimente lag auf den Initiationskomplexen, da bis zu diesem Zeitpunkt für keinen der Elongationskomplexe der Fusionsproteine eine Kristallbildung beobachtet worden war. Die Kristallisationsversuche der komplexierten, photoaktiven Varianten wurden in jeweils 480 Bedingungen bei bis zu vier verschiedenen Proteinkonzentrationen und zwei Temperaturen (4 °C, 20 °C) durchgeführt (Tabelle 13).

Tabelle 13: Durchgeführte kommerzielle 96-Well-Screenings der verkürzten Varianten: ● 67/68<sub>v</sub>, ● 179/180<sub>v</sub>, ● 600/601<sub>v</sub>.

| c <sub>Prot</sub> / mg mL <sup>-1</sup> | PACT |   |   | PEGs I |   |   | Classics I |   |   | JCSG+ |   |   | Nucleix |   |   |
|---|------|---|---|--------|---|---|------------|---|---|-------|---|---|---------|---|---|
| 5                                       | ■    | ■ | ■ | ■      | ■ | ■ | ■          | ■ | ■ | ■     | ■ | ■ | ■       | ■ | ■ |
| 7.5                                     |      |   | ■ |        |   | ■ |            |   | ■ |       |   | ■ |         |   | ■ |
| 10                                      | ■    | ■ | ■ | ■      | ■ | ■ | ■          | ■ | ■ | ■     | ■ | ■ | ■       | ■ | ■ |
| 15                                      |      | ■ |   |        | ■ |   |            | ■ |   |       | ■ |   |         | ■ |   |
| 20                                      | ■    |   | ■ | ■      |   | ■ | ■          |   | ■ | ■     |   | ■ | ■       |   | ■ |

In den durchgeführten Experimenten konnte die Bildung von Kristallen bei jeder Variante der T7-RNAP beobachtet werden (Abbildung 49). Für den Initiationskomplex der verkürzten Variante 67/68<sub>v</sub> konnten diverse Bedingungen gefunden werden, bei denen die Bildung von Kristallen beobachtet wurde (Abbildung 49A-C). Dabei waren keine direkten Zusammenhänge zwischen den Bedingungen zu erkennen. Um diese Bedingungen zu validieren, wurden Kristallisationsversuche mit den im Hochdurchsatz-Screening (HTS) identifizierten Bedingungen in *Finescreens* durchgeführt (s. Anhang, Abbildung 118), dabei konnte jedoch keine Kristallbildung beobachtet werden.

Bei der Variante 600/601<sub>v</sub> konnten ebenfalls unterschiedliche Kristallisationsbedingungen für den Initiationskomplex sowohl bei 4 °C (Abbildung 49D) als auch bei 20 °C (Abbildung 49E) gefunden werden. Dabei war ersichtlich, dass in beiden Bedingungen 15 mM MgCl<sub>2</sub> und HEPES als Puffersubstanz vorhanden waren. Darüber hinaus waren die beiden strukturell sehr ähnlichen Substanzen Spermin und Spermidin (beide 1 mM) vorhanden und die Bedingungen unterschieden sich nur in dem verwendeten Präzipitans. Um diese Bedingungen zu validieren, sollten die Kristalle aus Abbildung 49D (*Nucleix Suite*, Reservoir G9, 50 mM HEPES pH 7.5, 1 mM Spermin, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) in einem *Finescreen* reproduziert werden (s. Anhang, Abbildung 119). Es wurde jedoch keine Kristallbildung beobachtet, weshalb die im HTS erhaltenen Kristalle direkt aus dem 96-well-screening isoliert, eingefroren und am ESRF<sup>[145]</sup> gemessen wurden. Dabei stellte sich heraus, dass es sich bei den Kristallen entgegen der Erwartung um Salzkristalle handelte. Die Kristallisationsbedingungen aus Abbildung 49E wurden ebenfalls in *Finescreens* angesetzt (s. Anhang, Abbildung 120), jedoch konnte dabei ebenfalls keine Kristallbildung beobachtet werden. Auf Grund der sehr ähnlichen Bedingungen kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei den Kristallen in Abbildung 49E auch um Salzkristalle handelte. Die beiden Kristallisationsbedingungen wurden daher nicht weiterverfolgt.

Für die Variante 179/180<sub>v</sub> wurden die bereits zuvor dokumentierten Bedingungen (Abbildung 47A, 4 M Natriumformiat) für die Kristallisation des Initiationskomplexes im HTS mit dem optimierten Kristallisationspuffer B (50 mM Tris pH 8.1, 500 mM NaCl, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM DTT) reproduziert (Abbildung 49F). Dabei wurden Kristalle mit derselben Morphologie (kleine Plättchen) erhalten, jedoch in größerer Anzahl als bei der Verwendung des Kristallisationspuffers A.

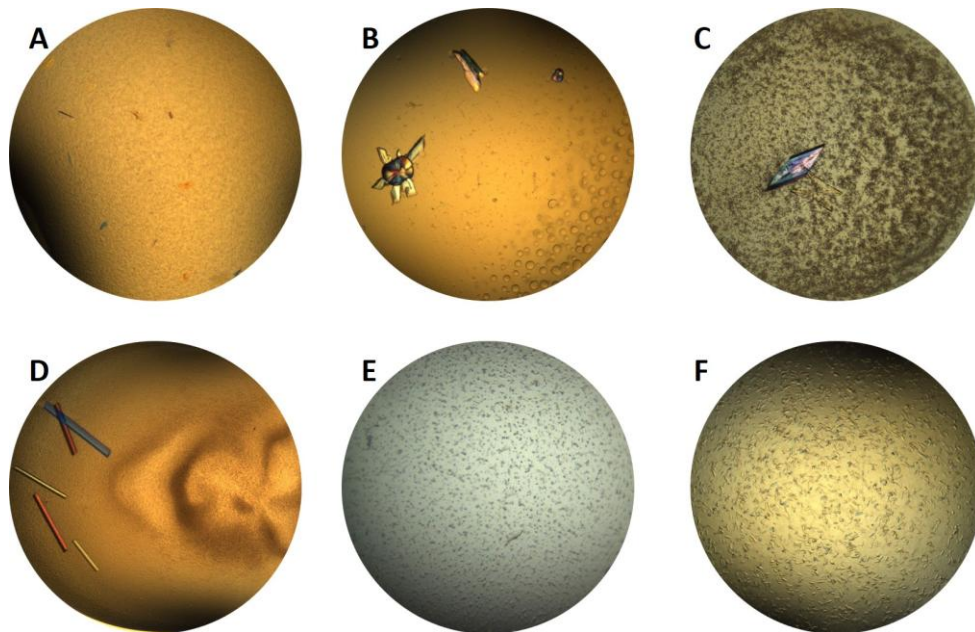


Abbildung 49: In den angesetzten 96-Well-Screenings gefundene Kristallisationsbedingungen. **A:** Variante 67/68<sub>v</sub>, 5 mg/mL, Nucleix Screening Well D10, 100 mM Tris HCl pH 8.5, 50 mM MgSO<sub>4</sub>, 35 % 1,6-Hexandiol, 4 °C, 2 d. **B:** Variante 67/68<sub>v</sub>, 5 mg/mL, JCSG+ Suite Well D7, 100 mM Tris HCl pH 8.5, 200 mM Li<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 40 % (v/v) PEG 400, 4 °C, 2 d. **C:** Variante 67/68<sub>v</sub>, 20 mg/mL, JCSG+ Suite Well A12, 200 mM KNO<sub>3</sub>, 20 % (w/v) PEG 3350, 4 °C, 5 d. **D:** Variante 600/601<sub>v</sub>, 20 mg/mL, Nucleix Screenings Reservoir G9, 50 mM HEPES pH 7.5, 1 mM Spermin, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 4 °C, 5 d. **E:** Variante 600/601<sub>v</sub>, 7.5 mg/mL, Nucleix Screenings Well F8, 50 mM HEPES pH 7.5, 1 mM Spermidin, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 % (v/v) Dioxan, 20 °C, 5 d. **F:** Variante 179/180<sub>v</sub>, 10 mg/mL, Classics I Screenings Reservoir D12, 4 M Natriumformiat, 4 °C, 8 d.

Aufgrund des geringen Erfolgs des Hochdurchsatz-Screenings wurde der Schwerpunkt im Folgenden auf die Optimierung der reproduzierbaren Kristallisation der Variante 179/180<sub>v</sub> (4 M Natriumformiat, Abbildung 48A und Abbildung 49F) gelegt.

### 3.9.4 Optimierung der Kristallisationsbedingungen für die Variante 179/180<sub>v</sub>

Als erster Ansatz zur Optimierung der Kristallisation wurde ein *Seeding* mit den im *Finescreen* erhaltenen Kristallen durchgeführt (Abbildung 48, Abbildung 50), das zu neuen Kristallen führte. Diese zeigten am ESRF<sup>[145]</sup> eine Proteindiffraktion von bis zu 8.5 Å.

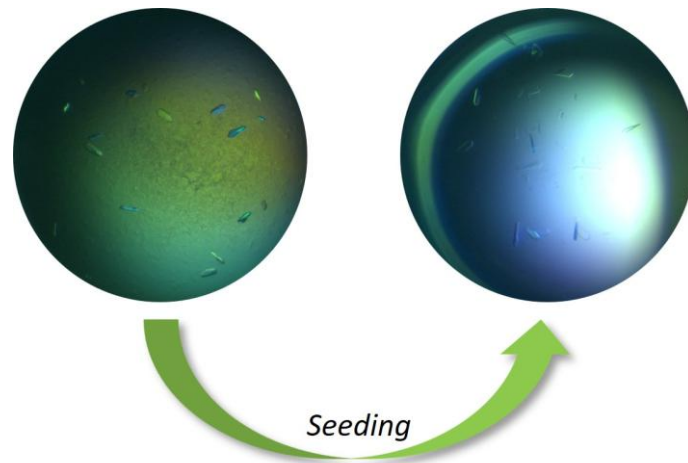


Abbildung 50: Ergebnisse der Ansätze zur Optimierung durch das Seeding, Variante 179/180<sub>v</sub>. **Links:** Für die Seeding-Stammlösung verwendete Kristalle, 5 mg/mL, 3.5 M Natriumformiat, 20 °C, 7 d, **rechts:** 10 mg/mL, Verdünnung der Seeding-Lösung 1:10000, 3.5 M Natriumformiat, 20 °C, ca. 1 Monat.

Um die Kristallqualität und dadurch die Auflösung in Diffraktionsexperimenten zu verbessern, wurde ein *Additiv-Screening* durchgeführt. Ein *Additiv-Screening* beinhaltet 96 verschiedene Additive (Salze, Alkohole, Aminosäuren u.ä.), welche die Löslichkeit und Stabilität von Proteinen und damit die Kristallisationsbedingungen verbessern können. Mit dem *Additive Screen HT* der Firma *Hampton Research* (HR2-138) konnte bei 60 % (58 von 96) der Additive eine Kristallbildung beobachtet werden, allerdings ohne Veränderungen in der Morphologie der Proteinkristalle. Die gebildeten Kristalle unterschieden sich lediglich in der Größe, wodurch eine erste differenzierte Bewertung der Zusatzstoffe erschwert war. Aus diesem Grund wurden alle getesteten Additive nach ihren Eigenschaften (Aminosäure, Mono-, Di-, Tri-Kation etc.) klassifiziert und die vielversprechendste Bedingung jeder Klasse in *Finescreens* eingesetzt.<sup>[116]</sup> Bei den Additiven Praseodym-(III)-Acetat, Aceton und D-Sorbitol konnte dann die Bildung größerer Kristalle (ca. 30-40 µm) beobachtet werden (Abbildung 51).

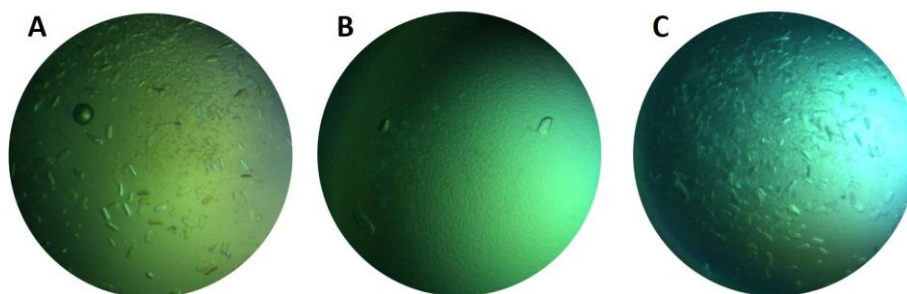


Abbildung 51: Reproduktion der Bedingungen des Additiv-Screenings der Variante 179/180<sub>v</sub> im Initiationskomplex. **A:** 10 mg/mL, 4 M Natriumformiat, 10 mM Pr(OAc)<sub>3</sub>, 20 °C, 10 d. **B:** 15 mg/mL, 4 M Natriumformiat, 4.0 % (v/v) Aceton, 20 °C, 4 d. **C:** 10 mg/mL, 4 M Natriumformiat, 2.0 % (v/v) D-Sorbitol, 20 °C, 10 d.

In Röntgenbeugungsexperimenten am ESRF<sup>[145]</sup> und SLS<sup>[144]</sup> zeigten diese jedoch nur eine geringfügige Verbesserung der Diffraktion auf etwa 8 Å (Abbildung 51A, Praseodym-(III)-Acetat).

Nach dem mit der Variante 179/180<sub>v</sub> durchgeführten TSA und dem damit verbundenen Pufferwechsel konnte eine weitere Vergrößerung der Proteinkristalle beobachtet werden (4 M Natriumformiat, 10 mM Praseodym-(III)-Acetat, 20 °C, ca. 75 µm, Abbildung 52A). Diese Kristalle zeigten in den Messungen am ESRF<sup>[145]</sup> sowohl eine leichte Steigerung in der Intensität der Streuung als auch eine Verbesserung der Auflösung auf ca. 6.5-7 Å (Abbildung 52C). Ein Datensatz (360°, 0.1°/Bild) wurde aufgenommen, jedoch war dieser nicht vollständig und konnte auf Grund der geringen Datenmenge und der moderaten Auflösung nicht prozessiert werden.

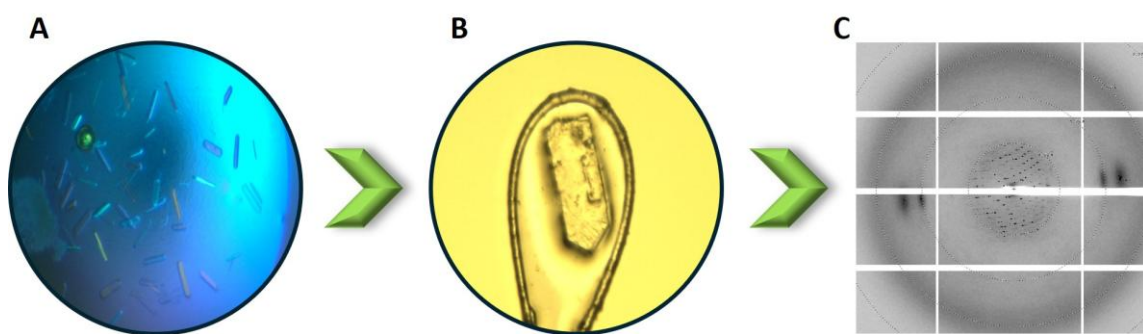


Abbildung 52: Nach mehreren Optimierungszyklen erhaltene Kristalle der Variante 179/180<sub>v</sub> mit der bislang besten Diffraktion. **A:** 10 mg/mL Initiationskomplex 179/180<sub>v</sub>, 4.25 M Natriumformiat, 10 mM Pr(OAc)<sub>3</sub>, 20 °C, ca. 2.5 Monate. **B:** Bild des am ESRF<sup>[145]</sup> gemessenen Kristalls innerhalb eines Cryoloops (0.2-0.3 mm Größe). **C:** Diffraktionsbild des Kristalls mit einer Diffraktion von ca. 7 Å.

Weitere durchgeführte Optimierungsversuche wie z. B. *shrinking*,<sup>[146]</sup> Variation der Kristallisationstemperatur (12 °C, 4 °C) oder des pH-Wertes führten zu keiner Verbesserung der Auflösung. Daher sollte das aktive Zentrum der Variante 179/180<sub>v</sub> durch die Komplexbildung mit 3'-Desoxyguanosintriphosphat (3'-dGTP) während der Kristallisation stabilisiert werden. In Abbildung 53A ist beispielhaft das aktive Zentrum des Initiationskomplexes der WT-T7-RNAP mit komplexiertem 3'-dGTP gezeigt (PDB 2PI4<sup>[49]</sup>). Die bei dem Kristallisationsexperiment (4 M Natriumformiat, 10 mM Praseodym-(III)-Acetat, 10 mM 3'-dGTP) erhaltenen Kristalle zeigten trotz der stabilisierenden Wechselwirkungen im aktiven Zentrum keine Veränderung in der Morphologie und keine Diffraktion in Röntgenbeugungsexperimenten am ESRF.<sup>[145]</sup>

Eine Ursache für die bisherige moderate Diffraktion der Kristalle könnte die strukturelle Änderung der Variante bei Bestrahlung mit Licht sein, da durch den Einfluss von Licht ein Teil der Proteine in den Lichtzustand angeregt werden könnte, wodurch die Homogenität im Kristall nicht mehr gewährleistet wäre. Daher wurde nachfolgend eine Mutation, Cys450Ala, in die AsLOV2-Domäne der Variante 179/180<sub>v</sub> eingebracht, um die Anregung der LOV-Domäne zu unterbinden und den dauerhaften Dunkelzustand aller Proteinmoleküle während der Kristallisation und der Röntgenbeugungsexperimente gewährleisten zu können.

Auch mit dieser Proteinvariante wurden Kristalle erhalten, die in der Morphologie den bisher erhaltenen Kristallen der Variante 179/180<sub>v</sub> ohne Mutation gleichen (Abbildung 53B). Diese

wurden isoliert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und am ESRF<sup>[145]</sup> gemessen. Leider konnte auch hier keine verbesserte Diffraktion beobachtet werden konnte.

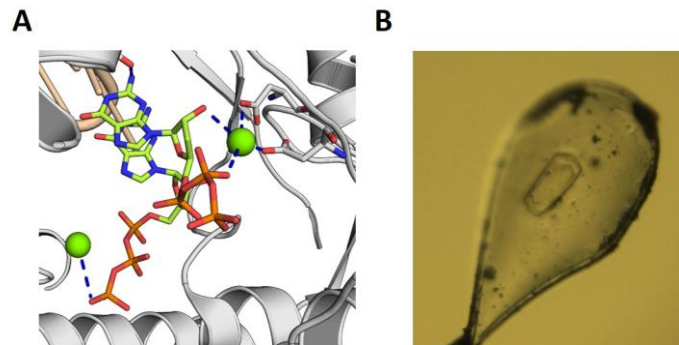


Abbildung 53: **A** Ausschnitt des im aktiven Zentrum komplexierten 3'-dGTP aus einer Kristallstruktur des Initiationskomplexes der Wildtyp-T7-RNAP (PDB 2PI4<sup>[49]</sup>). Die Magnesiumkationen sind in grün dargestellt. **B** Kristall der Variante 179/180<sub>v</sub> mit der Mutation Cys450Ala innerhalb der AsLOV2-Domäne.

Obwohl insgesamt im Rahmen dieser Arbeit eine Vielzahl an unterschiedlichen Optimierungsmöglichkeiten durchgeführt wurde, war die Aufnahme eines auswertbaren Datensatzes und die Aufklärung der Kristallstruktur einer photoschaltbaren T7-RNAP-Variante nicht möglich. Die bisher erhaltenen Kristalle (Abbildung 52) und Kristallisationsbedingungen eignen sich jedoch sehr gut als Startpunkt für eine weitere und detaillierte Optimierung.

## 4. Zusammenfassung und Ausblick

Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, ein mechanistisches Verständnis lichtregulierter Varianten der T7-RNA-Polymerase zu erlangen. Dazu wurden drei Enzymvarianten mit Insertionen einer AsLOV2-Domäne an den Positionen 67/68, 179/180 und 600/601 kloniert, exprimiert und mit Reinheiten von über 95 % präpariert. Mit einem im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Assay konnten die kinetischen Parameter des Wildtyps sowie der photoaktiven Varianten reproduzierbar bestimmt werden, wobei die erhaltenen Geschwindigkeiten im Bereich von  $51 \text{ nt s}^{-1}$  bis  $86 \text{ nt s}^{-1}$  lagen und sehr gut mit bereits publizierten Daten übereinstimmten.<sup>[78-80]</sup> Durch Lineweaver-Burk-Auftragungen und AlphaFold-Modellierungen konnten mögliche Inhibierungsmechanismen formuliert und Möglichkeiten zur Anwendung der lichtabhängigen Transkription abgeleitet werden. Besonders die beobachtete Effizienzsteigerung der Variante 600/601 ist für zukünftige Verwendung in Grundlagenforschung und Biotechnologie von Interesse.

Durch computergestützte Methoden wurden sieben weitere Insertionspositionen in T7-RNAP identifiziert, welche nicht aus *split*-Positionen resultierten. Vier der erzeugten neuen Varianten stellten sich als löslich und aktiv heraus (Variante 470/471, 506/507, 665/666, 713/714), und von diesen zeigten zwei in *in-vitro*-Transkriptionsreaktionen eine lichtabhängige Inhibition um mehr als 20 Prozentpunkte (470/471 und 713/714). Aus den gewonnenen Daten konnten erste Regeln für die Insertion von LOV-Domänen in T7-RNAP abgeleitet werden. Diese sind möglicherweise auch auf strukturell ähnliche Polymerasen anwendbar. Die Übertragung der Regeln auf die Familie der Tyrosin-Kinasen (Beispiel: Abl-Kinasedomäne), die im Rahmen einer Masterarbeit erfolgte,<sup>[147]</sup> resultierte zwar zwei LOV-Fusionsproteine, deren Aktivität durch Bestrahlung um ca. 50 % reduziert werden konnte, zeigte gleichzeitig aber auch, dass die bei T7-RNAP angewandten Kriterien nicht numerisch exakt gültig waren.

In einem weiteren Teil dieser Arbeit wurde der Fokus auf die Optimierung der vielversprechendsten T7-RNAP-LOV-Variante 179/180 gelegt. Hierbei wurde durch die Verlängerung der  $\alpha$ -Helix mit starren Strukturelementen (z.B. dem Collagen-ähnlichen Motiv (GPP)<sub>2</sub> oder einer AS-Sequenz aus der rigiden Myosin-VI-Helix) eine größere Hebelwirkung und damit einhergehend eine stärkere Inhibition der Polymerase erwartet. Entgegen dieser Erwartung konnte jedoch keine Verbesserung der lichtabhängigen Deaktivierung beobachtet werden. Hier wurde die Reaktionsgeschwindigkeit durch die Modifikationen nicht signifikant reduziert, was darauf hindeutet, dass strukturelle Anpassungen innerhalb der Linkerregion toleriert werden.

Zusätzlich konnte in dieser Arbeit ein zelluläres System etabliert werden, mit dem die lichtinduzierte Inhibition einer T7-RNA-Polymerasevariante in *E. coli* nachgewiesen werden konnte. Die in IVT bestimmte, lichtabhängige Inhibition wurde im zellulären System reproduziert, was die Anwendbarkeit der Methode auf größere *Screening*-Ansätze (*random insertion libraries*, gerichtete Evolution) erweitert und zukünftige Hochdurchsatzstudien erleichtert.

Abschließend wurden Kristallisationsstudien durchgeführt, um die strukturellen Auswirkungen der LOV-Domäne detailliert untersuchen zu können. Dabei konnten sowohl die Strukturen des Initiations- als auch des Elongationskomplexes der WT-T7-RNAP gelöst werden. Es wurden verschiedene Bedingungen ermittelt, unter denen Varianten der T7-RNAP mit insertierter LOV2-Domäne kristallisierten. Allerdings zeigte nur eine der Varianten, 179/180<sub>v</sub>, nach umfangreichen Optimierungsversuchen eine Röntgendiffraktion im Bereich von 6-7 Å. Obwohl auch diese Auflösung nicht ausreichte, um eine Kristallstruktur zu bestimmen, stellt sie eine solide Grundlage für weitere Optimierungen dar.

Aus den erzielten Ergebnissen resultiert eine Reihe von neuen Fragen, aber auch eine Reihe von möglichen Anwendungen:

Im unmittelbaren Fokus steht die Frage, ob das Ausmaß der bisher durch Licht erzielten Strukturänderungen durch Modifikationen am Protein (z. B. Punktmutationen oder Veränderungen der Linkerlänge) vergrößert werden kann. Da eine Verlängerung der J $\alpha$ -Helix zu keiner signifikanten Verbesserung der Schaltbarkeit führte, sollte eine zufällige Mutation oder Verkürzung der Linkerregion durchgeführt werden. Dabei könnte eine Sättigungsmutagenese<sup>[148]</sup> mit geringem experimentellen Aufwand eine große Anzahl modifizierter Varianten testen. Mit einem Oligonukleotidgemisch wäre es ebenfalls möglich, die Linkerregion systematisch zu verkürzen und die Auswirkung der Veränderung auf die lichtabhängige Aktivität zu analysieren. Eine weitere Idee besteht in der Überprüfung, ob die Insertion von zwei AsLOV2-Domänen, z.B. an den beiden bekannten Positionen 179/180 und 600/601 die Inhibierung verstärkt (Abbildung 54B).

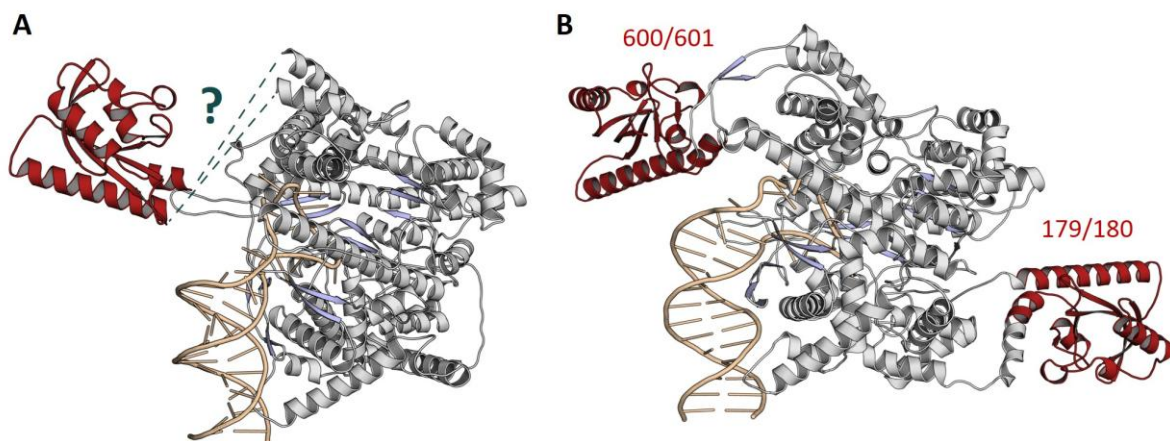


Abbildung 54: AF3-modellierte Initiationskomplexe.<sup>[130]</sup> **A:** Initiationskomplex der Variante 600/601 mit variabler Linker-Region (symbolisch dargestellt durch die blaugrüne, gestrichelte Linie), rot: AsLOV2-Domäne, ockerfarben: dsDNA. **B:** Modellierter Initiationskomplex einer T7-RNAP mit zweifach insertierter AsLOV2-Domäne (rot), ockerfarben: dsDNA.

Zur Klärung der Frage des strukturellen Einflusses der LOV-Domäne auf die Polymerase beim Übergang in den Lichtzustand sollten weitere Versuche unternommen werden, eine Röntgen-Kristallstruktur einer photoaktiven Variante zu erhalten. Neben der weiteren Optimierung der üblichen Parameter (Proteinkonzentration, pH-Wert, Fällungsmittel, Cryoprotektans, Temperatur etc.) könnte das sogenannte *Microseed-Matrix-Seeding* (MMS) zum Einsatz kommen.

---

Hierbei werden bereits erfolgreich gebildete Kristalle für das *Seeding* verwendet und die kommerziell erhältlichen Hochdurchsatz-Screenings mit den Nuklei in der Lösung wiederholt.<sup>[149]</sup> Ziel dieser Methode ist es, neue Kristallisationsbedingungen zu finden und mit diesen die Diffraktion der Kristalle zu verbessern. In zukünftigen Studien könnten zusätzlich Mutationen zur Stabilisierung des Enzyms eingebracht oder die Varianten weiter verkürzt werden, um den Kristallisationsprozess zu optimieren. Eine erste Analyse der Primärsequenz der Varianten 67/68<sub>v</sub> (Abbildung 121) und 600/601<sub>v</sub> (Abbildung 122) mithilfe des *Xtal-Pred-RF-Webservers*<sup>[150]</sup> bestätigte, dass im N-terminalen Bereich der Proteine ungeordnete Strukturen vorliegen. Somit könnte eine Verkürzung der Fusionsproteine um diese Bereiche die Kristallisation begünstigen<sup>[151]</sup> und insgesamt weniger flexible (und dadurch heterogene) Anordnungen im Kristall zu erhalten.

## 5. Material und Methoden

### 5.1 Materialien

#### 5.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 14: verwendete Geräte.

| Bezeichnung                                      | Hersteller                            | Modell   |
|--|---------------------------------------|--|
| Autoklav   | Systemec                              | VX150  |
| Beleuchtungsapparatur 1                          | Mechanische Werkstatt<br>Fakultät CCB | Vgl. Abbildung 125, Anhang   |
| Beleuchtungsapparatur 2                          | Mechanische Werkstatt<br>Fakultät CCB | Vgl. Abbildung 126, Anhang   |
| Brutschrank                                      | Memmert                               | 100-8000   |
| <i>Crystal crusher</i>                           | Hampton Research                      | -  |
| Elektroporator                                   | Eppendorf                             | 2510   |
| Fluoreszenzmikroskop                             | Olympus                               | IX81; ZDC-Autofokus; Lichtquelle:<br>MT20, Objektiv: 20x X-Apo 0.80<br>NA/o.6 WD |
| FPLC-Chromatographiesystem                       | GE HealthCare Life Science            | Äkta Purifier  |
| Geldokumentation AGE1                            | Alpha Innotec                         | Alphaimager  |
| Geldokumentation AGE2                            | Biometra                              | UV-Star  |
| Geldokumentation SDS-PAGE                        | HP                                    | Scanjet 300  |
| Gelfiltrationssäulen                             | Cytiva                                | Superdex200 16 600, Superdex<br>200 10/300 GL                                    |
| Hochdruckhomogenisator                           | Microfluidics Corp.                   | Microfluidizer M-110L  |
| Inkubationsschränke                              |                                       |  |
| Kristallographie                                 | Memmert                               | IPP260   |
| Inkubationsschüttler                             | InforsHT                              | Multitron Standard   |
| Kamera Fluoreszenzmikroskop                      | Hamamatsu                             | EMCCD C9100-13   |
| Kristallisationsplatten-Imager <sup>[142]</sup>  | Formulatrix                           | Rock Imager 1000   |
| Kühlzentrifuge                                   | Eppendorf                             | Centrifuge 5804R   |
| Lichtquelle zur Anregung<br>Fluoreszenzmikroskop | Lumencor                              | SPECTRA X Light Engine   |
| Luxmeter   | Voltcraft                             | MS-1300  |
| Magnetrührer                                     | IKA                                   | Rh basic 2   |
| Mikroskop  | Zeiss                                 | SteREO Discovery.V8; Kamera:<br>AxioCam ICc 1                                    |
| Mikroskop 2                                      | Olympus                               | SZX16; Kamera: EP50  |
| Mikrotiterplatten-Lesegerät                      | BioTek                                | Synergy2, SynergyHT  |
| <i>Mounted CryoLoops</i>                         | Hampton Research                      | 10 Micron, 0.05 – 0.7 mm   |
| PCR Cyclus                                       | Eppendorf                             | Mastercycler   |
| pH-Messgerät 1                                   | Mettler Toledo                        | SevenCompact S220 Basic  |
| pH-Messgerät 2                                   | Metrohm                               | 654  |
| Photometer                                       | Thermo Scientific                     | Evolution 201 UV/Vis<br>Spectrophotometer  |
| Pipettensatz 1                                   | Eppendorf                             | Research   |
| Pipettensatz 2                                   | Eppendorf                             | Research plus  |
| Pipettensatz 3                                   | Abimed                                | Labmate Optima   |
| Pipettierroboter                                 | TTP Labtech                           | Mosquito® Crystal LCP  |
| Röntgendiffraktometer                            | Bruker                                | D8 Venture, Röntgenquelle: $\mu\text{S}$<br>3.0, Detektor: Photon III            |
| Schüttler SDS-Gele                               | IKA                                   | MTS4   |

Tabelle 14: Verwendete Geräte (Fortsetzung).

| Bezeichnung               | Hersteller           | Modell   |
|---------------------------|----------------------|--|
| SDS-PAGE Kammer           | BioRad               | Mini Protean 3 Cell                                |
| Spannungsquelle 1         | BioRad               | PowerPac Basic                                     |
| Spannungsquelle 2         | Major Science        | MP-300V  |
| Spannungsquelle 3         | Pharma Fine Chemical | ECPS 3000/150                                      |
| Spektralphotometer 1      | Thermo Scientific    | NanoDrop 2000                                      |
| Spektralphotometer 2      | Thermo Scientific    | NanoDrop OneC                                      |
| Thermoschüttler 1         | Biometra             | ThermoShaker                                       |
| Thermoschüttler 2         | Eppendorf            | Thermomixer comfort                                |
| Thermostat                | Julabo               | F12-ED   |
| Tischzentrifuge           | Eppendorf            | Minispin   |
| Ultrazentrifuge 1         | Thermo Scientific    | Sorvall™ Evolution RC                              |
| Ultrazentrifuge 2         | Thermo Scientific    | Sorvall™ LYNX™ 6000                                |
| Ultrazentrifuge Rotoren 1 | Thermo Scientific    | SA-600, SA-800                                     |
| Ultrazentrifuge Rotoren 2 | Thermo Scientific    | Fiberlite™ F9-6 x 1000 LEX, T29-8 x 50, A27-6 x 50 |
| Vakuumkonzentrator        | Eppendorf            | Concentrator plus                                  |
| Vortexer                  | Heidolph             | Reax 2000  |

Tabelle 15: verwendete Verbrauchsmaterialien.

| Bezeichnung  | Hersteller          |
|--|---------------------|
| 96-well <i>sitting drop</i> Kristallisationsplatte TTP | Labtech             |
| Deckgläser   | Carl Roth           |
| Dialyseschlauch (MWCO 14 kDa)                          | Carl Roth           |
| EasyXtal 15-well Tool X-Seal                           | NeXtal Biotech      |
| Elektroporationsküvetten (1 mm)                        | Biozym              |
| Kanülen Sterican 21 G, 120 mm                          | Braun               |
| Kanülen Sterican 20 G, 40 mm                           | Braun               |
| Mikroplatte, 96-well, F-Boden, Schwarz                 | Greiner Bio-one     |
| Monarch Plasmid Miniprep Säulen                        | NEB                 |
| Ni NTA Superflow Cartridge                             | Qiagen              |
| Objektträger   | Carl Roth           |
| PCR-Gefäße 0.2 mL                                      | Sarstedt            |
| Pipettenspitzen 0.5 µL – 1000 µL                       | Sarstedt            |
| Pipettenspitzen epT.I.P.S 5 mL                         | Eppendorf           |
| QIAprep 2.0 Spin Miniprep Säulen                       | Qiagen              |
| Reaktionsgefäße 1.5 mL schwarz                         | Carl Roth           |
| Reaktionsgefäße Safeseal 1.5 mL/2 mL                   | Sarstedt            |
| Reaktionsgefäße 5 mL                                   | Sarstedt            |
| Serologische Pipetten 2 mL                             | Sarstedt            |
| Spritzen Injekt Luer-Ansatz 1 mL, 5 mL, 10 mL, 20 mL   | Braun               |
| Spritzenvorsatzfilter 0.22 µm                          | Sarstedt            |
| Spritzenvorsatzfilter 0.45 µm                          | Sarstedt            |
| Standardeinmalkanülen 20Gx1 ½“, 0.9 x 0.4 mm           | Braun               |
| Sterican zur Neuraltherapie G21x4 ¾“                   | Braun               |
| Superdex S200 16 600                                   | Cytiva              |
| UV-Küvetten Mikro 8.5 mm                               | Sarstedt            |
| Vis-Küvetten Halbmikro PS                              | Sarstedt            |
| Zentrifugaleinheit 0.5 mL (MWCO 5 kDa)                 | Sartorius Vivaspin  |
| Zentrifugaleinheit 20 mL (MWCO 30 kDa)                 | ThermoFisher Pierce |
| Zentrifugaleinheit 5 mL (MWCO 30 kDa)                  | Pall Microsep       |
| Zentrifugalröhrchen (konisch, 15 mL)                   | Sarstedt            |
| Zentrifugalröhrchen (konisch, 50 mL)                   | Sarstedt            |

### 5.1.2 Chemikalien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Carl Roth GmbH + Co. KG und Merck KGaA in größter Reinheit erworben.

### 5.1.3 Enzyme

Tabelle 16: Verwendete Enzyme und Enzymkonzentrationen, sowie Erkennungssequenzen der Enzyme.

| Enzym                  | Erkennungssequenz                 | Reaktionspuffer             | Hersteller   | Konzentration        |
|------------------------|-----------------------------------|-----------------------------|--------------|----------------------|
| <i>AjiI</i> (Bmgbl)    | 5'-CACGTC-3'                      | NEBuffer 3.1                | NEB          | 10 U/ $\mu$ L        |
| <i>ApaI</i>            | 5'-GGGCCC-3'                      | 10X Puffer B                | ThermoFisher | 10 U/ $\mu$ L        |
|                        |                                   | 10X CutSmart                | NEB          | 50 U/ $\mu$ L        |
| <i>BamHI</i>           | 5'-GGATCC-3'                      | 10X BamHI Puffer            | ThermoFisher | 10 U/ $\mu$ L        |
|                        |                                   | 10X CutSmart                | NEB          | 20 U/ $\mu$ L        |
| <i>DpnI</i>            | 5'-G(6mA)TC-3'                    | -                           | ThermoFisher | 10 U/ $\mu$ L        |
|                        |                                   | -                           | NEB          | 20 U/ $\mu$ L        |
| Faktor Xa              | Ile-Glu/Asp-Gly-Arg↓              | -                           | NEB          | 1 mg/mL              |
| <i>HindIII</i> -HF     | 5'-AAGCTT-3'                      | 10X Puffer R                | ThermoFisher | 10 U/ $\mu$ L        |
| <i>NdeI</i>            | 5'-CATATG-3'                      | 10X CutSmart                | NEB          | 20 U/ $\mu$ L        |
| Phusion HF Polymerase  | -                                 | 5x HF Buffer                | NEB          | 20 U/ $\mu$ L        |
| Phusion-Polymerase     | -                                 | 10X Phusion Reaktionspuffer | AG Brakmann  | Arbeitskonzentration |
| <i>SmaI</i>            | 5'-CCCGGG-3'                      | 10X Puffer Tango            | ThermoFisher | 10 U/ $\mu$ L        |
| <i>Taq</i> -Polymerase | -                                 | 10X PCR-Puffer              | ThermoFisher | 5 U/ $\mu$ L         |
| TEV-Protease           | Glu-Asn-Leu-Tyr-Phe-Gln↓(Gly/Ser) | -                           | AG Brakmann  | 2.1 mg/mL            |

### 5.1.4 Antibiotika

Tabelle 17: verwendete Antibiotika.

| Antibiotikum    | Konzentration / mg mL <sup>-1</sup> | Hersteller | Reinheit / % |
|-----------------|-------------------------------------|------------|--------------|
| Ampicillin      | 100                                 | Carl Roth  | > 91.0       |
| Chloramphenicol | 20                                  | Carl Roth  | > 98.5       |
| Kanamycin       | 50                                  | Carl Roth  | k.A.         |
| Tetracyclin     | 25                                  | Carl Roth  | > 90.0       |

### 5.1.5 Bakterienstämme

Tabelle 18: Genotyp der verwendeten *E.-coli*-Stämme.

| E. Coli-Stamm          | Genotyp  |
|------------------------|--|
| BL21                   | <i>E. coli</i> B, F, <i>dcm</i> , <i>ompT</i> , <i>hsdS</i> (rB-mB-), <i>gal</i>   |
| BL21(DE3)              | <i>E. coli</i> B, F, <i>dcm</i> , <i>ompT</i> , <i>hsdS</i> (rB-mB-), <i>gal</i> $\lambda$ (DE3)   |
| BL21[pRep4]            | <i>E. coli</i> B, F <sup>-</sup> , <i>dcm</i> , <i>ompT</i> , <i>hsdS</i> (rB <sup>-</sup> mB <sup>-</sup> ), <i>gal</i> [pRep4]   |
| BL21[pAlter_mApple]    | <i>E. coli</i> B, F <sup>-</sup> , <i>dcm</i> , <i>ompT</i> , <i>hsdS</i> (rB <sup>-</sup> mB <sup>-</sup> ), <i>gal</i> [pAlterm_Apple]   |
| BL21[pRep4_mApple_RBS] | <i>E. coli</i> B, F <sup>-</sup> , <i>dcm</i> , <i>ompT</i> , <i>hsdS</i> (rB <sup>-</sup> mB <sup>-</sup> ), <i>gal</i> [pREP4_mApple_RBS]  |
| XL1-Blue               | <i>E. coli</i> K12, <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , <i>lac</i> , [F' <i>proAB</i> <i>lacIq</i> $\Delta$ M15Tn10(Tetr)] |

## 5.1.6 Medien

Tabelle 19: Zusammensetzung der Medien, Angaben in Massenkonzentrationen / g L<sup>-1</sup>.

| Substanz                               | LB-Medium / g L <sup>-1</sup> | LB-Agar / g L <sup>-1</sup> | SOC-Medium / g L <sup>-1</sup> |
|--|-------------------------------|-----------------------------|--------------------------------|
| Agar-Agar                              | -                             | 15                          | -                              |
| Glucose                                | -                             | -                           | 0.13                           |
| Hefeextrakt                            | 5                             | 5                           | 5                              |
| KCl                                    | -                             | -                           | 0.19                           |
| MgCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O | -                             | -                           | 2.03                           |
| MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O | -                             | -                           | 2.46                           |
| NaCl                                   | 10                            | 10                          | 0.58                           |
| Trypton/Pepton                         | 10                            | 10                          | 20                             |

## 5.1.7 Puffer und Lösungen

Tabelle 20: Übersicht der verwendeten Puffer.

| Puffer  | Zusammensetzung   |
|---|---|
| 1X SDS-Laufpuffer                                 | 25 mM Tris-Base, 52 mM Glycin, 3.5 mM SDS   |
| 1X TAE  | 40 mM Tris-Base, 2 mM Eisessig, 1 mM EDTA   |
| 1X Transkriptionspuffer                           | 40 mM Tris HCl (pH 8.0), 11 mM MgCl <sub>2</sub> , 2 mM Spermidin, 30 mM DTT  |
| 5X SDS-Probenpuffer                               | 0.25 M Tris-HCl (pH 6,8), 10 % (w/v) SDS, 25 % (v/v) β-Mercaptoethanol, 50 % Glycerin, 1 % (w/v) Bromphenolblau                                   |
| 5X RNA-Ladepuffer                                 | 0.25 % (w/v) Bromphenolblau, 0.25 % (w/v) Xylencyanol FF, 30 % (v/v) Glycerin, 70 % (v/v) Formamid  |
| 6X DNA-Ladepuffer 1                               | 10 mM Tris-HCl (pH 7.6), 0.03 % (w/v) Bromphenolblau, 0.03 % (w/v) Xylencyanol FF, 60 % (v/v) Glycerol, 60 mM EDTA                                |
| 6X DNA-Ladepuffer 2                               | 2.5% Ficoll®-400, 10 mM EDTA, 3.3 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.08% (w/v) SDS, 0.02% Dye 1, 8.0 · 10 <sup>-4</sup> % Dye 2                              |
| Coomassie-Färbelösung                             | 50 % (v/v) Ethanol, 10 % (v/v) Essigsäure, 1,2 g/L Coomassie-Brilliantblau G-250  |
| Der Blaue Jonas                                   | 80.34 % H <sub>2</sub> O, 17.91 % unbekannt, 1.60 % Ethanol, 0.08 % Natrium-benzoat, < 0.01 % Coomassie-Brilliantblau G-250                       |
| Dialysepuffer                                     | 100 mM Tris-HCl (pH 8.9), 200 mM NaCl, 1 mM DTT   |
| Elutionspuffer                                    | 100 mM Tris-HCl (pH 8), 150 mM NaCl, 250 mM Imidazol  |
| Entfärbe-Lösung                                   | 20 % (v/v) Ethanol, 10 % (v/v) Essigsäure   |
| Färbelösung                                       | Ethidiumbromid in 1X TAE-Puffer (unbekannte Konzentration)  |
| GeneRuler 1kb DNA ladder (SM0312)                 | 10 mM Tris-HCl (pH 7.6), 0.03 % (w/v) Bromphenolblau, 0.03 % (w/v) Xylencyanol FF, 0.15 % (w/v) orange G, 60 % (v/v) glycerol, 60 mM EDTA         |
| Kristallisationspuffer A                          | 10 mM Tris pH 8.1, 200 mM NaCl, 20 mM MgCl <sub>2</sub> , 1 mM DTT  |
| Kristallisationspuffer B                          | 50 mM Tris pH 8.1, 500 mM NaCl, 20 mM MgCl <sub>2</sub> , 2 mM DTT  |
| Lagerpuffer                                       | 50 mM Tris-HCl (pH 8.9), 100 mM NaCl, 10 mM DTT, 50 % Glycerin  |
| Lysepuffer  | 50 mM Tris-HCl (pH 8), 20 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1 mM DTT  |
| PageRuler™ Plus prestained protein ladder (26619) | 62.5 mmol Tris-H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (pH 7.5), 1 mmol EDTA, 2 % (w/v) SDS, 10 mmol DTT, 1 mmol NaN <sub>3</sub> und 33 % (v/v) Glycerin  |
| Resuspendierungspuffer                            | 100 mM Tris-HCl (pH 8), 150 mM NaCl, 10 mM Imidazol   |
| Sammelgel   | 2975 µL VE-H <sub>2</sub> O, 1250 µL 0.5 M Tris (pH 6.8), 50 µL 10 % (w/v) SDS, 670 µL 30 % (w/v) Acrylamid, 50 µL 10 % (w/v) APS, 5 µL TEMED     |
| Trenngel  | 4800 µL VE-H <sub>2</sub> O, 3900 µL 1.5 M Tris (pH 8,8), 150 µL 10 % (w/v) SDS, 6000 µL 30 % (w/v) Acrylamid, 150 µL 10 % (w/v) APS, 15 µL TEMED |

## 5.1.8 Kommerziell erhältliche Kits

Tabelle 21: verwendete kommerziell erhältliche Kits.

| Kit-Bezeichnung                              | Hersteller        |
|--|-------------------|
| Additive Screen HT                           | Hampton Research  |
| Classics I Suite                             | NeXtal Biotech    |
| Gel Filtration Markers Kit 12,000-200,000 Da | Sigma/Merck       |
| GeneJet PCR Purification Kit                 | Thermo Scientific |
| JCSG Core + Suite                            | NeXtal Biotech    |
| JCSG Core I-IV Suite                         | NeXtal Biotech    |
| Monarch DNA & PCR Clean-up Kit               | NEB               |
| Monarch DNA Gel Extraction Kit               | NEB               |
| Monarch Plasmid Miniprep Kit                 | NEB               |
| Nucleix Suite                                | NeXtal Biotech    |
| NucleoBond Xtra Maxi Kit                     | Macherey-Nagel    |
| NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Maxi Kit     | Macherey-Nagel    |
| NucleoSpin Plasmid Mini Kit                  | Macherey-Nagel    |
| PACT Suite                                   | NeXtal Biotech    |
| PEGs I Suite                                 | NeXtal Biotech    |
| QIAPrep Miniprep Spin Kit                    | Qiagen            |

## 5.1.9 Primer

Tabelle 22: In dieser Arbeit verwendete DNA und RNA Oligonukleotide.

| Bezeichnung      | Sequenz (5' → 3')  |
|------------------|--|
| DH_S55F_Fw       | GCACGCTTCCGCAAGATGTTTGAGCGTCAACTTAAAGCTGGTGAGGTTGC   |
| DH_S55F_Rev      | GCAACCTCACCAGCTTTAAGTTGACGCTCAAACATCTTGCGGAAGCGTGC   |
| DH_Xa_Fw         | CGCATCACCATCACCATCACATCGAGGGCCGAATGAACACGATTAACATCGCTAAGAA<br>CG   |
| DH_Xa_Rev        | CGTTCCTAGCGATGTTAATCGTGTTTCATTCCGGCCCTCGATGTGATGGTGATGGTGATGC<br>G   |
| FW_AK_SB3V1_Smal | GCTGCAAAAGAACCCGGGGCATTATGC  |
| FW_DH_QC_SB10    | GCATTGGGTAACCTCCCGGGGTTTCCCTGTGTGGCAGG   |
| FW_DH_QC_SB5X    | GGTCGCGCGGTTAACTTGCTTCCCGGGGAAACCGTTCAGGAC   |
| FW_DH_QC_SB6     | GCAAAGTGTGCGGGTCCCGGGAAGGTTCCGTTCCCTGAGC   |
| FW_DH_QC_SB7     | GGTGGGCTGAGCAACCCGGGCCGTTCTGCTTCCTTGCG   |
| FW_DH_QC_SB8     | GCCAGCTATTGATTCCGCAAGGGTCCCGGGTCACTCAGCCG  |
| FW_DH_QC_SB9     | GCTGAGGTCAAAGATAAGCCCGGGGAGAGATTCTTCGCAAGCG  |
| FW_Myo6_18AS     | GCGGAAAATATCGATGAAGCTGCAAAGAATTGAAGCAGCAGGAGGAAGAGGCAGA<br>GCGCCTTCGCCCATCCAGGAGGAGATGGAAAAAGCATTATGCAAGTTGTCGAGGCT<br>GACATGC |
| FW_Myo6_8AS      | GCGGAAAATATCGATGAAGCTGCAAAGAATTGAAACAGCAGGAGGAAGAAGCGGA<br>GAAAGCATTATGCAAGTTGTCGAGGCTGACATGC                                  |
| FW_QC_SB11       | GCCTAACCAAGTCCCGGGAATACAACCGTTCAGGC  |
| FW_QC_SB12       | CCGCCAAAATGCTGGCCCCGGGGTCAAGACTCTGAGACTATCG  |
| FW_QC_WT-Ala234  | CACCGCCAAAATGCTGGCGTAGTAGG   |
| FW_RFC_2xLOV     | GCTGCAAAAGAATTGAAGCTGGCGACCACC   |
| FW_RFC_DH_SB2    | GAGGTTGCGGATAAGCTGGCGACCACCCTGGAACGCATTGAA   |
| FW_RFC_DH_SB3    | CACGTCTACAAGAAGCTGGCGACCACCCTGGAACGCATTGAA   |
| FW_RFC_DH_SB4    | GTGACCGATGAGAAGCTGGCGACCACCCTGGAACGCATTGAA   |
| FW_RFC_mApple    | GCC CAC CCC GGC TTA TCG AAA TTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG  |
| FW_RFC_SB11V1    | GCCTAACCAAGTCTAAGCTGGCGACCACCCTGG  |

Tabelle 22: In dieser Arbeit verwendete DNA und RNA Oligonukleotide (Fortsetzung).

| Bezeichnung        | Sequenz (5' → 3')   |
|--------------------|---|
| FW_RFC_SB12V1      | CCAAAATGCTGGCGTAAAGCTGGCGACCACC   |
| FW_RFC_SB3V1_GPP2  | GCTGCAAAGAATTGGGGCTCCGGTCCCCCTAAAGCATTTATGC   |
| FW_RFC_SB4         | CGAAGTAGTTACCGTGACCGATGAGAAGCTGGCCACCACTCTAGAGC   |
| FW_RFC_SK_SB10V1   | GGGTAACCTAAGCTGGCGACCACCCTGGAACGC   |
| FW_RFC_SK_SB5V1*   | GGTAACTTGCTTCTAAGCTGGCGACCACCCTGG   |
| FW_RFC_SK_SB6V1    | CTGTGCGGGTGTCAAGCTGGCGACCACCCTGGAACGC   |
| FW_RFC_SK_SB7V1    | GCTGAGCAAGATAAGCTGGCGACCACCCTGGAACGC  |
| FW_RFC_DH_SB8V1    | GATTCGGCAAGGGTCTGAAGCTGGCGACCACCCTGGAACGC   |
| FW_RFC_SK_SB9V1    | GGTCAAAGATAAGAAGAAGCTGGCGACCACCCTGGAACGC  |
| FW_T7_TEV          | CGCATCACCATCACCATCACGAAAACCTTATTTTCAGGGGATGAACA<br>CGATTAACATCGCTAAGAACG  |
| LOV_C450A_FW       | CTGGGCCGCAACGCCGCTTCTCTGCAG   |
| LOV_C450A_RV       | CTGCAGGAAGCGGGCGTTGCGGCCAG  |
| PQE30PROM          | CCCAAAAGTGCCACCTG   |
| REV_T7_TEV         | CGTTCTTAGCGATGTTAATCGTGTTTCATCCCCTGAAAATAGAGGTTTT<br>CGTGATGGTGTGGTGTATGCG  |
| RV_AK_SB3V1_Smal   | GCATAAATGCCCGGGTCTTTTGCAGC  |
| RV_DH_QC_SB10      | CCTGCCACACAGGGAAACCCCGGGAGTTACCCAATGC   |
| RV_DH_QC_SB5X      | GTCCTGAACGTTTTCCCGGGAAGCAAGTTAACCGCGCGACC   |
| RV_DH_QC_SB6       | GCTCAGGGAAACGGAACCTTCCCGGACCCGCACAGTTTGC  |
| RV_DH_QC_SB7       | CGCAAGGAAGCAGAACGGCCCGGGTTGCTCAGCCACC   |
| RV_DH_QC_SB8       | CGGCTGAGTGAACCCGGACCTTGCCGGAATCAATAGCTGGC   |
| RV_DH_QC_SB9       | CGCTTGCGAAGAATCTCTCCCGGGCTTATCTTTGACCTCAGC  |
| RV_Myo6_18AS       | GCATGTCAGCCTCGACAACCTGCATAAATGCTTTTTCCATCTCCTCTGGATGCGGCG<br>AAGGCGCTCTGCCTCTTCTCTGCTGCTTCAATTCTTTGCAGCTTCATCGATATTTTC<br>CGC |
| RV_Myo6_8AS        | GCATGTCAGCCTCGACAACCTGCATAAATGCTTTCTCCGCTTCTTCTCTCTGCTGTTTC<br>AATTCTTTGCAGCTTCATCGATATTTCCGC                                 |
| RV_QC_SB11         | GCCTGAACGGTTGTATTCCCGGGACTGGTTAGGC  |
| RV_QC_SB12         | CGATAGTCTCAGAGTCTTGACCCCGGGGCCAGCATTTTGCGG  |
| RV_QC_WT-Ala234    | CCTACTACGCCAGCATTTTGCGGGT   |
| RV_RFC_DH_SB2V1    | GGCGGCAGCGTTCAATTCTTTTGCAGCTTCATCGATATTTCCGC  |
| RV_RFC_DH_SB3V1    | CATAAATGCTTTCAATTCTTTTGCAGCTTCATCGATATTTCCGCGGT   |
| RV_RFC_DH_SB4V1    | TTACCAGTGTTCATTCTTTTGCAGCTTCATCGATATTTTC  |
| RV_RFC_mApple      | GGATCGAGCCCGGGCCTTACTTGTACAGCTCGTCC   |
| RV_RFC_SB11V1      | CGGTTGTATTGTCCAATTCTTTTGCAGCTTCATCGATATTTCCGCG  |
| RV_RFC_SB12V1      | CGATAGTCTCAGAGTCTTGACCTACCAATTCTTTTGCAGCTTCATCG   |
| RV_RFC_SB3V1_GPP2  | GCATAAATGCTTTAGGGGGACCCGGAGGCCCAATTCTTTTGCAGC   |
| RV_RFC_SK_SB10V1   | GGGAAACCATCCAATTCTTTTGCAGCTTCATCGATATTTCCGCGG   |
| RV_RFC_SK_SB5V1*   | CCTGAACGTTTTCACTCAATTCTTTTGCAGCTTCATCGATATTTCCGCGG  |
| RV_RFC_SK_SB6V1    | CGGAACCTTATCCAATTCTTTTGCAGCTTCATCGATATTTCCGCGG  |
| RV_RFC_SK_SB7V1    | GCAGAACGGAGACAATTCTTTTGCAGCTTCATCGATATTTCCGCGG  |
| RV_RFC_DH_SB8V1    | GCCTGATTCGGCTGAGTGAACATCAATTCTTTTGCAGCTTCATCGATATTTCCGCGG   |
| RV_RFC_SK_SB9V1    | CGAAGAATCTCTCCAGTCAATTCTTTTGCAGCTTCATCGATATTTCCGCGG   |
| RV_RFV_SB4         | GCTTGACTTTCTCAGAGATTTACCAGTGTCTCGGCGGTCTTCTTGATCAGCATCAC  |
| SB4V1_His_in_Arg_F | CGGAAACCGATCGCGCACCGTGCGCAAAATTCGCGATGCG  |
| SB4V1_His_in_Arg_R | CGCATCGCAATTTTGCACGCGTGCGCGATCGGTTCCG   |
| T7_IC_Prom_Primer  | CTTCTATAGTGAGTCGTATTA   |
| T7_IC_Promoter     | TAATACGACTCACTATA   |
| T7RP_EL_Templat    | GGGAATCGACATCGCCGC  |
| T7RP-EL-Primer     | GTCGATTCCC  |
| T7RP-EL-RNA        | AACUGCGGCGAU  |
| TaLo3              | TTGTCAGCACTGGTTAGG  |

Tabelle 22: In dieser Arbeit verwendete DNA und RNA Oligonukleotide (Fortsetzung).

| Bezeichnung | Sequenz (5' → 3')  |
|-------------|--------------------|
| TaLo4       | GCGTTCTGCTTTGAGTAC |
| TaLo5       | CCGCTGCTGTGTACC    |
| TaLo6       | CGCTGAGGCTATCGCA   |
| TaLo7       | GCAAGAAATCAAGCCG   |
| TaUp6       | GGTTGGAACATCGGAG   |

### 5.1.10 Software

Tabelle 23: Verwendete Programme zur Analyse von Daten.

| Programm                                | Version             | Verwendungszweck   |
|---|---------------------|--|
| Adobe Photoshop CS4                     | 11.0                | Überarbeitung von Abbildungen  |
| AlphaFold 2 <sup>[129]</sup>            | ColabFold<br>v1.5.5 | Modellierung der photoaktiven Varianten  |
| AlphaFold 3 <sup>[130]</sup>            | -                   | Modellierung der Initiations- und Elongationskomplexe der Fusionsproteine        |
| BioEdit <sup>[152]</sup>                | 7.2.5               | Sequenzalignment   |
| ChemDraw                                | 22.0.0.22           | Zeichnen von Strukturformeln   |
| CMView <sup>[109]</sup>                 | 1.1.1               | Erstellen der Kontaktkarte zwischen den AS                                       |
| DeepL Write                             | -                   | Überprüfung von Rechtschreibung und Grammatik                                    |
| Endnote                                 | X7.8                | Literaturverwaltung, Zitation  |
| ImageJ <sup>[112]</sup>                 | 1.54g               | Auswertung von Agarosegelbildern, Quantifizierung von RNA                        |
| Mistic Webserver <sup>[105]</sup>       | -                   | Berechnung der evolutiven Konservierung  |
| Moba XTerm                              | 23.0                | Konsole zur Verwendung von XDS und Phenix  |
| Origin Pro 2023 <sup>[96]</sup>         | 10.0.0.154          | Datenverwaltung  |
| Phenix <sup>[140]</sup>                 | 1.21.1              | Molekularer Ersatz und Refinement  |
| PyMol <sup>[97]</sup>                   | 2.5.4               | 3D-Strukturanalysen, Proteinabbildungen  |
| SnapGene Viewer <sup>[153]</sup>        | 7.2.1               | Analyse von Plasmidsequenzen, Erstellen von Plasmidkarten                        |
| Stride <sup>[108]</sup>                 | -                   | Bestimmung der lösemittelzugänglichen Fläche der AS                              |
| WinCoot <sup>[154]</sup>                | 0.9.8.7             | Manuelles Refinement von Kristallstrukturen                                      |
| XDS <sup>[139]</sup>                    | -                   | Prozessierung von Diffraktionsdaten  |
| Xtal-Pred-RF-Webserver <sup>[150]</sup> | -                   | Vorhersage der Kristallisierbarkeit und Anzeige ungeordneter Bereiche im Protein |

### 5.1.11 AF2-Parameter

Tabelle 24: Parameter der AF2-Modellierungen.

| Modus                        | Einstellungen      |
|------------------------------|--------------------|
| Msa_mode                     | mmseqs2_uniref_env |
| Pair_mode                    | unpaired_paired    |
| Model_type                   | auto               |
| Num_recycles                 | 3                  |
| Recycle_early_stop_tolerance | auto               |
| Relax_max_iterations         | 200                |
| Parinig_strategy             | greedy             |
| Max_msa                      | auto               |
| Num_seeds                    | 1                  |
| Rank_num                     | 1                  |
| Color                        | IDDT               |

## 5.2 Methoden

Im Folgenden werden die angewandten mikrobiologischen, molekularbiologischen und proteinbiochemischen Methoden im Detail beschrieben.

### 5.2.1 Mikrobiologische Methoden

#### 5.2.1.1 Kultivierung

Die Kultivierung von Bakterien auf festen Nährmedien erfolgte über Nacht bei 37 °C im Inkubationsschrank unter Zugabe von Antibiotika zur Selektion. Die Inkubation der Flüssigkulturen erfolgte in LB-Medium im Schüttelinkubator bei 37 °C und einer Schüttelrate von 140–180 rpm über einen definierten Zeitraum, der zwischen vier Stunden und einer Nacht variierte.

#### 5.2.1.2 Herstellung elektrokompetenter Zellen

Im Folgenden wird die Herstellung elektrokompetenter Zellen für eine Transformation detailliert erläutert. Eine 250 mL-Kultur wurde mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt und mit frischer Übernachtskultur beimpft (1:50, 5 mL). Die Kultur wurde bei 160 rpm und 37 °C bis zu einer optischen Dichte von  $OD_{600} \approx 0.3$  inkubiert und im Anschluss für 30 Minuten auf Eis gekühlt. Die Zellen wurden in vier Zentrifugenröhrchen (à 50 mL) bei 4 °C und 5000 rpm für 15 Minuten geerntet, die Überstände verworfen und die Pellets in jeweils 15 mL 10 %-igem Glycerin resuspendiert. Dieser Vorgang wurde erneut durchgeführt, wobei jeweils zwei Pellets vereint wurden. Nach erneuter Zentrifugation (5.000 g, 4 °C, 15 Minuten) wurden beide Pellets in 2.5 ml 10 %-igem Glycerin aufgenommen und in ca. 25 Portionen à 100 µL aliquotiert. Die elektrokompetenten Zellen wurden bis zur Verwendung bei –80 °C gelagert.

#### 5.2.1.3 Transformation elektrokompetenter Zellen

Die molekularbiologisch modifizierte Plasmid-DNA wurde mittels Elektroporation in *E.-coli*-Zellen transferiert. Dazu wurden  $\leq 1$  ng Plasmid-DNA zu den entsprechenden Zellen (XL1-Blue, BL21[pRep4], BL21[pAlter\_mApple], BL21[pRep4\_mApple\_RBS]) gegeben. Im Anschluss wurde das DNA-Zell-Gemisch in eine auf 4 °C gekühlte Elektroporationsküvette (1 mm Spaltbreite) gegeben und einem Spannungspuls von 1800 V ausgesetzt. Danach wurde das Gemisch in einem Milliliter auf 37 °C vorgewärmten SOC-Medium aufgenommen und für eine Stunde bei 37 °C inkubiert (Thermoschüttler). In der Folge wurden die Zellen auf festem Medium ausgestrichen, welches Antibiotika zur Selektion enthielt (LB-Agar). Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37 °C.

## 5.2.2 Molekularbiologische Methoden

### 5.2.2.1 Plasmidpräparationen

Die durchgeführten Plasmidpräparationen wurden nach Herstellerangaben (NEB, Qiagen, Macherey-Nagel) aus Zellen des Stammes *E. coli* XL1-Blue gewonnen. Die Elution der Plasmid-DNA erfolgte mit Elutionspuffer bzw. dd H<sub>2</sub>O.

### 5.2.2.2 Restriktion

Ein Restriktionsverdau wurde in der Regel im Maßstab von 20 µL durchgeführt. Nur die Restriktion des Plasmids pAlterGC wurde in größerem Maßstab durchgeführt (1 mL, 100 µg DNA), da für die *in-vitro*-Transkriptionsreaktionen große Mengen an linearisiertem Plasmid benötigt wurden. In Tabelle 25 ist eine beispielhafte Zusammensetzung aufgeführt.

Tabelle 25: Allgemeine Zusammensetzung eines Restriktionsverdau.

| Bezeichnung         | Konzentration | Volumen[µL]         |
|---------------------|---------------|---------------------|
| 10x Reaktionspuffer | -             | 2                   |
| Restriktionsenzym   | 10 U/µL       | 1                   |
| DNA                 | 250 ng/µL     | 4                   |
| dd H <sub>2</sub> O | -             | Auffüllen auf 20 µL |

Die Restriktion wurde je nach Enzym bei einer Temperatur von 30 bis 37 °C über einen Zeitraum von einer Stunde durchgeführt. Die Restriktion des Plasmids pAlterGC mit *Hind*III-HF® erfolgte ausschließlich über Nacht. Im Anschluss wurde das Restriktionsenzym für einen Zeitraum von 20 Minuten bei 65 °C oder 80 °C inaktiviert und die DNA bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

### 5.2.2.3 Phenol-Chloroform-Extraktion

Zur Aufreinigung des linearisierten Plasmids pAlterGC<sup>[95]</sup> wurde eine Phenol-Chloroform-Extraktion durchgeführt. Dazu wurden bis zu sechs Ansätze (je 1 mL, je 100 µg Plasmid-DNA) vereint und mit einem Äquivalent Roti Aqua-P/C/I (Carl Roth) versetzt. Nach gründlichem Mischen (vortexen, 30 s) wurde das Gemisch zur besseren Phasentrennung zentrifugiert (5000 rpm, 4 °C, 15 min) und die obere, wässrige Phase in neue Gefäße überführt. Dieser Vorgang wurde anschließend zweimal wiederholt. Zuletzt wurde der wässrigen Phase ein Äquivalent Chloroform zugesetzt, um eventuell vorhandenes Phenol aus der DNA-Lösung zu extrahieren. Das Gemisch wurde gevortext, zentrifugiert (5000 rpm, 4 °C, 15 min) und die obere, wässrige Phase in neue Gefäße überführt. Nach der Phenol-Chloroform-Extraktion erfolgte eine Ethanol-fällung (Abschnitt 5.2.2.4) zur Abtrennung des Restriktionspuffers und zur Aufkonzentrierung des linearisierten Plasmids.

#### 5.2.2.4 DNA-Ethanolfällung

Nach Abschluss der Phenol-Chloroform-Extraktion wurden der wässrigen Phase eine NaOAc-Lösung (3 M, 10 % (v/v)) sowie Ethanol (reinst, 250 % (v/v)) hinzugefügt. Nach dem Mischen durch Invertieren wurde die Lösung für eine Stunde bei  $-20\text{ °C}$  gelagert. Die präzipitierte DNA wurde durch Zentrifugation vom Überstand abgetrennt (5000 rpm,  $4\text{ °C}$ , 15 min) und das Pellet mit 5 mL 70 %-igem Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (5000 rpm,  $4\text{ °C}$ , 15 min) wurde der Überstand verworfen, das Pellet für ungefähr fünf Minuten bei RT getrocknet und anschließend in 3 mL DEPC- $\text{H}_2\text{O}$  gelöst. Die DNA wurde danach bis zur weiteren Verwendung bei  $-20\text{ °C}$  gelagert.

#### 5.2.2.5 Polymerasekettenreaktion – PCR

Die Polymerasekettenreaktion wurde zur Amplifikation von DNA-Segmenten (z.B. sog. „Megaprimer“) verwendet. Diese Reaktionen wurden im 50  $\mu\text{L}$ -Maßstab in folgender Zusammensetzung durchgeführt (Tabelle 26).

Tabelle 26: Zusammensetzung eines Standardansatzes zur Amplifikation von DNA.

| Bezeichnung                   | Konzentration          | Volumen[ $\mu\text{L}$ ]       |
|-------------------------------|------------------------|--------------------------------|
| 10x Phusion Polymerase Puffer | -                      | 5                              |
| Forward-Primer                | 10 pmol/ $\mu\text{L}$ | 2.5                            |
| Reversed-Primer               | 10 pmol/ $\mu\text{L}$ | 2.5                            |
| dNTP-Mix                      | 10 mM/dNTP             | 1                              |
| Plasmid-DNA                   | 100 ng/ $\mu\text{L}$  | 1                              |
| Phusion Polymerase            | Arbeitskonzentration   | 1                              |
| dd $\text{H}_2\text{O}$       | -                      | Auffüllen auf 50 $\mu\text{L}$ |

Die Polymerasekettenreaktion wurde in einem Thermocycler durchgeführt. Die Zyklen, Temperaturen und Zeitangaben sind in Tabelle 27 aufgeführt.

Tabelle 27: verwendete PCR-Parameter.

| Zyklen | Temperatur T[ $^{\circ}\text{C}$ ] | Zeit t[s] |
|--------|------------------------------------|-----------|
| 1      | 95                                 | 120       |
| 30     | 95                                 | 30        |
|        | 58                                 | 60        |
|        | 68                                 | 30        |
| 1      | 68                                 | 300       |

Die Aufreinigung der amplifizierten Gensequenzen erfolgte mit kommerziell erhältlichen Kits (GeneJet PCR Purification Kit, Thermo Scientific oder NEB Monarch DNA & PCR Cleanup Kit) nach Herstellerangaben. Das Ergebnis wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert und die DNA bis zur weiteren Verwendung bei  $-20\text{ °C}$  gelagert.

### 5.2.2.6 Restriktionsfreie Klonierung – RFC

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die restriktionsfreie Klonierung, eine spezielle Form der PCR,<sup>[88]</sup> eingesetzt, um DNA-Fragmente mit einer Länge von 400 bis 900 bp in ein Plasmid zu insertieren. Die zu insertierende Sequenz wurde zunächst mittels PCR amplifiziert (vgl. Abschnitt PCR), während das Zielplasmid parallel dazu durch Restriktionsverdau linearisiert wurde (vgl. Abschnitt Restriktion). Im Anschluss wurden beide Reaktionen analysiert (AGE und Photometrie) und in einem nachfolgenden Reaktionsansatz in einer PCR eingesetzt (vgl. Tabelle 28).

Tabelle 28: Reaktionsansatz einer Standard-RFC-PCR.

| Bezeichnung                   | Volumen[ $\mu\text{L}$ ]       | Stoffmengen  |
|-------------------------------|--------------------------------|--------------|
| 10x Phusion Polymerase Puffer | 5                              | -            |
| DMSO                          | 1.5                            | -            |
| dNTP-Mix                      | 1                              | 10 nmol/dNTP |
| Linearisiertes Zielplasmid    | 4                              | 0.025 pmol   |
| Megaprimer                    | 4                              | 0.9 pmol     |
| Phusion Polymerase            | 0.5                            | -            |
| dd H <sub>2</sub> O           | Auffüllen auf 50 $\mu\text{L}$ | -            |

Die restriktionsfreie Klonierung wurde in einem Thermocycler durchgeführt. Die Zyklen, Temperaturen und Zeitangaben sind in Tabelle 29 aufgeführt.

Tabelle 29: In der RFC-PCR verwendete Zyklusparameter.

| Zyklen | Temperatur T[ $^{\circ}\text{C}$ ] | Zeit t[s] |
|--------|------------------------------------|-----------|
| 1      | 98                                 | 30        |
|        | 98                                 | 8         |
| 30     | 55                                 | 20        |
|        | 72                                 | 180       |
| 1      | 72                                 | 300       |

Zuletzt wurde ein Mikroliter *DpnI* (10 U/ $\mu\text{L}$ ) zur Reaktion gegeben, um die DNA des Ausgangsplasmids für eine Stunde bei 37  $^{\circ}\text{C}$  zu verdauen. Anschließend wurde das Restriktionsenzym für 20 Minuten bei 80  $^{\circ}\text{C}$  thermisch inaktiviert, das Ergebnis mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert und die DNA bis zur weiteren Verwendung bei -20  $^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 5.2.2.7 Quikchange-Polymerasekettenreaktion – QC-PCR

Die Quikchange-PCR dient dem Austausch einer oder mehrerer Basen, z. B. der Insertion einer Restriktionsschnittstelle oder der Rück-Mutation von Punktmutationen. Hier wurde die Plasmid-DNA mit den entsprechenden Oligonukleotiden (Tabelle 22) im folgenden Reaktionsansatz eingesetzt (Tabelle 30).

Tabelle 30: Reaktionsansatz einer QC-PCR.

| Bezeichnung                   | Volumen[ $\mu\text{L}$ ]       | Stoffmengen  |
|-------------------------------|--------------------------------|--------------|
| 10x Phusion Polymerase Puffer | 5                              | -            |
| dNTP-Mix                      | 1                              | 10 nmol/dNTP |
| Template-DNA                  | 1                              | 0.013 pmol   |
| Forward Primer                | 1                              | 10 pmol      |
| Reversed-Primer               | 1                              | 10 pmol      |
| Phusion Polymerase            | 1                              | -            |
| dd H <sub>2</sub> O           | Auffüllen auf 50 $\mu\text{L}$ | -            |

Die Quikchange-PCR wurde in einem Thermocycler nach dem Protokoll der Firma Agilent (QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit) durchgeführt. Die Zyklen, Temperaturen und Zeitangaben sind in Tabelle 31 aufgeführt.

Tabelle 31: In der QC-PCR verwendete Parameter.

| Zyklen | Temperatur T[ $^{\circ}\text{C}$ ]     | Zeit t[s]            |
|--------|--|----------------------|
| 1      | 95                                     | 30                   |
|        | 95                                     | 30                   |
| 15     | 50-68 (je nach Primer T <sub>m</sub> ) | 60                   |
|        | 68                                     | 60 s/1000 bp (390 s) |

Zuletzt wurde ein Mikroliter *DpnI* (10 U/ $\mu\text{L}$ ) zur Reaktion gegeben, um die DNA des Ausgangsplasmids für eine Stunde bei 37  $^{\circ}\text{C}$  zu verdauen. Anschließend wurde das Restriktionsenzym für 20 Minuten bei 80  $^{\circ}\text{C}$  thermisch inaktiviert, das Ergebnis mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert und die DNA bis zur weiteren Verwendung bei -20  $^{\circ}\text{C}$  gelagert.

#### 5.2.2.8 Agarose-Gelelektrophorese – AGE

Zur Analyse der modifizierten Plasmide sowie der amplifizierten Gene wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Dafür wurden DNA ( $\geq 50$  ng), Ladepuffer (2  $\mu\text{L}$  6x Ladepuffer) und Wasser (12  $\mu\text{L}$  Gesamtvolumen) gemischt und 10  $\mu\text{L}$  der Mischung auf ein Agarosegel aufgetragen (1 % Agarose in 1x TAE-Puffer). Zur Bestimmung der Länge der aufgetragenen Nukleinsäuren wurde ein Marker als Standard verwendet (3  $\mu\text{L}$  GeneRuler 1 kb DNA-Leiter). Im Anschluss wurde eine konstante Stromstärke von 50–60 mA für 50–60 Minuten angelegt. Daraufhin wurde das Agarosegel mit Ethidiumbromid angefärbt, im Wasserbad entfärbt und unter UV-Licht dokumentiert.

#### 5.2.2.9 Denaturierende Agarose-Gelelektrophorese – Bleichgele

Zur Analyse von *in-vitro*-Transkriptionsreaktionen wurde der Agaroselösung (siehe Abschnitt 5.2.2.8) eine NaOCl-Lösung (0.2 % (v/v), 12 % Endkonzentration) zugesetzt, durch die Sekundärstrukturen der mRNA aufgelöst und RNAsen inaktiviert wurden. Im Anschluss wurde für eine Stunde eine konstante Stromstärke von 60 mA angelegt und das Bleichgel mit Ethidiumbromid angefärbt, im Wasserbad entfärbt und unter UV-Licht dokumentiert.

### 5.2.2.10 Sequenzanalyse von DNA

Sequenzanalysen wurden von der Firma Microsynth durchgeführt. Dazu wurden 12 µL Plasmid-DNA (80–100 ng/µL) mit 3 µL Sequenzierprimer (20 pmol/µL) gemischt und versandt. Die Ergebnisse der Sequenzierung wurden mit dem Programm SnapGene Viewer 5.0.8<sup>[153]</sup> analysiert und ein Alignment der Sequenzen mit dem Programm BioEdit Sequence Alignment Editor<sup>[152]</sup> ausgewertet.

### 5.2.2.11 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren und Proteinen

Die Konzentrationen von Nukleinsäuren und Proteinen wurden spektralphotometerisch bestimmt (NanoDrop 2000; Evolution201; Thermo Scientific; Tabelle 14). Für Nukleinsäuren wurden die Absorptionen bei den Wellenlängen 230 nm, 260 nm und 280 nm gemessen und die Konzentration nach **Gleichung 2** berechnet.

$$c \left[ \frac{ng}{\mu L} \right] = A_{260} * 50 \frac{ng}{\mu L} * VF \quad (2)$$

VF: Verdünnungsfaktor der Probe

Die Konzentrationen der Proteinlösungen wurden nach dem *Lambert–Beer'schen Gesetz* (**Gl. 3**) bestimmt.

$$E_a = \log_{10} \left( \frac{I_0}{I_1} \right) = A_{260} = \varepsilon_{\lambda} * c * d \quad (3)$$

Mit  $I_0$ : Intensität des eingestrahnten Lichtes

$I_1$ : Intensität des Lichtes nach Durchgang durch die Probe

c: Stoffmengenkonzentration des Proteins

$\varepsilon_{\lambda}$ : molarer dekadischer Extinktionskoeffizient

d: Schichtdicke der Probe

## 5.2.3 Proteinbiochemische Methoden

### 5.2.3.1 Heterologe Expression

Die in *E. coli* BL21[pRep4] eingebrachten Plasmide wurden zunächst in Übernachtskulturen bei 30 °C kultiviert und die Expressionskulturen von bis zu vier Litern mit der Übernachtskultur beimpft (2 % (v/v)). Die Kulturen wurden bei 30 °C oder 37 °C und 140–180 rpm bis zu einer optischen Dichte  $OD_{600} \approx 0.3-1$  inkubiert. Im Anschluss wurde die Überexpression der Zielproteine mit IPTG induziert (Stammlösung 1 M, 0.1 % (v/v), Endkonzentration 1 mM). Die Proteine wurden entweder für vier Stunden bei 37 °C oder über Nacht bei einer Temperatur von 18 °C und einer Geschwindigkeit von bis zu 160 rpm exprimiert. Im Anschluss wurden die Zellen geerntet (5000 rpm, 4 °C, 15 min) und die gewonnenen Pellets bis zur Aufreinigung der Proteine bei einer Temperatur von –20 °C gelagert.

### 5.2.3.2 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese SDS-PAGE

Die zuvor vorbereiteten SDS-Gele (vgl. Tabelle 20, Sammel- und Trenngel) wurden in eine dafür vorgesehene Apparatur eingespannt und diese wurde mit 1x SDS-Laufpuffer befüllt (vgl. Tabelle 20). Die im Rahmen der Proteinaufreinigung entnommenen Proben (40 µL Lösung), wurden mit jeweils 10 µL 5x SDS-Probenpuffer versetzt und für einen Zeitraum von fünf Minuten auf eine Temperatur von 100 °C erhitzt. Es wurden bis zu 20 µL je Probe in die Geltaschen pipettiert. Als Längenstandard wurden 3 µL des PageRuler Plus *prestained protein ladder* (10–250 kDa, Thermo Scientific) auf das Gel aufgetragen und das beladene Gel einer konstanten Stromstärke von 40 mA/Gel für eine Expositionszeit von 30 bis 40 Minuten ausgesetzt. Anschließend wurden die Gele in einer leicht essigsäuren, alkoholischen Coomassie-Brilliantblau G-250-Lösung gefärbt. Im Anschluss wurden die Gele zweimal in der Lösung zum Entfärben der Gele (vgl. Tabelle 20) erhitzt und jeweils für ca. 10 Minuten geschüttelt. Zuletzt wurden die Gele in Wasser erhitzt und unter Schütteln bis zum gewünschten Punkt entfärbt. Die Dokumentation der SDS-Gele erfolgte mithilfe eines Flachbett-Scanners.

### 5.2.3.3 Zelllyse

Zur Lyse der Zellen wurden die erhaltenen Pellets langsam aufgetaut und in einem Volumen von 5 mL/g Biofeuchtmasse (BFM) Lysepuffer resuspendiert. Anschließend wurden der Zellsuspension 1.5 mL/g BFM Lysozym (1.5 mg/mL in Lysepuffer) sowie 12.5 mL/g BFM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF, 20 mg/mL in *i*PrOH) zugesetzt. Im Anschluss wurde die Zellsuspension in einen Hochdruckhomogenisator überführt, wo die Zellen in drei bis fünf Zyklen gemäß den Angaben in der Bedienungsanleitung aufgeschlossen wurden.

#### 5.2.3.4 PEI- und $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Fällungen

Das hier verwendete Aufreinigungsverfahren für T7-RNAP basiert auf einer modifizierten Variante des Verfahrens nach Grodberg und Dunn.<sup>[81]</sup> Dafür wurde die bei der Zellyse erhaltene Suspension zunächst bei 0 °C gerührt, während dem Reaktionsgemisch langsam eine 2 M Ammoniumsulfat-Lösung zugegeben wurde (1.25 mL/g BFM). Die Farbe der Lösung blieb während dieses Vorgangs unverändert. Anschließend wurde eine 10 %-ige PEI-Lösung (pH 8, 1.25 mL/g BFM) zugegeben und die Suspension für weitere 20 min bei 0 °C gerührt. In diesem Schritt erfolgt eine Fällung von Nukleinsäuren und anderen Polyanionen aus dem Gemisch. Der erfolgreiche Ablauf dieses Schrittes ist an der Ausfällung eines weißen Feststoffes erkennbar. Im Anschluss wurde die nun weiße Suspension zentrifugiert (39000 g, 15 min, 4 °C), so dass eine klare, braungelbe Lösung als Überstand vom Sediment abgetrennt werden konnte. Der Überstand wurde erneut bei 0 °C gerührt und mit 0.82 Volumina gesättigter  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung (pH 7) versetzt. Anschließend wurde das Gemisch für 15 Minuten bei einer Temperatur von 0 °C gerührt. Dabei wurden zelleigene Proteine und das gewünschte Protein aus der Lösung ausgefällt. Die Bildung eines hellgrauen Feststoffs im Falle der WT-T7RNAP bzw. eines gelben Feststoffs im Falle der photoaktiven Varianten der T7-RNA-Polymerase war während dieses Prozesses zu beobachten. Im Anschluss wurde die Suspension erneut zentrifugiert (39000 g, 15 min, 4 °C) und der Überstand verworfen. Das Präzipitat wurde in 4 mL/g BFM Resuspendierungspuffer gelöst und die Lösung anschließend dialysiert.

#### 5.2.3.5 Dialyse

Die Dialyse diente dem Pufferaustausch der Proteinlösungen. Zu diesem Zweck wurde der Dialyseschlauch für 30 Minuten im entsprechenden Puffer equilibriert und die Proteinlösung in den Dialyseschlauch (MWCO 14 kDa) gefüllt. Der mit Proteinlösung gefüllte Dialyseschlauch wurde über Nacht bei 4 °C und 100 rpm dialysiert. Für die verschiedenen Anwendungen wurden unterschiedliche Herangehensweisen gewählt. Für den Austausch eines Puffers wurde eine Dialyse gegen einen Liter Puffer durchgeführt, während bei der Aufreinigung zwei aufeinanderfolgende Dialysen mit jeweils einem Liter durchgeführt wurden (Verdünnung 1:1.000.000).

#### 5.2.3.6 Ni-NTA-Chromatographie

Für die Aufreinigung der His-Tag-tragenden Proteine wurde die Nickel-Nitrilotriessigsäure-Affinitätschromatographie verwendet. Für die Durchführung wurde ein automatisiertes Säulensystem mit zwei hintereinander geschalteten Ni-NTA *Superflow Cartridges* (Qiagen, je 5 mL Ni-NTA-Agarose, *bead size* 60–160 µm, 14.7 mm x 29.8 mm) verwendet. Die Säule wurde zunächst mit fünf Säulenvolumina (SV) des Resuspendierungspuffers equilibriert. Zur Vorbereitung wurde die gelblich-bräunliche Proteinlösung zentrifugiert, um die festen Bestandteile abzutrennen (12.000 g, 30 min, 4 °C). Nach Sterilfiltration der Lösung mit einem Spritzenvorsatzfilter (0.22 µm) wurde das Proteingemisch in die 10 mL-Probenschleife des Systems injiziert (bei V > 10 mL: Applikation mit Hilfe der Pumpe).

Das Proteingemisch wurde auf die Ni-NTA-Säule aufgetragen und diese mit einem Volumen von 10 SV Waschpuffer gewaschen. Das an die Säule gebundene His-Tag-tragende Protein wurde durch einen Elutionspuffergradienten (35 mM auf 250 mM Imidazol) eluiert und in 2-mL-Fractionen gesammelt. Anschließend wurden die Fractionen auf einem Polyacrylamidgel analysiert und die proteinhaltigen Fractionen vereinigt.

#### 5.2.3.7 Proteolytische Abspaltung des Tags

Nach dem Vereinen der Elutionsfractionen wurde TEV-Protease im Verhältnis 1:50 (v/v) zu der Proteinlösung gegeben. Das Gemisch wurde dann über Nacht gegen einen Liter Resuspendierungspuffer dialysiert.

#### 5.2.3.8 Reverse Ni-NTA-Chromatographie

Die reverse Ni-NTA-Chromatographie ist eine Technik, bei der die abgespaltenen His-Tags sowie die nicht proteolytisch verdauten Proteine von erfolgreich geschnittenem Protein separiert werden. Dabei erfolgt eine Durchführung der Ni-NTA-Chromatographie unter identischen Bedingungen (s. Ni-NTA-Chromatographie). Die erfolgreich proteolytisch verdauten Proteine sind nun nicht mehr an der stationären Phase der Säule gebunden, sodass sie im Durchfluss der Chromatographie zu finden sind. Die Elutionsfractionen enthalten nun das unverdaute Protein, die His-Tag-tragende Protease und den entfernten 6x His-Tag. Die erneute Analyse der einzelnen Fractionen erfolgte unter Verwendung der SDS-PAGE. Die Fractionen des Zielproteins wurden vereinigt und mit Zentrifugalfiltern (MWCO 30 kDa) auf ein Volumen von  $V < 5$  mL konzentriert (5000 rpm, 15 min, 4 °C).

#### 5.2.3.9 Gelfiltration – Größenausschlusschromatographie (SEC)

Die Proteinlösungen wurden einer weiteren Aufreinigung durch Größenausschlusschromatographie unterzogen. Die Säule für die Gelfiltration wurde mit jeweils 180 mL (1.5 SV) des Kristallisationspuffers A bzw. B oder des Dialysepuffers equilibriert. Die konzentrierte Proteinlösung wurde mit einer Probenschleife injiziert und die Chromatographie durchgeführt (180 mL, 1.5 SV). Die Elution der gereinigten Proteine erfolgte in 1.5-ml-Fractionen. Die vereinigten Fractionen wurden abschließend auf einem Polyacrylamidgel analysiert.

#### 5.2.3.10 Thermal-Shift-Assay

Da es sich bei den hergestellten Fusionsproteinen um neue Enzyme handelte, für die keine Kristallisationsbedingungen aus der Literatur bekannt waren, wurde ein *Thermal-Shift-Assay* durchgeführt. Ziel war es, die Stabilität der Proteine im bisher für die Kristallisation des Wildtypenzym verwendeten Kristallisationspuffer A (10 mM Tris pH 8.1, 200 mM NaCl, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT) im Vergleich zu anderen Puffer- und Salzlösungen anhand der Schmelztemperatur  $T_m$  zu bestimmen.

Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben für das kommerziell erhältliche Kit Solubility & Stability Screen 2 (HR2-413) der Firma Hampton Research.

#### 5.2.3.11 DNA/RNA *annealing*

Im Vorfeld der Kristallisationsexperimente war es notwendig, die Proteine in Komplexen mit dsDNA oder DNA-RNA-Hybriden zu stabilisieren. Zu diesem Zweck mussten die Oligonukleotide zunächst konzentriert werden. Dazu wurden die benötigten Mengen an ssDNA, ssRNA oder 3'-dGTP ( $n_{\text{Prot}} : n_{\text{DNA}} = 1:1.1$ , 3'-dGTP 10 mM) in einem Reaktionsgefäß vereinigt und das Wasser in einer Vakuumzentrifuge bei einer Temperatur von 45 °C verdampft. Anschließend wurden die Nukleinsäurepellets in einem definierten Volumen des Kristallisationspuffers A bzw. B gelöst. In einem letzten Schritt wurde das Oligonukleotidgemisch für sieben Minuten auf 70 °C erhitzt und im PCR-Block mit einer Geschwindigkeit von 0.5 °C/min auf 4 °C abgekühlt.

#### 5.2.3.12 Kristallisationsscreening

Die Identifizierung geeigneter Kristallisationsbedingungen für die neuen Proteinvarianten erfolgte unter Verwendung kommerziell erhältlicher 96-Well-Screenings von NeXtal Biotech. In einem ersten Schritt wurde die Proteinlösung auf die gewünschte Endkonzentration eingeeengt und mit den hybridisierten Nukleinsäuren gemischt ( $V_{\text{Prot}} = V_{\text{Nukl.}}$ ). Nach erfolgter Komplexbildung (10 min, 0 °C) wurden die *Screenings* mit einem Pipettierroboter<sup>[142]</sup> (100 nL Komplexlösung + 100 nL Reservoirlösung) nach der *Sitting-drop*-Methode<sup>[155]</sup> angesetzt. Die Inkubation der angesetzten 96-Well-Screenings erfolgte entweder bei 4 °C oder 20 °C im Rock Imager 1000.<sup>[142]</sup> Der Kristallisationsfortschritt wurde dabei automatisch in Fibonacci-Intervallen (0, 1, 2, 3, 5, 8, 13, 21 Tage) über einen Zeitraum von drei Wochen dokumentiert.

#### 5.2.3.13 Kristallisation

Die Kristallisationsbedingungen, die in den Screenings erfolgreich waren oder bereits aus der Literatur bekannt waren, wurden in *Finescreens* weiter optimiert. Dabei wurde die *Hanging-drop*-Methode<sup>[155]</sup> angewandt. Dazu wurde die gereinigte Proteinlösung mit Zentrifugaleinheiten (MWCO 30 kDa) bis zu einer Konzentration von 40 mg/mL aufkonzentriert (5000 rpm, 4 °C, 15 min). Die Oligonukleotide wurden gemäß der zuvor beschriebenen Vorgehensweise präpariert. Anschließend erfolgte die Komplexbildung des Proteins mit den Oligonukleotiden (10 min, 0 °C). Die Kristallisation wurde auf einer 5x3-Mikrotiterplatte durchgeführt.

In die entsprechenden Reservoirs der Kristallisationsplatten wurden jeweils 500 µL der jeweiligen Reservoirlösung gegeben. Nun wurde ein Mikroliter des Protein-Nukleinsäure-Komplexes auf den Schraubdeckel des Reservoirs gegeben und mit einem Mikroliter der Reservoirlösung vermischt. Anschließend wurden die Reservoirs vorsichtig mit den Schraubdeckeln verschlossen und diese bei einer Temperatur von 20 °C oder 4 °C gelagert. Der Fortschritt wurde mikroskopisch dokumentiert.

#### 5.2.3.14 Additive Screenings

Ein Ansatz zur Optimierung der Kristallqualität war das sogenannte *Additive-Screening*. Als Kit wurde der kommerziell erhältliche Additive Screen HT der Firma Hampton Research verwendet. Hierbei wurde versucht, die in den vorangegangenen *Screenings* gefundenen Kristallisationsbedingungen durch die Zugabe von Additiven weiter zu optimieren. Zu diesem Zweck wurde eine 1.1-fache Reservoirlösung (4.4 M Natriumformiat) angesetzt und jeweils 63  $\mu\text{L}$  in jedes Reservoir einer 96-Well-Platte gegeben. Im Anschluss wurden jeweils 7  $\mu\text{L}$  der Additive aus dem Kit zugegeben. Danach wurden die *Screenings*, wie oben beschrieben, mit dem Mosquito-Roboter<sup>[142]</sup> angesetzt. Die Inkubation und Dokumentation erfolgte ebenfalls mit dem Rock Imager 1000.<sup>[142]</sup>

#### 5.2.3.15 Seeding

Neben dem *Additive Screening* stellt das *Seeding* eine weitere Möglichkeit zur Verbesserung der Kristallqualität dar. Dazu wurden bereits erhaltene Kristalle nach dem Protokoll von Hampton Research (HR4-216) mit einem *Crystal Crusher* innerhalb des Kristallisationstropfens zerkleinert. Anschließend wurden die zerkleinerten Kristalle zusammen mit einer frisch angesetzten Reservoirlösung in ein *Seed Bead*-Reaktionsgefäß überführt und die *Seeding*-Lösung gemäß Protokoll (*Seed Bead User Guide*, HR2-320) hergestellt. Schließlich konnten die Kristallisationsexperimente wie zuvor durchgeführt werden. Der einzige Unterschied bei dieser Variante bestand darin, dass dem Kristallisationstropfen zusätzlich zur Reservoirlösung noch 0.3  $\mu\text{L}$  Seedinglösung in verschiedenen Verdünnungen zugesetzt wurden. Die Inkubation der Kristallisationsansätze erfolgte wiederum bei 20 °C bzw. 4 °C.

#### 5.2.3.16 Röntgenbeugungsexperimente

Die gebildeten Kristalle der Proteinvarianten wurden mit Kryoprotektoren inkubiert, sofern Kryoprotektoren nicht bereits in den Bedingungen vorhanden waren. Dazu wurden die Kristalle mithilfe von *Cryoloops* (Hampton Research) aus dem Ursprungstropfen entnommen und in eine Lösung gleicher Zusammensetzung mit zugesetztem Kryoprotektivum transferiert (bis zu 20 % Glycerol). Im Anschluss erfolgte das Einfrieren des Proteinkristalls innerhalb der Kryoschleife in flüssigem Stickstoff. Die gefrorenen Kristalle wurden einer röntgen-diffraktometrischen Analyse unterzogen.

Die Belichtungszeiten variierten zwischen 10 s und 60 s bei einer Detektordistanz von 100 mm bis 150 mm. Zur Verbesserung der beobachtbaren Auflösung der Diffraktion wurden die Proteinkristalle zusätzlich an der *Swiss Light Source* (SLS, Paul-Scherrer-Institut (PSI), Villingen, Schweiz) und der *European Synchrotron Radiation Facility* (ESRF, Grenoble, Frankreich) vermessen und 360°-Datensätze aufgenommen (Belichtungszeit 0.02 s, Transmission 20 %, Wellenlänge  $\lambda = 1.0 \text{ \AA}$ ). Im Anschluss wurden die erfassten Datensätze verarbeitet. Die Nachbereitung erfolgte unter Verwendung des Programms XDS.<sup>[139]</sup> Die Skalierung wurde mit dem Programm XSCALE<sup>[139]</sup> durchgeführt.

Der molekulare Ersatz wurde mit der im mmtz-Format erhaltenen Elektronendichtekarte und einer PDB-Struktur der Proteine unter Zuhilfenahme des Programms Phenix Phaser<sup>[140]</sup> vorgenommen. Die publizierten Strukturen 2PI4<sup>[49]</sup>, 1QLN<sup>[135]</sup>, 1H38<sup>[56]</sup> und 2V1A<sup>[26]</sup> wurden als Grundlage für den molekularen Ersatz herangezogen. Zur weiteren Optimierung der Modelle wurde ein zyklischer Prozess implementiert, der manuelle und automatisierte Verfeinerungen umfasst. Manuelle Optimierungen wurden mit COOT 0.9.8.7<sup>[154]</sup> und automatische Justierungen mit Phenix Refine<sup>[140]</sup> durchgeführt. Die Evaluierung der Qualität der Kristallstruktur wurde mit dem *PDB Validation Server*<sup>[156]</sup> durchgeführt. Die grafische Darstellung der Proteinstruktur erfolgte mit PyMol.<sup>[97]</sup>

#### 5.2.3.17 *In-vitro*-Transkription

Zur Bestimmung der Aktivität der T7-RNAP-Varianten wurden *in-vitro*-Transkriptionsreaktionen durchgeführt und die Menge der von den Proteinen synthetisierten mRNA quantifiziert und verglichen. Die bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  im Lagerpuffer aufbewahrten Proteine wurden auf eine Endkonzentration von  $0.035\text{ mg/mL}$  ( $0.30\text{ }\mu\text{M}$ ) verdünnt. Vor der Transkriptionsreaktion erfolgte eine Vorinkubation der Proteinlösung in einem transparenten und in einem schwarzen Reaktionsgefäß für 15 min bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  mit  $10\text{ mM}$  DTT. Dabei wurde die Proteinlösung im transparenten Gefäß mit der Beleuchtungsapparatur mit blauem Licht bestrahlt ( $\lambda = 470\text{ nm}$ ,  $92\text{ Lx}$ , Abbildung 125). Im Anschluss wurden sechs Reaktionsansätze (drei in transparenten und drei in schwarzen Reaktionsgefäßen) mit den vorinkubierten Proteinlösungen parallel angesetzt. Die Zusammensetzung eines dieser Reaktionsansätze ist in Tabelle 32 aufgeführt.

Tabelle 32: Zusammensetzung der Transkriptionsreaktionen ausreichend für drei Reaktionsansätze.

| Bezeichnung              | Volumen[ $\mu\text{L}$ ]              | Endkonzentration          |
|--------------------------|---------------------------------------|---------------------------|
| 10x Transkriptionspuffer | 2.5                                   | 1x                        |
| rNTP-Mix (25 mM/rNTP)    | 2                                     | 2 mM                      |
| pAlterGC/HindIII-HF      | X (154 ng)                            | 1.3 nM                    |
| T7-RNA-Polymerase        | 5                                     | $0.06\text{ }\mu\text{M}$ |
| HPLC-H <sub>2</sub> O    | Auffüllen auf $25\text{ }\mu\text{L}$ | -                         |

Daraufhin wurden die sechs Reaktionen für fünf Minuten oder eine Stunde bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Lichtzustand: Inkubationsschrank, Dunkelzustand: Thermoschüttler) durchgeführt. Dabei wurden die Ansätze in den transparenten Gefäßen erneut mit der Beleuchtungsapparatur bestrahlt ( $\lambda = 470\text{ nm}$ ,  $92\text{ Lx}$ ). Im Anschluss an die durchgeführte Reaktion wurden die Reaktionsgemische sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Auswertung bei einer Temperatur von  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert. Die Auswertung der Transkriptionsreaktionen erfolgte durch eine Analyse der Reaktionsansätze mit einem Agarose-Bleichgel (Abschnitt 5.2.2.9,  $5\text{ }\mu\text{L}$  pro Reaktion). Die Quantifizierung der synthetisierten RNA und der damit verbundene Vergleich der Transkriptionsaktivitäten zwischen Dunkel- und Lichtzustand, wurde mit dem Programm Image J<sup>[112]</sup> (Version 1.54g) durchgeführt.

### 5.2.3.18 Michaelis-Menten-Kinetik

Ausgewählte photoaktive Varianten der T7-RNAP wurden einer detaillierten Analyse unterzogen. Zu diesem Zweck wurden die apparenten Michaelis-Menten-Kinetiken in Anlehnung an ein bereits etabliertes Verfahren bestimmt.<sup>[157]</sup> Dazu wurden *in-vitro*-Transkriptionsreaktionen mit variierenden Substratkonzentrationen durchgeführt (vgl. Tabelle 33).

Tabelle 33: Zusammensetzung der *in-vitro*-Transkriptionsreaktion für die apparente Michaelis-Menten-Kinetik.

| Bezeichnung              | Volumen[ $\mu\text{L}$ ]        | Endkonzentration  |
|--------------------------|---------------------------------|-------------------|
| 10x Transkriptionspuffer | 90                              | 1x                |
| rNTP-Mix (25 mM/rNTP)    | 9-90                            | 0.25-2.5 mM       |
| pAlterGC/HindIII-HF      | X (41.88 $\mu\text{g}$ )        | 10 nM             |
| T7-RNA-Polymerase        | Y (104.0 $\mu\text{g}$ )        | 1.0 $\mu\text{M}$ |
| HPLC-H <sub>2</sub> O    | Auffüllen auf 900 $\mu\text{L}$ | -                 |

Die Proteinlösung wurde hierbei ebenfalls in transparenten und schwarzen Reaktionsgefäßen für 15 min bei 37 °C mit 10 mM DTT inkubiert. Die Reaktionen wurden durch die Zugabe des Enzyms initiiert und für 15 min bei 37 °C durchgeführt. Zu definierten Zeitpunkten ( $t = 0 \text{ s}$ , 20 s, 40 s, 60 s, 120 s, 300 s, 600 s, 900 s) wurden Proben aus der Reaktionslösung entnommen ( $V = 100 \mu\text{L}$ ) und diese auf einer 96-Well-Platte mit ca. der dreifachen, mittleren inhibitorischen Konzentration SYBR™ Green II (vgl. Abbildung 20,  $\text{IC}_{50} = 6.57 \pm 0.54 \mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$  Endkonzentration) versetzt, um die Reaktion vollständig zu beenden. Im Anschluss wurde die Fluoreszenz des mRNA-SYBR™-Green-II-Adduktes mit einem Mikroplatten-Lesegerät (BioTek, Synergy2) gemessen ( $\lambda_{\text{Ex}} = 485 \pm 20 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{Em}} = 528 \pm 20 \text{ nm}$ , Sensitivität: 50 %, vertikaler Offset der oberen Sonde: 5 mm). Die Umrechnung der Fluoreszenz in die Konzentration erfolgte mit Hilfe einer zuvor bestimmten Kalibriergeraden (Abbildung 20A). Die ermittelten Konzentrationen der entstandenen mRNA wurden über die Zeit aufgetragen. Die Anfangssteigung wurde durch eine lineare Regression der Auftragung über die erste Minute bestimmt. Im Anschluss wurde die aus Triplikaten gemittelte Anfangssteigung  $v_0$  gegen die Substratkonzentration  $c$  aufgetragen, woraus sich die apparente Michaelis-Menten-Kurve ergab, welche mit Hilfe des Programms Origin<sup>[96]</sup> ermittelt und ausgewertet wurde.

### 5.2.3.19 Bestimmung der mittleren, inhibitorischen Konzentration $\text{IC}_{50}$

Zur Bestimmung der Inhibitionskonzentration  $\text{IC}_{50}$  des Farbstoffs SYBR™-Green II auf die Polymerasereaktion wurden die Reaktionen wie oben beschrieben (vgl. 5.2.3.18) durchgeführt. Dabei wurden die Reaktionen bei konstanter Substratkonzentration ( $c_{\text{rNTP}} = 2 \text{ mM}$ ) mit WT-T7-RNAP in Abhängigkeit von der SG-Konzentration (0 – 20  $\mu\text{M}$ ) durchgeführt. Die Anfangssteigungen  $v_0$  der in Triplikaten durchgeführten Reaktionen wurden anschließend gegen die Konzentration aufgetragen und die Daten mit Origin<sup>[96]</sup> logarithmisch gefittet.

### 5.2.3.20 Zellmikroskopie

Für die Fluoreszenzmikroskopie wurden Zellen BL21[pRep4\_mApple\_RBS] mit einem Plasmid, welches die zu untersuchende T7-RNAP-Variante codiert, transformiert. Die transformierten Zellen wurden auf festem Nährboden ausgestrichen, jedoch mit dem Unterschied, dass zusätzlich zu den Selektionsmarkern 1 % (w/v) Glucose zugesetzt wurde, um eine vorzeitige Expression (*leaky expression*) zu verhindern. Am folgenden Tag wurde eine Übernachtskultur in LB-Medium, welches mit Antibiotika und Glucose (1 %) versetzt war, angeimpft. Aus dieser Übernachtskultur wurde am Tag darauf eine Kultur, welche ebenfalls mit Antibiotika und Glucose (1 %) versetzt war, angeimpft (2 % (v/v)). Diese Kultur wurde bei 37 °C und 140-160 rpm bis zu einer optischen Dichte von etwa 0.8 inkubiert. Nach Erreichen der gewünschten Zelldichte wurde ein Milliliter der Kultur abgenommen und zentrifugiert (30 s, 13000 rpm) und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in einem Milliliter frischem LB-Medium ohne Glucose und Selektionsmarker resuspendiert. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt, um eventuelle Glucosereste aus dem Zellpellet zu entfernen. Dem resuspendierten Zellpellet wurden zur Induktion der Expression der T7-RNAP-Variante 0.5 mM IPTG zugegeben. Nach einer 30-minütigen Inkubation bei 37 °C in schwarzen oder transparenten Gefäßen, wurden 2.5 µL der Kultur auf einen zuvor mit Poly-L-Lysin (PLL) behandelten Objektträger überführt. Während der Inkubation wurden die transparenten Gefäße zusätzlich mit blauem Licht ( $\lambda = 470 \text{ nm}$ , 92 Lx, Abbildung 125) bestrahlt. Anschließend wurden die Zellen zur vollständigen Immobilisierung mit einem Gel aus 1 % Agarose in H<sub>2</sub>O (*low melting agarose*, ca. 1 cm<sup>2</sup>) bedeckt. Schließlich wurde das Agarosepad mit einem Deckglas abgedeckt. Die Expression des an die T7-RNAP gekoppelten rot fluoreszierenden Proteins mApple wurde dann unter dem Mikroskop (Olympus IX81; ZDC-Autofokus, Objektiv: 20x X-Apo 0.80 NA/o.6 WD) über einen Zeitraum von drei Stunden bei etwa 34 °C verfolgt ( $\lambda_{\text{Ex}} = 555\text{-}575 \pm 25 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{Em}} = 629 \pm 53 \text{ nm}$ ). Das Messintervall betrug dabei 20 s. Um die Aktivität der photoaktiven Varianten im Lichtzustand zu detektieren, wurden die Zellen während der entsprechenden Messungen optional mit blauem Licht bestrahlt (Lumencor SPECTRA X Light Engine,  $\lambda_{\text{Ex}} = 438 \text{ nm}$ , 535 mW, 10 % Intensität).

## 6. Literaturverzeichnis

- [1] PubMed-Recherche zum Stichwort optical control. (2024). PubMed. Abgerufen 12.12.2024, von [https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/?term=optical%20control&filter=pubt.review&filter=years.1975-2025&sort=pubdate&sort\\_order=asc&timeline=expanded](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/?term=optical%20control&filter=pubt.review&filter=years.1975-2025&sort=pubdate&sort_order=asc&timeline=expanded).
- [2] L. Josa-Cullere, A. Llebaria, *J Med Chem* **2023**, *66*, 1909-1927.
- [3] K. Su, O. Vazquez, *Trends Biochem Sci* **2024**, *49*, 290-304.
- [4] T. Aguirre, E. Teichmann, F. Q. Rompp, R. Vivier, C. Bryant, M. A. Hulverson, W. C. Van Voorhis, K. K. Ojo, J. S. Doggett, D. Fiedler, S. Hecht, *ACS Chem Biol* **2023**, *18*, 1378-1387.
- [5] J. Morstein, A. C. Impastato, D. Trauner, *Chembiochem* **2021**, *22*, 73-83.
- [6] J. M. Silva, E. Silva, R. L. Reis, *J Control Release* **2019**, *298*, 154-176.
- [7] C. Chou, D. D. Young, A. Deiters, *Chembiochem* **2010**, *11*, 972-977.
- [8] M. Charette, C. Rosenblum, O. Shade, A. Deiters, *Chem Rev* **2025**.
- [9] N. Ankenbruck, T. Courtney, Y. Naro, A. Deiters, *Angew Chem Int Ed Engl* **2018**, *57*, 2768-2798.
- [10] A. Dwijayanti, C. Zhang, C. L. Poh, T. Lautier, *Front Bioeng Biotechnol* **2021**, *9*, 804563.
- [11] L. Zhu, H. M. McNamara, J. E. Toettcher, *Nat Commun* **2023**, *14*, 3185.
- [12] A. C. McCue, B. Kuhlman, *Curr Opin Struct Biol* **2022**, *74*, 102377.
- [13] J. Mathony, S. Aschenbrenner, P. Becker, D. Niopek, *Adv Sci (Weinh)* **2023**, e2303496.
- [14] J. A. Reynolds, Y. L. Vishweshwaraiah, V. R. Chirasani, J. R. Pritchard, N. V. Dokholyan, *J Biol Chem* **2023**, *299*, 103069.
- [15] S. Seifert, S. Brakmann, *ACS Chem Biol* **2018**, *13*, 1914-1920.
- [16] A. M. Weber, J. Kaiser, T. Ziegler, S. Pilsl, C. Renzl, L. Sixt, G. Pietruschka, S. Moniot, A. Kakoti, M. Juraschitz, S. Schrottke, L. Lledo Bryant, C. Steegborn, R. Bittl, G. Mayer, A. Moglich, *Nat Chem Biol* **2019**, *15*, 1085-1092.
- [17] A. Baumschlager, S. K. Aoki, M. Khammash, *ACS Synth Biol* **2017**, *6*, 2157-2167.
- [18] S. Dionisi, K. Piera, A. Baumschlager, M. Khammash, *ACS Synth Biol* **2022**, *11*, 2650-2661.
- [19] E. F. Joest, R. Tampe, *Trends Biotechnol* **2023**, *41*, 1501-1517.
- [20] T. Han, Q. Chen, H. Liu, *ACS Synth Biol* **2017**, *6*, 357-366.
- [21] N. Wichert, M. Witt, C. Blume, T. Scheper, *Biotechnol Bioeng* **2021**, *118*, 4168-4185.
- [22] Y. Wang, L. Wang, Z. Guan, H. Chang, L. Ma, C. Shen, L. Qiu, J. Yan, D. Zhang, J. Li, X. W. Deng, P. Yin, *Sci Adv* **2022**, *8*, eabn3337.
- [23] M. Z. Papiz, D. Bellini, to be published.
- [24] A. A. Kaberniuk, A. A. Shemetov, V. V. Verkhusha, *Nat Methods* **2016**, *13*, 591-597.
- [25] D. Bellini, M. Z. Papiz, *Structure* **2012**, *20*, 1436-1446.
- [26] A. S. Halavaty, K. Moffat, *Biochemistry* **2007**, *46*, 14001-14009.
- [27] H. Poddar, R. Rios-Santacruz, D. J. Heyes, M. Shanmugam, A. Brookfield, L. O. Johannissen, C. W. Levy, L. N. Jeffreys, S. Zhang, M. Sakuma, J. P. Colletier, S. Hay, G. Schiro, M. Weik, N. S. Scrutton, D. Leys, *Nat Commun* **2023**, *14*, 5082.
- [28] S. Nagano, K. Guan, S. M. Shenkutie, C. Feiler, M. Weiss, A. Kraskov, D. Buhrke, P. Hildebrandt, J. Hughes, *Nat Plants* **2020**, *6*, 581-588.
- [29] S. M. Harper, L. C. Neil, K. H. Gardner, *SCIENCE* **2003**, *301*, 1541-1544.
- [30] Y. Z. Gu, J. B. Hogenesch, C. A. Bradfield, *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **2000**, *40*, 519-561.
- [31] M. Salomon, J. M. Christie, E. Knieb, U. Lempert, W. R. Briggs, *Biochemistry* **2000**, *39*, 9401-9410.
- [32] J. T. Henry, S. Crosson, *Annu Rev Microbiol* **2011**, *65*, 261-286.
- [33] A. Moglich, R. A. Ayers, K. Moffat, *Structure* **2009**, *17*, 1282-1294.
- [34] S. Crosson, K. Moffat, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2001**, *98*, 2995-3000.
- [35] A. Flores-Ibarra, R. N. A. Maia, B. Olasz, J. R. Church, G. Gotthard, I. Schapiro, J. Heberle, P. Nogly, *J Mol Biol* **2024**, *436*, 168356.
- [36] S. Xiao, M. T. Ibrahim, G. M. Verkhivker, B. D. Zoltowski, P. Tao, *J Comput Chem.* **2024**, 1-12.
- [37] J. N. Iuliano, J. T. Collado, A. A. Gil, P. T. Ravindran, A. Lukacs, S. Shin, H. A. Woroniecka, K. Adamczyk, J. M. Aramini, U. R. Edupuganti, C. R. Hall, G. M. Greetham, I. V. Sazanovich, I. P. Clark, T. Daryaee, J. E. Toettcher, J. B. French, K. H. Gardner, C. L. Simmerling, S. R. Meech, P. J. Tonge, *ACS Chem Biol* **2020**, *15*, 2752-2765.

- [38] P. E. Konold, T. Mathes, J. Weibetaenborn, M. L. Groot, P. Hegemann, J. T. Kennis, *J Phys Chem Lett* **2016**, *7*, 3472-3476.
- [39] J. Mathony, D. Niopek, *Adv Biol (Weinh)* **2021**, *5*, e2000181.
- [40] D. Strickland, K. Moffat, T. R. Sosnick, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2008**, *105*, 10709-10714.
- [41] U. Vide, D. Kasapovic, M. Fuchs, M. P. Heimbock, M. G. Totaro, E. Zenzmaier, A. Winkler, *Sci Adv* **2023**, *9*, eadh4721.
- [42] M. Nakamura, L. Chen, S. C. Howes, T. D. Schindler, E. Nogales, Z. Bryant, *Nat Nanotechnol* **2014**, *9*, 693-697.
- [43] P. A. Humphreys, S. Woods, C. A. Smith, N. Bates, S. A. Cain, R. Lucas, S. J. Kimber, *ACS Synth Biol* **2020**, *9*, 3067-3078.
- [44] X. L. Li, R. Tei, M. Uematsu, J. M. Baskin, *ACS Cent Sci* **2024**, *10*, 543-554.
- [45] M. W. Kim, W. Wang, M. I. Sanchez, R. Coukos, M. von Zastrow, A. Y. Ting, *Elife* **2017**, *6*.
- [46] J. I. Spiltoir, C. L. Tucker, *Curr Opin Struct Biol* **2019**, *57*, 1-8.
- [47] M. Chamberlin, J. McGrath, L. Waskell, *Nature* **1970**, *228*, 227-231.
- [48] G. M. T. Cheetham, T. A. Steitz, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2000**, *10*, 117-123.
- [49] W. P. Kennedy, J. R. Momand, Y. W. Yin, *J Mol Biol* **2007**, *370*, 256-268.
- [50] G. M. T. Cheetham, D. Jeruzalmi, T. A. Steitz, *Nature* **1999**, *399*, 80-83.
- [51] J. J. Dunn, F. W. Studier, *J Mol Biol* **1983**, *166*, 477-535.
- [52] J. F. Klement, M. B. Moorefield, E. Jorgensen, J. E. Brown, S. Risman, W. T. McAllister, *J Mol Biol* **1990**, *215*, 21-29.
- [53] D. K. Muller, C. T. Martin, J. E. Coleman, *Biochemistry* **1988**, *27*, 5763-5771.
- [54] T. A. Steitz, *Curr Opin Struct Biol* **2009**, *19*, 683-690.
- [55] A. Revyakin, C. Liu, R. H. Ebright, T. R. Strick, *Science* **2006**, *314*, 1139-1143.
- [56] T. H. Tahirov, D. Temiakov, M. Anikin, W. T. McAllister, D. Vassilyev, G., S. Yokoyama, *Nature* **2002**, *420*, 43-50.
- [57] D. Temiakov, T. H. Tahirov, M. Anikin, W. T. McAllister, D. Vassilyev, G., S. Yokoyama, *Acta Cryst* **2003**, *D59*, 185-187.
- [58] S. Borkotoky, A. Murali, *Int J Biol Macromol* **2018**, *118*, 49-56.
- [59] S. Brakmann, S. Grzeszik, *Chembiochem* **2001**, *2*, 212-219.
- [60] D. Temiakov, V. Patlan, M. Anikin, W. T. McAllister, S. Yokoyama, D. Vassilyev, G., *Cell* **2004**, *116*, 381-391.
- [61] J. A. Yin, T. A. Steitz, *Cell* **2004**, *116*, 393-404.
- [62] Y. W. Yin, T. A. Steitz, *SCIENCE* **2002**, *298*, 1387-1395.
- [63] S. Tabor, C. C. Richardson, *Proc Natl Acad Sci U S A* **1985**, *82*, 1074-1078.
- [64] T. H. Segall-Shapiro, A. J. Meyer, A. D. Ellington, E. D. Sontag, C. A. Voigt, *Mol Syst Biol* **2014**, *10*, 742.
- [65] S. Seifert, C. Ehrh, L. Lückfeldt, M. Lubeck, F. Schramm, S. Brakmann, *Chembiochem* **2019**, *20*, 2813-2817.
- [66] D. L. Shis, M. R. Bennett, *PNAS* **2013**, *110*, 5028-5033.
- [67] F. Kawano, H. Suzuki, A. Furuya, M. Sato, *Nat Commun* **2015**, *6*, 6256.
- [68] B. D. Zoltowski, C. Schwerdtfeger, J. Widom, J. J. Loros, A. M. Bilwes, J. C. Dunlap, B. R. Crane, *Science* **2007**, *316*, 1054-1057.
- [69] W. Wang, Y. Li, Y. Wang, C. Shi, C. Li, Q. Li, R. J. Linhardt, *Biotechnol Adv* **2018**, *36*, 2129-2137.
- [70] J. W. Park, P. N. P. Lagniton, Y. Liu, R. H. Xu, *Int J Biol Sci* **2021**, *17*, 1446-1460.
- [71] S. Kwon, M. Kwon, S. Im, K. Lee, H. Lee, *Arch Pharm Res* **2022**, *45*, 245-262.
- [72] G. T. Szabo, A. J. Mahiny, I. Vlatkovic, *Mol Ther* **2022**, *30*, 1850-1868.
- [73] R. C. Mierendorf, B. B. Morris, B. Hammer, R. E. Novy, *Methods Mol Med* **1998**, *13*, 257-292.
- [74] F. W. Studier, A. H. Rosenberg, J. J. Dunn, J. W. Dubendorff, *Methods Enzymol* **1990**, *185*, 60-89.
- [75] Covid-vaccinations. (2024). Ourworldindata. Abgerufen 05.12.2024, von <https://ourworldindata.org/covid-vaccinations>.
- [76] Centers for Disease Control and Prevention (U.S.), **2023**.
- [77] Centers for Disease Control and Prevention (U.S.), **2024**.
- [78] R. A. Ikeda, C. C. Richardson, *Journal of Biological Chemistry* **1987**, *262*, 3790-3799.
- [79] S. Arnold, M. Siemann, K. Scharnweber, M. Werner, S. Baumann, M. Reuss, *Biotechnology and Bioengineering* **2001**, *72*, 548-561.
- [80] V. L. Tunitskaya, S. N. Kochetkov, *Biochemistry (Mosc)* **2002**, *67*, 1124-1135.
- [81] J. Grodberg, J. J. Dunn, *J Bacteriol.* **1988**, *170*, 1245-1253.
- [82] V. Zawadzki, H. J. Gross, *Nucleic Acids Res* **1991**, *19*, 1948.

- [83] K. S. Gonzalez-Ponce, S. Celaya-Herrera, M. F. Mendoza-Acosta, L. E. Casados-Vazquez, *J Membr Biol* **2025**, 258, 15-28.
- [84] R. B. Ganesh, S. J. Maerkl, *ACS Synth Biol* **2024**, 13, 2555-2566.
- [85] J. De Capitani, H. Mutschler, *Biochemistry* **2023**, 62, 1221-1232.
- [86] S. Seifert, Dissertation, Technische Universität Dortmund (Dortmund), **2024**.
- [87] Agilent Technologies Inc. , **2015**, pp. 1-19.
- [88] F. van den Ent, J. Lowe, *J Biochem Biophys Methods* **2006**, 67, 67-74.
- [89] kreiert mit BioRender.com.
- [90] B. Heyn, Dissertation, Technische Universität Dortmund (Dortmund), **2011**.
- [91] R. Sousa, J. P. Rose, Y. J. Chung, E. M. Lafer, B. C. Wang, *Proteins* **1989**, 5, 266-270.
- [92] Factor Xa Protease, New England Biolabs, Abgerufen 20.01.2025, von <https://www.neb.com/en/products/p8010-factor-xa-protease#:~:text=Factor%20Xa%20cleaves%20after%20the,sequenced%2C%20is%20Gly%2DArg.>
- [93] S. T. Yue, V. L. Singer, B. L. Roth, T. J. Mozer, P. J. Millard, L. J. Jones, X. Jin, R. P. Haugland, C12Q 1/04 ed., Molecular Probes Inc., **1997**.
- [94] V. K. Saarnio, K. Salorinne, V. P. Ruokolainen, J. R. Nilsson, T.-R. Tero, S. Oikarinen, L. M. Wilhelmsson, T. M. Lahtinen, V. S. Marjomäki, *Dyes and Pigments* **2020**, 177, 108282.
- [95] J. Ibach, L. Dietrich, K. R. Koopmans, N. Nobel, M. Skoupi, S. Brakmann, *J Biotechnol* **2013**, 167, 287-295.
- [96] OriginLab Corporation, 10.0.0.154 ed., Northampton, MA, USA, **2023**.
- [97] Schrödinger, LLC, 2.5.4 ed., **2015**.
- [98] K. Ma, D. Temiakov, M. Anikin, W. T. McAllister, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2005**, 102, 17612-17617.
- [99] G. A. Grant, *Arch Biochem Biophys* **2018**, 653, 10-23.
- [100] F. H. Arnold, *Angew Chem Int Ed Engl* **2018**, 57, 4143-4148.
- [101] W. R. Edwards, K. Busse, R. K. Allemann, D. D. Jones, *Nucleic Acids Res* **2008**, 36, e78.
- [102] V. Shah, B. Pierre, J. R. Kim, *Anal Biochem* **2013**, 432, 97-102.
- [103] O. Dagliyan, A. Krokhotin, I. Ozkan-Dagliyan, A. Deiters, C. J. Der, K. M. Hahn, N. V. Dokholyan, *Nat Commun* **2018**, 9, 4042.
- [104] O. Dagliyan, N. V. Dokholyan, K. M. Hahn, *Nat Protoc* **2019**, 14, 1863-1883.
- [105] F. L. Simonetti, E. Teppa, A. Chernomoretz, M. Nielsen, C. Marino Buslje, *Nucleic Acids Res* **2013**, 41, W8-14.
- [106] S. Kullback, R. A. Leibler, *The Annals of Mathematical Statistics* **1951**, 22, 79-86.
- [107] M. Heinig, D. Frishman, *Nucleic Acids Res* **2004**, 32, W500-502.
- [108] D. Frishman, P. Argos, *Proteins* **1995**, 23, 566-579.
- [109] C. Vehlow, H. Stehr, M. Winkelmann, J. M. Duarte, L. Petzold, J. Dinse, M. Lappe, *Bioinformatics* **2011**, 27, 1573-1574.
- [110] J. Alda, Bachelorarbeit, Technische Universität Dortmund (Dortmund), **2024**.
- [111] D. Pietrus, Bachelorarbeit, Technische Universität Dortmund (Dortmund), **2024**.
- [112] C. A. Schneider, W. S. Rasband, K. W. Eliceiri, *Nat Methods* **2012**, 9, 671-675.
- [113] Z. Sun, Q. Liu, G. Qu, Y. Feng, M. T. Reetz, *Chem. Rev.* **2019**, 119, 1626-1665.
- [114] O. Carugo, *BMC Bioinformatics* **2018**, 19, 61.
- [115] M. T. Reetz, J. D. Carballeira, A. Vogel, *Angew Chem Int Ed Engl* **2006**, 45, 7745-7751.
- [116] A.-L. Kühn, Bachelorarbeit, Technische Universität Dortmund (Dortmund), **2023**.
- [117] C. A. Barnes, Y. Shen, J. Ying, Y. Takagi, D. A. Torchia, J. R. Sellers, A. Bax, *J Am Chem Soc* **2019**, 141, 9004-9017.
- [118] S. Schmitz, C. Desel, *Der Experimentator Zellbiologie*, Springer, Heidelberg, **2018**.
- [119] C. M. Southward, M. G. Surette, *Mol Microbiol* **2002**, 45, 1191-1196.
- [120] S. Avrillier, M. Gauden, J.-M. Tualle, S. Crosson, I. H. M. van Stokkum, R. van Grondelle, K. Moffat, J. T. M. Kennis, **2004**, 5463, 97.
- [121] X. Shu, N. C. Shaner, C. A. Yarbrough, R. Y. Tsien, S. J. Remington, *Biochemistry* **2006**, 45, 9639-9647.
- [122] N. C. Shaner, M. Z. Lin, M. R. McKeown, P. A. Steinbach, K. L. Hazelwood, M. W. Davidson, R. Y. Tsien, *Nat Methods* **2008**, 5, 545-551.
- [123] T. J. Lambert, *Nat Methods* **2019**, 16, 277-278.
- [124] R. Nowy, B. Morris, *inNovations*, 8-10.
- [125] M. J. Berg, J. L. Tymoczko, G. J. Gatto jr., L. Stryer, *Biochemie*, 8 ed., Springer, Heidelberg, **2018**.
- [126] J. Y. Tinevez, N. Perry, J. Schindelin, G. M. Hoopes, G. D. Reynolds, E. Laplantine, S. Y. Bednarek, S. L. Shorte, K. W. Eliceiri, *Methods* **2017**, 115, 80-90.

- [127] D. Ershov, M. S. Phan, J. W. Pylvanainen, S. U. Rigaud, L. Le Blanc, A. Charles-Orszag, J. R. W. Conway, R. F. Laine, N. H. Roy, D. Bonazzi, G. Dumenil, G. Jacquemet, J. Y. Tinevez, *Nat Methods* **2022**, *19*, 829-832.
- [128] M. Gao, D. Nakajima An, J. M. Parks, J. Skolnick, *Nat Commun* **2022**, *13*, 1744.
- [129] M. Mirdita, K. Schutze, Y. Moriwaki, L. Heo, S. Ovchinnikov, M. Steinegger, *Nat Methods* **2022**, *19*, 679-682.
- [130] J. Abramson, J. Adler, J. Dunger, R. Evans, T. Green, A. Pritzel, O. Ronneberger, L. Willmore, A. J. Ballard, J. Bambrick, S. W. Bodenstein, D. A. Evans, C. C. Hung, M. O'Neill, D. Reiman, K. Tunyasuvunakool, Z. Wu, A. Zemgulyte, E. Arvaniti, C. Beattie, O. Bertolli, A. Bridgland, A. Cherepanov, M. Congreve, A. I. Cowen-Rivers, A. Cowie, M. Figurnov, F. B. Fuchs, H. Gladman, R. Jain, Y. A. Khan, C. M. R. Low, K. Perlin, A. Potapenko, P. Savy, S. Singh, A. Stecula, A. Thillaisundaram, C. Tong, S. Yakneen, E. D. Zhong, M. Zielinski, A. Zidek, V. Bapst, P. Kohli, M. Jaderberg, D. Hassabis, J. M. Jumper, *Nature* **2024**, *630*, 493-500.
- [131] J. Jumper, R. Evans, A. Pritzel, T. Green, M. Figurnov, O. Ronneberger, K. Tunyasuvunakool, R. Bates, A. Zidek, A. Potapenko, A. Bridgland, C. Meyer, S. A. A. Kohl, A. J. Ballard, A. Cowie, B. Romera-Paredes, S. Nikolov, R. Jain, J. Adler, T. Back, S. Petersen, D. Reiman, E. Clancy, M. Zielinski, M. Steinegger, M. Pacholska, T. Berghammer, S. Bodenstein, D. Silver, O. Vinyals, A. W. Senior, K. Kavukcuoglu, P. Kohli, D. Hassabis, *Nature* **2021**, *596*, 583-589.
- [132] Nobelpreis in Chemie 2024. <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2024/summary/>, abgerufen am 21.02.2025.
- [133] R. Sousa, Y. J. Chung, J. P. Rose, B.-C. Wang, *Nature* **1993**, *364*, 593-599.
- [134] D. Jeruzalmi, T. A. Steitz, *the EMBO Journal* **1998**, *17*, 4101-4113.
- [135] G. M. T. Cheetham, T. A. Steitz, *SCIENCE* **1999**, *286*, 2305-2309.
- [136] J. Oh, M. Kimoto, H. Xu, J. Chong, I. Hirao, D. Wang, *Nat Commun* **2023**, *14*, 195.
- [137] K. J. Durniak, S. Bailey, T. A. Steitz, *Science* **2008**, *322*, 553-557.
- [138] D. Jeruzalmi, T. A. Steitz, *J Mol Biol* **1997**, *274*, 748-756.
- [139] W. Kabsch, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **2010**, *66*, 125-132.
- [140] P. D. Adams, P. V. Afonine, G. Bunkoczi, V. B. Chen, I. W. Davis, N. Echols, J. J. Headd, L. W. Hung, G. J. Kapral, R. W. Grosse-Kunstleve, A. J. McCoy, N. W. Moriarty, R. Oeffner, R. J. Read, D. C. Richardson, J. S. Richardson, T. C. Terwilliger, P. H. Zwart, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **2010**, *66*, 213-221.
- [141] E. A. Franzosa, K. J. Lynagh, Y. Xia, *Experimental Standard Conditions of Enzyme Characterizations* **2009**, 99-106.
- [142] in Zusammenarbeit mit Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie, Dortmund.
- [143] N. Hornkamp, Bachelorarbeit, Technische Universität Dortmund (Dortmund), **2023**.
- [144] Synchrotron Lichtquelle Schweiz (SLS) des Paul-Scherrer-Instituts, Villingen, Schweiz.
- [145] European Synchrotron Radiation Facility (ESRF), Grenoble, Frankreich.
- [146] B. Heras, M. A. Edeing, K. A. Byriel, A. Jones, S. Raina, J. L. Martin, *Structure* **2003**, *11*, 139-145.
- [147] M.-L. Heitland, Masterarbeit, Universität Bielefeld (Dortmund), **2024**.
- [148] E. G. Chronopoulou, N. E. Labrou, *Curr Protoc Protein Sci* **2011**, *Chapter 26*, 26 26 21-26 26 10.
- [149] A. D'Arcy, T. Bergfors, S. W. Cowan-Jacob, M. Marsh, *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun* **2014**, *70*, 1117-1126.
- [150] L. Slabinski, L. Jaroszewski, L. Rychlewski, I. A. Wilson, S. A. Lesley, A. Godzik, *Bioinformatics* **2007**, *23*, 3403-3405.
- [151] G. E. Dale, C. Oefner, A. D'Arcy, *J Struct Biol* **2003**, *142*, 88-97.
- [152] T. A. Hall, *Nucleic Acids Symposium Series* **1999**, *41*, 95-98.
- [153] SnapGene® software (von Dotmatics; verfügbar unter [snappgene.com](http://snappgene.com)).
- [154] P. Emsley, K. Cowtan, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **2004**, *60*, 2126-2132.
- [155] Hampton Research Crystal Growth 101, verfügbar unter <https://hamptonresearch.com/crystal-growth101.php>.
- [156] H. Berman, K. Henrick, H. Nakamura, *Nat Struct Biol* **2003**, *10*, 980.
- [157] M. D. Driscoll, J. Rentergent, S. Hay, *FEBS J* **2014**, *281*, 2042-2050.
- [158] L. Kremer, Bachelorarbeit, Technische Universität Dortmund (Dortmund), **2022**.

## 7. Anhang

### 7.1 Plasmidkarten

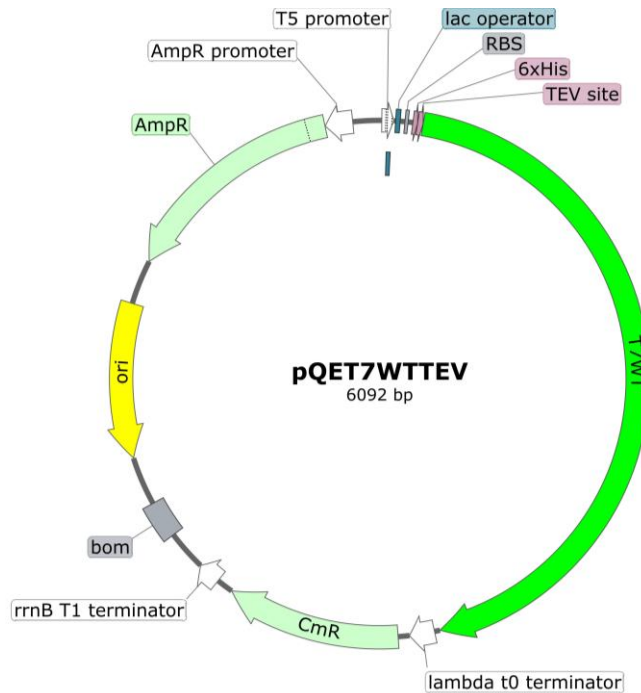


Abbildung 55: Plasmidkarte pQET7WTTEV (6092 bp); gelb: Replikationsursprung; hellgrün: Kanamycin- und Ampicillin-Resistenz; grün: WT-T7-RNAP-codierende Gensequenz inklusive 6x-His-Tag- und TEV-Schnittstelle-codierende Sequenzen; blau: Lac-Operator.

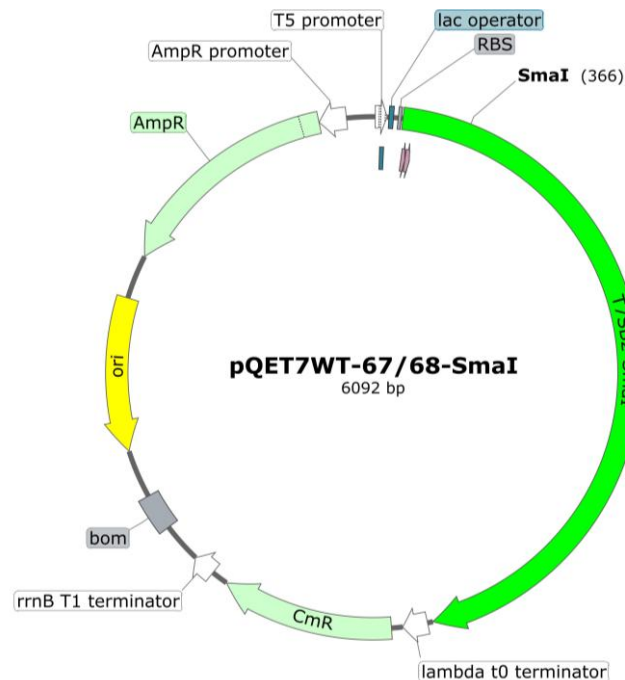


Abbildung 56: Plasmidkarte pQET7WT-67/68-SmaI (6092 bp); gelb: Replikationsursprung; hellgrün: Kanamycin- und Ampicillin-Resistenz; grün: WT-T7-RNAP-codierende Gensequenz inklusive 6x-His-Tag- und TEV-Schnittstelle-codierende Sequenzen; blau: Lac-Operator; durch QC-PCR eingefügte SmaI-Schnittstelle ist gekennzeichnet (366 bp).

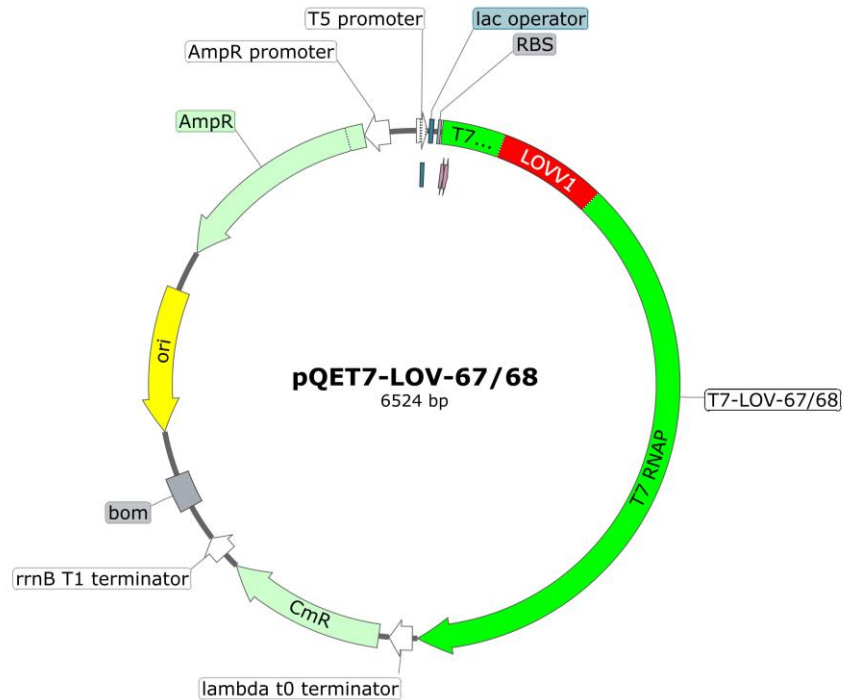


Abbildung 57: Plasmidkarte pQET7-LOV-67/68 (6524 bp); gelb: Replikationsursprung; hellgrün: Kanamycin- und Ampicillin-Resistenz; grün: Variante 67/68-codierende Gensequenz inklusive 6x-His-Tag- und TEV-Schnittstelle-codierende Sequenzen; rot: Vollängen AsLOV2-codierende Sequenz innerhalb des T7 Gens; blau: Lac-Operator.

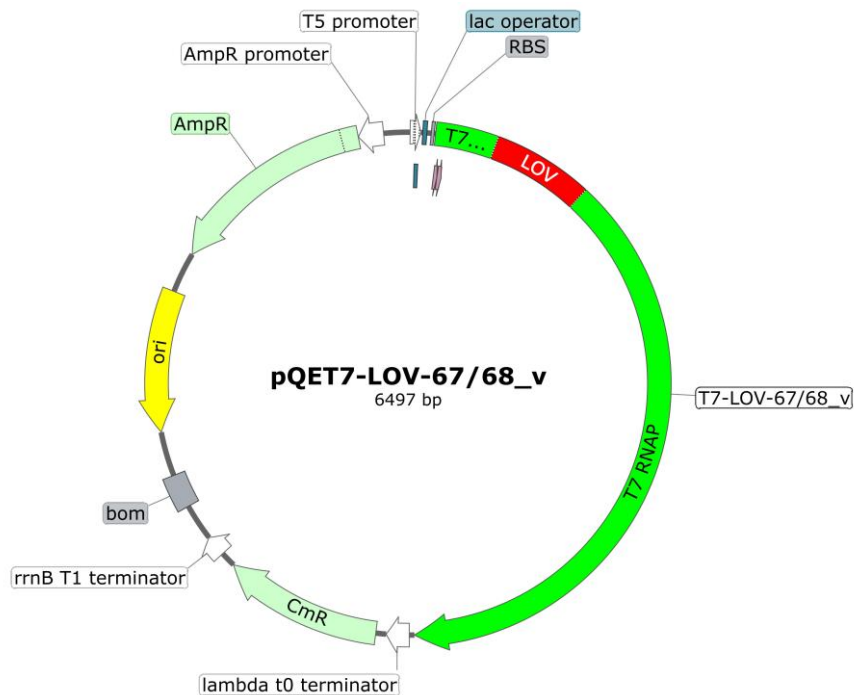


Abbildung 58: Plasmidkarte pQET7-LOV-67/68<sub>v</sub> (6497 bp); gelb: Replikationsursprung; hellgrün: Kanamycin- und Ampicillin-Resistenz; grün: Variante 67/68<sub>v</sub>-codierende Gensequenz inklusive 6x-His-Tag- und TEV-Schnittstelle-codierende Sequenzen; rot: Um 9 AS C-Terminal gekürzte AsLOV2-codierende Sequenz innerhalb des T7 Gens; blau: Lac-Operator.

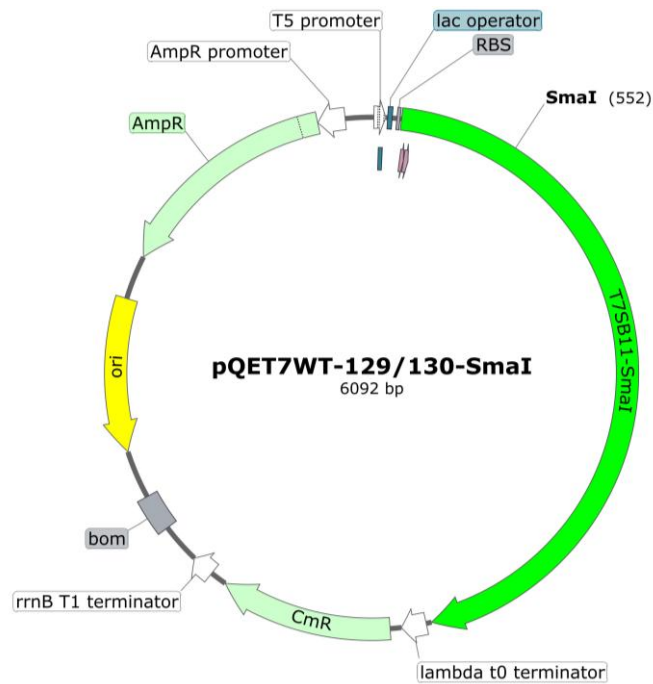


Abbildung 59: Plasmidkarte pQET7WT-129/130-SmaI (6092 bp); gelb: Replikationsursprung; hellgrün: Kanamycin- und Ampicillin-Resistenz; grün: WT-T7-RNAP-codierende Gensequenz inklusive 6x-His-Tag- und TEV-Schnittstelle-codierende Sequenzen; blau: Lac-Operator; durch QC-PCR eingefügte SmaI-Schnittstelle ist gekennzeichnet (552 bp).

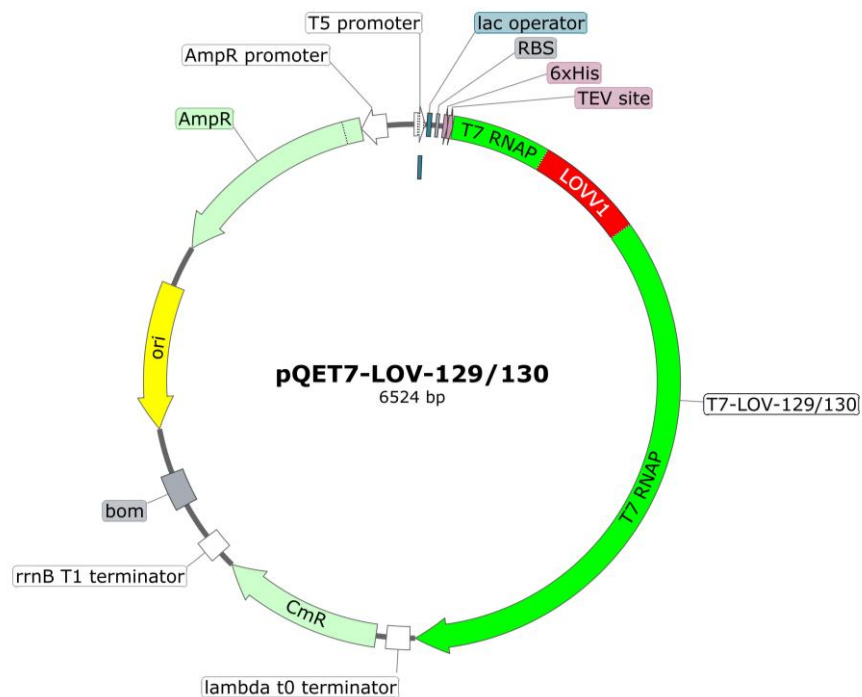


Abbildung 60: Plasmidkarte pQET7-LOV-129/130 (6524 bp); gelb: Replikationsursprung; hellgrün: Kanamycin- und Ampicillin-Resistenz; grün: Variante 129/130-codierende Gensequenz inklusive 6x-His-Tag- und TEV-Schnittstelle-codierende Sequenzen; rot: Vollängen AsLOV2-codierende Sequenz innerhalb des T7 Gens; blau: Lac-Operator.

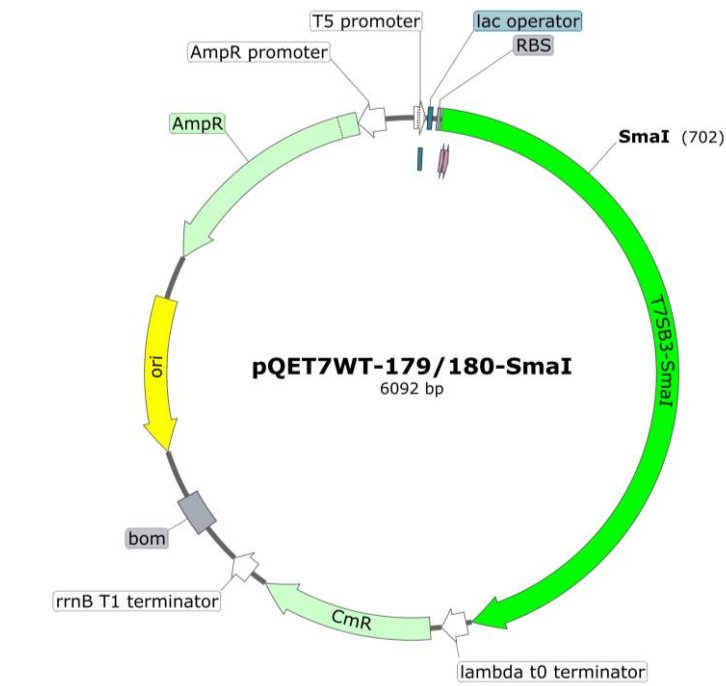


Abbildung 61: Plasmidkarte pQET7WT-179/180-SmaI (6092 bp); gelb: Replikationsursprung; hellgrün: Kanamycin- und Ampicillin-Resistenz; grün: WT-T7-RNAP-codierende Gensequenz inklusive 6x-His-Tag- und TEV-Schnittstelle-codierende Sequenzen; blau: Lac-Operator; durch QC-PCR eingefügte SmaI-Schnittstelle ist gekennzeichnet (702 bp).

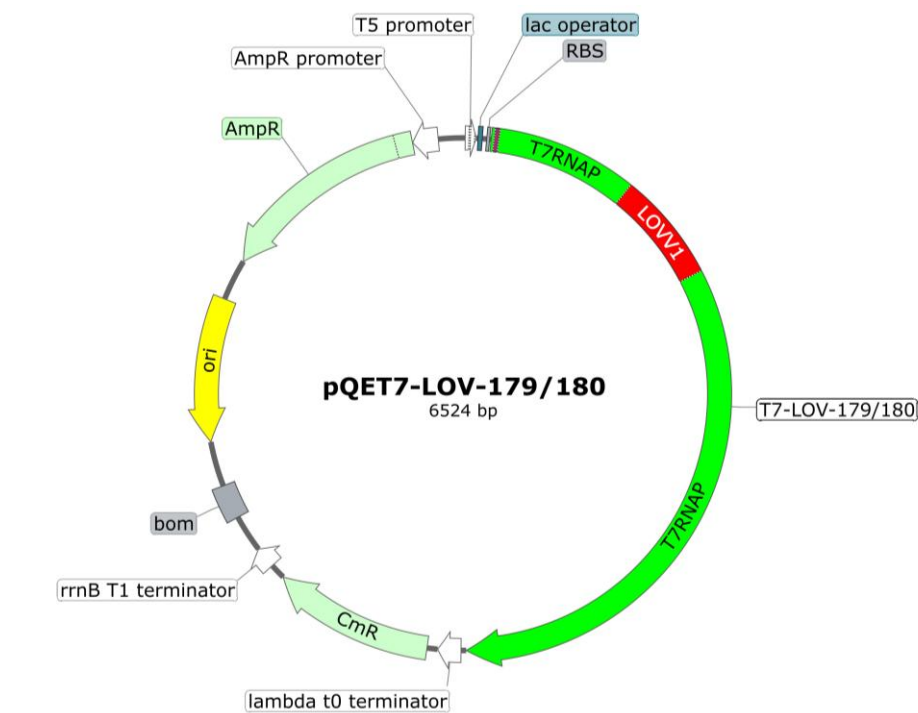


Abbildung 62: pQET7-LOV-179/180 (6524 bp); gelb: Replikationsursprung; hellgrün: Kanamycin- und Ampicillin-Resistenz; grün: Variante 179/180-codierende Gensequenz inklusive 6x-His-Tag- und TEV-Schnittstelle-codierende Sequenzen; rot: Vollängen AsLOV2-codierende Sequenz innerhalb des T7 Gens; blau: Lac-Operator.

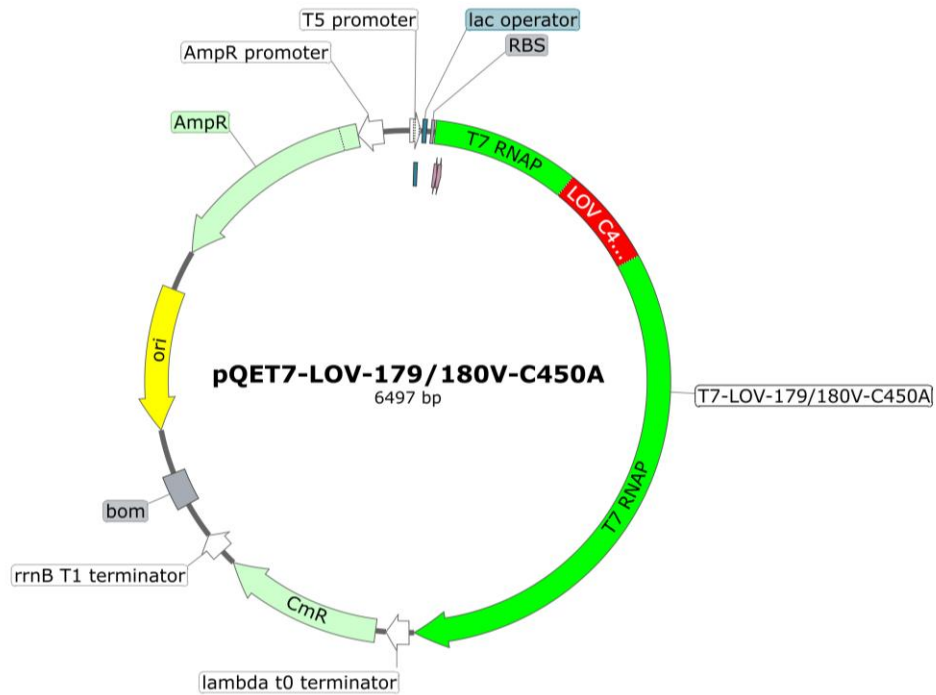


Abbildung 63: pQET7-LOV-179/180V-C450A (6497 bp); gelb: Replikationsursprung; hellgrün: Kanamycin- und Ampicillin-Resistenz; grün: Verkürzte Variante 179/180<sub>v</sub>-codierende Gensequenz mit der Mutation C450A innerhalb der LOV-Domäne inklusive 6x-His-Tag- und TEV-Schnittstelle-codierende Sequenzen; rot: Vollängen AsLOV2-codierende Sequenz mit der Mutation C450A innerhalb des T7 Gens; blau: Lac-Operator.

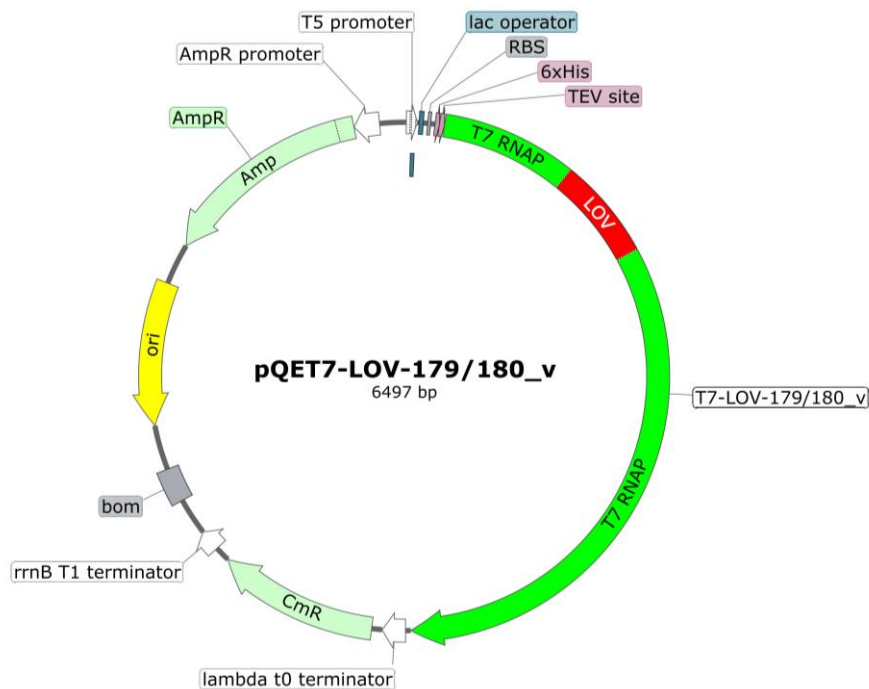


Abbildung 64: pQET7-LOV-179/180<sub>v</sub> (6497 bp); gelb: Replikationsursprung; hellgrün: Kanamycin- und Ampicillin-Resistenz; grün: Variante 179/180<sub>v</sub>-codierende Gensequenz inklusive 6x-His-Tag- und TEV-Schnittstelle-codierende Sequenzen; rot: Um 9 AS C-Terminal gekürzte AsLOV2-codierende Sequenz innerhalb des T7 Gens; blau: Lac-Operator.

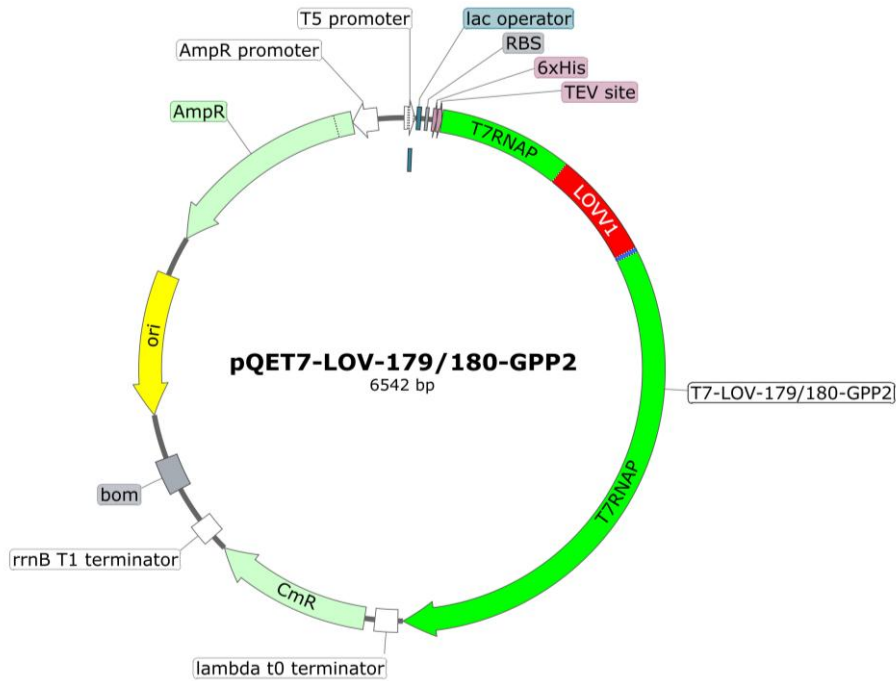


Abbildung 65: pQET7-LOV-179/180-GPP<sub>2</sub> (6542 bp); gelb: Replikationsursprung; hellgrün: Kanamycin- und Ampicillin-Resistenz; grün: Variante 179/180-GPP2-codierende Gensequenz inklusive 6x-His-Tag- und TEV-Schnittstelle-codierende Sequenzen; rot: Um 6 AS (blau) verlängerte AsLOV2-codierende Sequenz innerhalb des T7 Gens; blau: Lac-Operator.

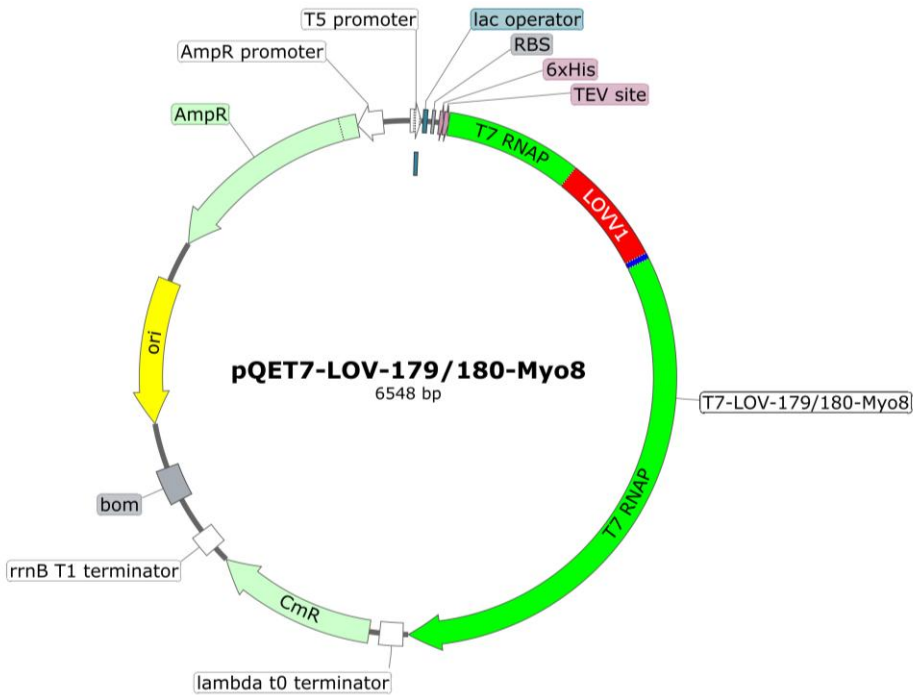


Abbildung 66: pQET7-LOV-179/180-Myo8 (6548 bp); gelb: Replikationsursprung; hellgrün: Kanamycin- und Ampicillin-Resistenz; grün: Variante 179/180-GPP2-codierende Gensequenz inklusive 6x-His-Tag- und TEV-Schnittstelle-codierende Sequenzen; rot: Um 8 AS (blau) verlängerte AsLOV2-codierende Sequenz innerhalb des T7 Gens; blau: Lac-Operator.

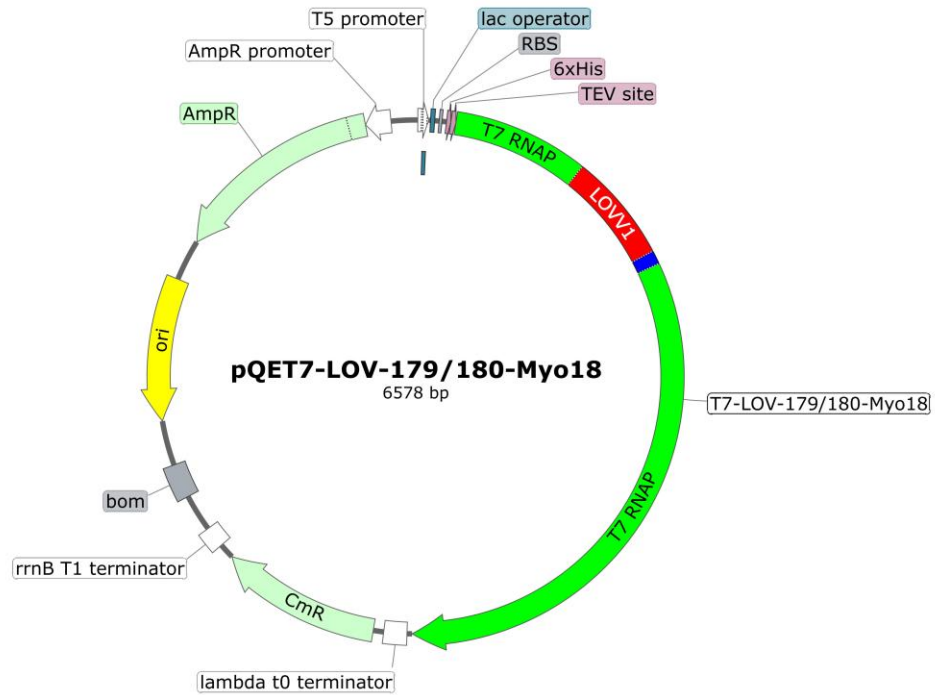


Abbildung 67: pQET7-LOV-179/180-Myo18 (6578 bp); gelb: Replikationsursprung; hellgrün: Kanamycin- und Ampicillin-Resistenz; grün: Variante 179/180-Myo18-codierende Gensequenz inklusive 6x-His-Tag- und TEV-Schnittstelle-codierende Sequenzen; rot: Um 18 AS (blau) verlängerte AsLOV2-codierende Sequenz innerhalb des T7 Gens; blau: Lac-Operator.

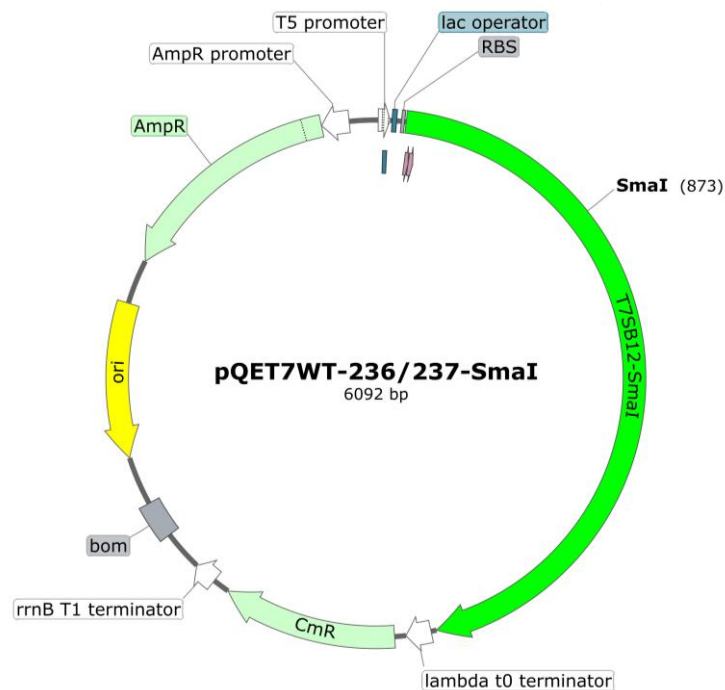


Abbildung 68: Plasmidkarte pQET7WT-236/237-SmaI (6092 bp); gelb: Replikationsursprung; hellgrün: Kanamycin- und Ampicillin-Resistenz; grün: WT-T7-RNAP-codierende Gensequenz inklusive 6x-His-Tag- und TEV-Schnittstelle-codierende Sequenzen; blau: Lac-Operator; durch QC-PCR eingefügte SmaI-Schnittstelle ist gekennzeichnet (873 bp).

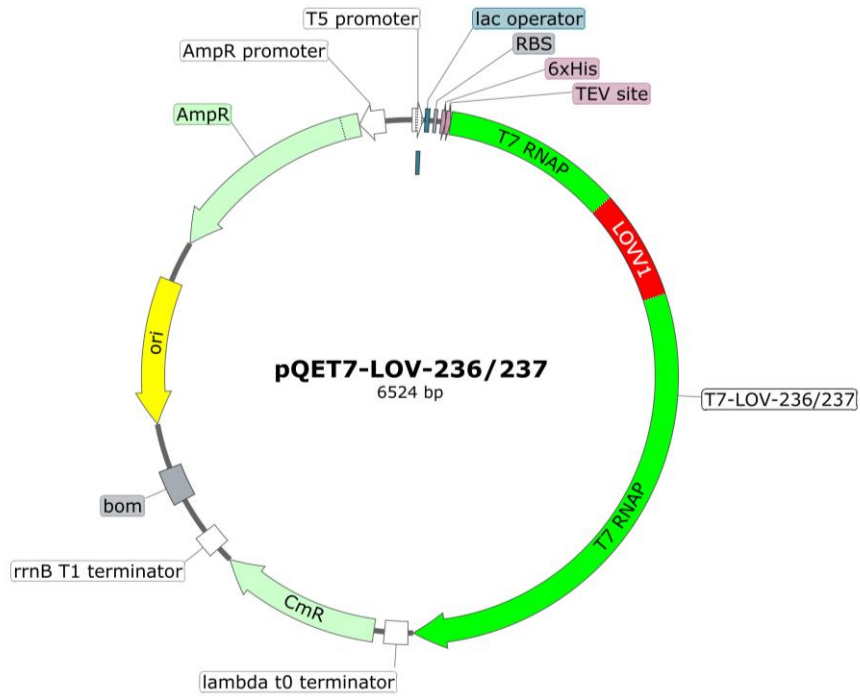


Abbildung 69: pQET7-LOV-236/237 (6524 bp); gelb: Replikationsursprung; hellgrün: Kanamycin- und Ampicillin-Resistenz; grün: Variante 236/237-codierende Gensequenz inklusive 6x-His-Tag- und TEV-Schnittstelle-codierende Sequenzen; rot: Vollängen AsLOV2-codierende Sequenz innerhalb des T7 Gens; blau: Lac-Operator.

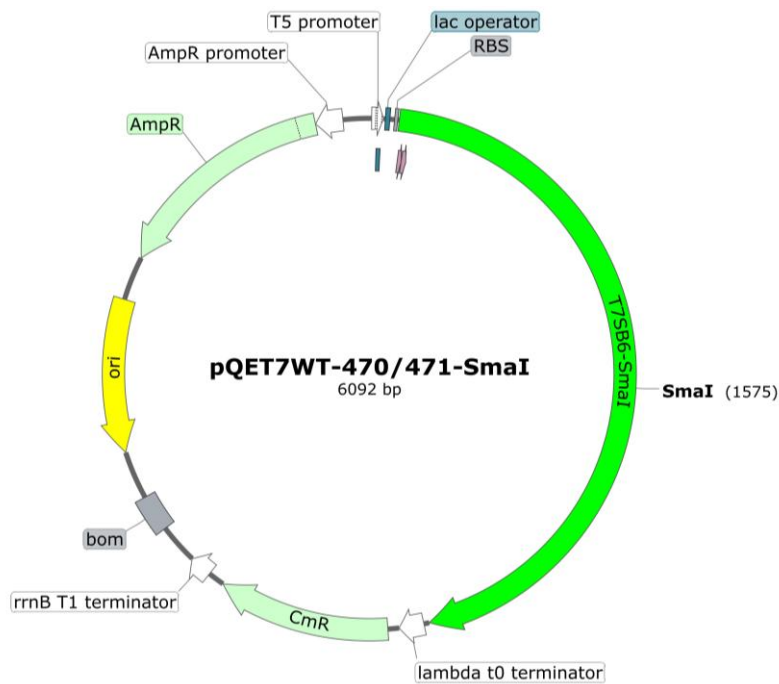


Abbildung 70: Plasmidkarte pQET7WT-470/471-SmaI (6092 bp); gelb: Replikationsursprung; hellgrün: Kanamycin- und Ampicillin-Resistenz; grün: WT-T7-RNAP-codierende Gensequenz inklusive 6x-His-Tag- und TEV-Schnittstelle-codierende Sequenzen; blau: Lac-Operator; durch QC-PCR eingefügte SmaI-Schnittstelle ist gekennzeichnet (1575 bp).

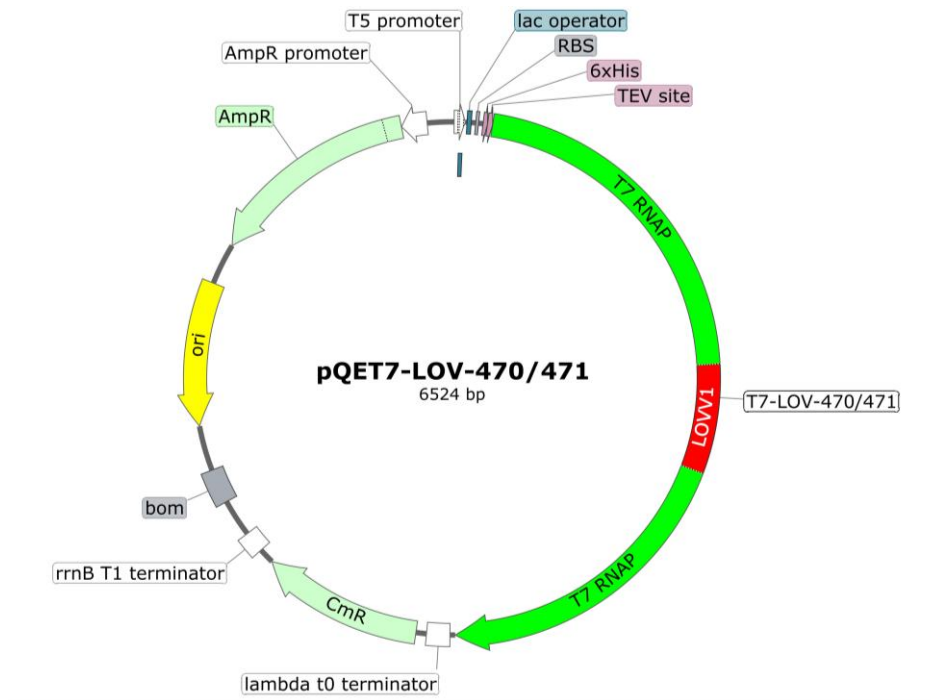


Abbildung 71: pQET7-LOV-470/471 (6524 bp); gelb: Replikationsursprung; hellgrün: Kanamycin- und Ampicillin-Resistenz; grün: Variante 470/471-codierende Gensequenz inklusive 6x-His-Tag- und TEV-Schnittstelle-codierende Sequenzen; rot: Vollängen AsLOV2-codierende Sequenz innerhalb des T7 Gens; blau: Lac-Operator.

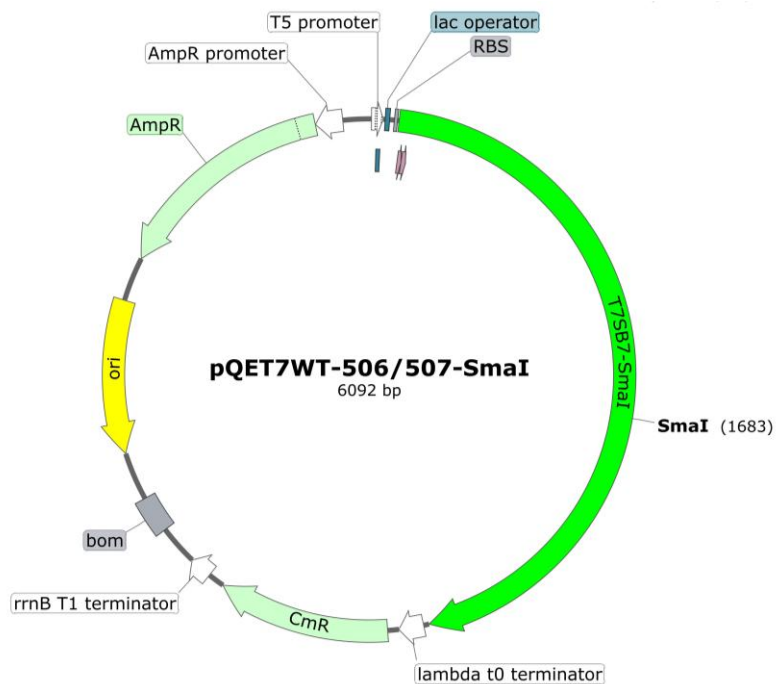


Abbildung 72: Plasmidkarte pQET7WT-506/507-SmaI (6092 bp); gelb: Replikationsursprung; hellgrün: Kanamycin- und Ampicillin-Resistenz; grün: WT-T7-RNAP-codierende Gensequenz inklusive 6x-His-Tag- und TEV-Schnittstelle-codierende Sequenzen; blau: Lac-Operator; durch QC-PCR eingefügte SmaI-Schnittstelle ist gekennzeichnet (1683 bp).

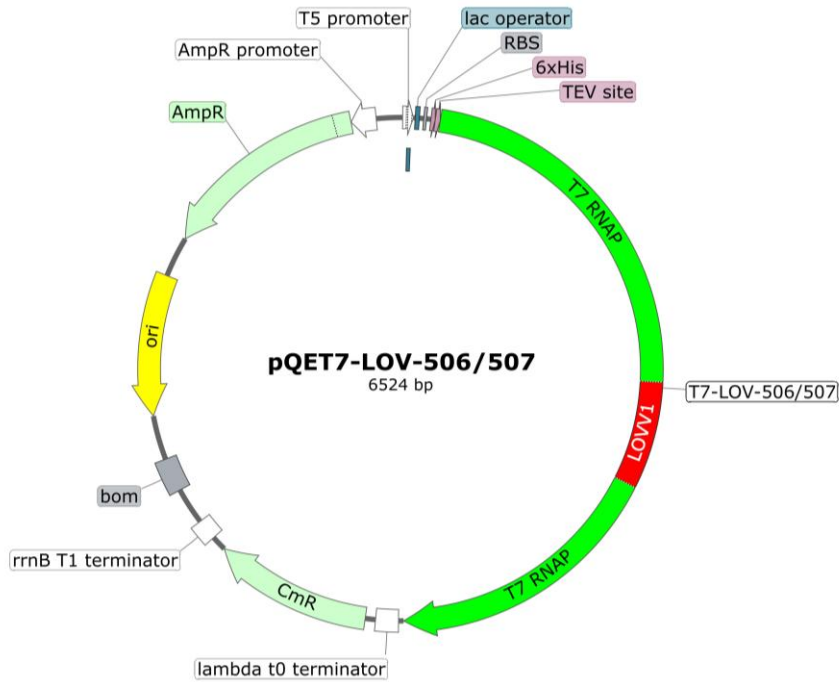


Abbildung 73: pQET7-LOV-506/507 (6524 bp); gelb: Replikationsursprung; hellgrün: Kanamycin- und Ampicillin-Resistenz; grün: Variante 506/507-codierende Gensequenz inklusive 6x-His-Tag- und TEV-Schnittstelle-codierende Sequenzen; rot: Vollängen AsLOV2-codierende Sequenz innerhalb des T7 Gens; blau: Lac-Operator.

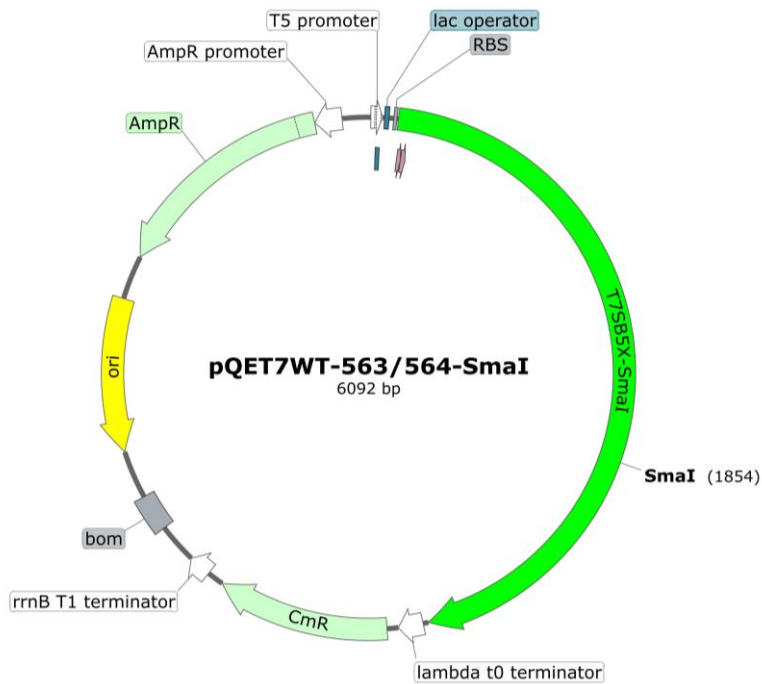


Abbildung 74: Plasmidkarte pQET7WT-563/564-SmaI (6092 bp); gelb: Replikationsursprung; hellgrün: Kanamycin- und Ampicillin-Resistenz; grün: WT-T7-RNAP-codierende Gensequenz inklusive 6x-His-Tag- und TEV-Schnittstelle-codierende Sequenzen; blau: Lac-Operator; durch QC-PCR eingefügte SmaI-Schnittstelle ist gekennzeichnet (1854 bp).

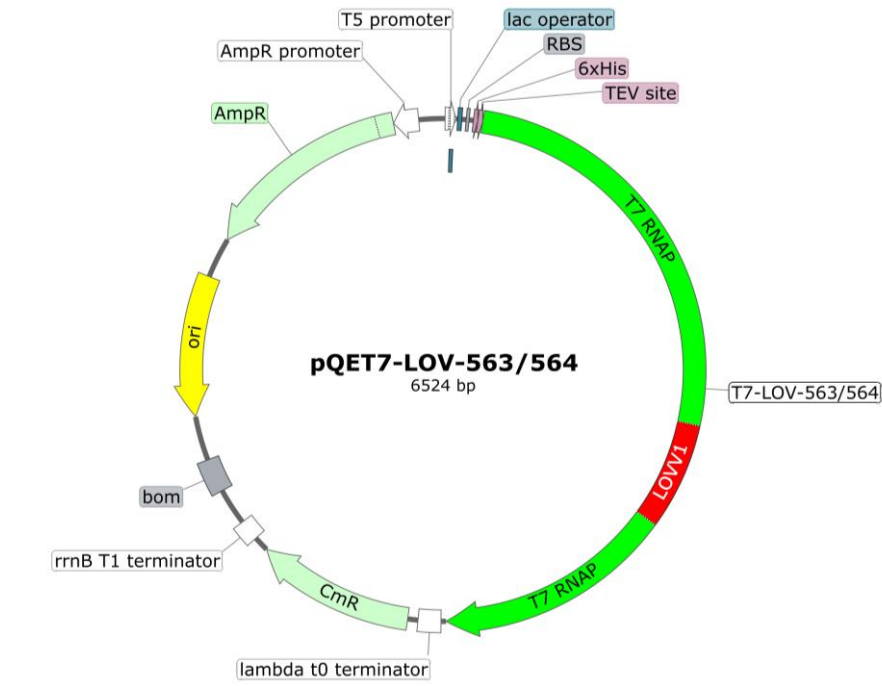


Abbildung 75: pQET7-LOV-563/564 (6524 bp); gelb: Replikationsursprung; hellgrün: Kanamycin- und Ampicillin-Resistenz; grün: Variante 563/564-codierende Gensequenz inklusive 6x-His-Tag- und TEV-Schnittstelle-codierende Sequenzen; rot: Vollängen AsLOV2-codierende Sequenz innerhalb des T7 Gens; blau: Lac-Operator.

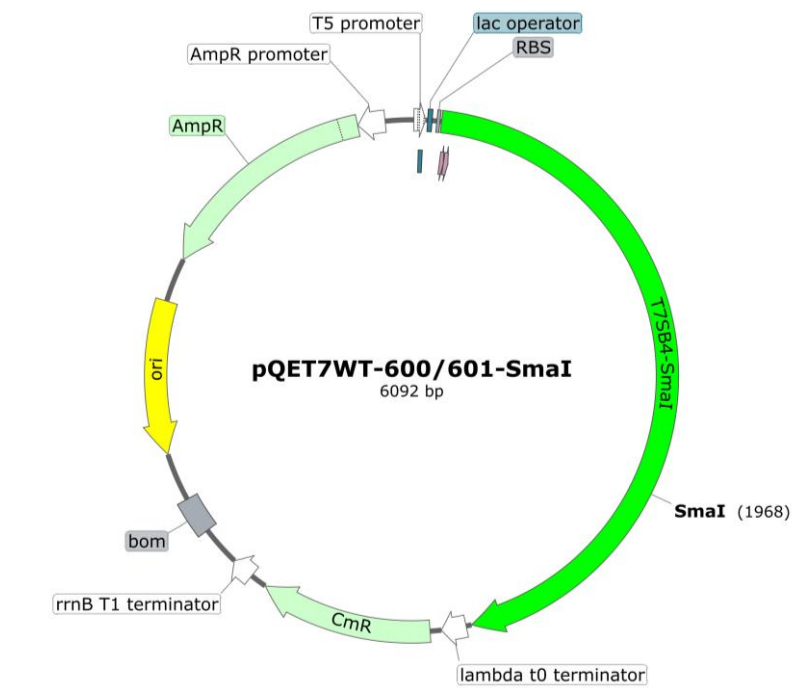


Abbildung 76: Plasmidkarte pQET7WT-600/601-SmaI (6092 bp); gelb: Replikationsursprung; hellgrün: Kanamycin- und Ampicillin-Resistenz; grün: WT-T7-RNAP-codierende Gensequenz inklusive 6x-His-Tag- und TEV-Schnittstelle-codierende Sequenzen; blau: Lac-Operator; durch QC-PCR eingefügte SmaI-Schnittstelle ist gekennzeichnet (1968 bp).

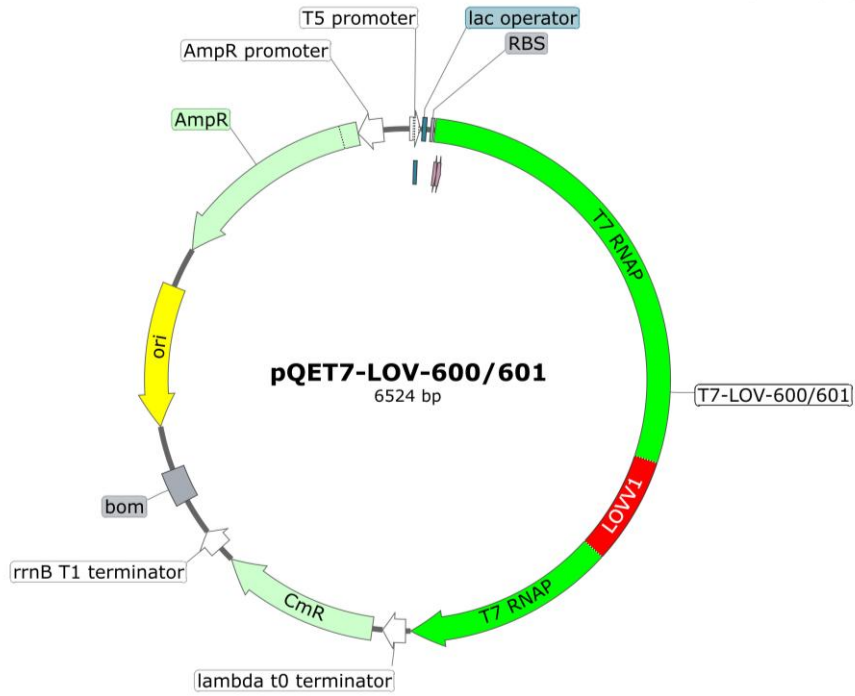


Abbildung 77: pQET7-LOV-600/601 (6524 bp); gelb: Replikationsursprung; hellgrün: Kanamycin- und Ampicillin-Resistenz; grün: Variante 600/601-codierende Gensequenz inklusive 6x-His-Tag- und TEV-Schnittstelle-codierende Sequenzen; rot: Vollängen AsLOV2-codierende Sequenz innerhalb des T7 Gens; blau: Lac-Operator.

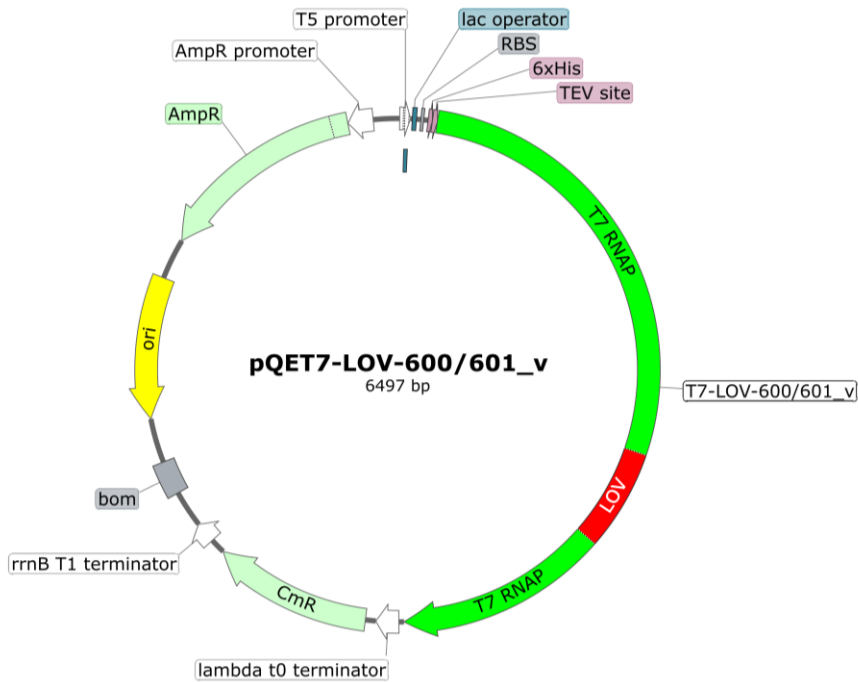


Abbildung 78: pQET7-LOV-600/601V (6497 bp); gelb: Replikationsursprung; hellgrün: Kanamycin- und Ampicillin-Resistenz; grün: Variante 600/601<sub>v</sub>-codierende Gensequenz inklusive 6x-His-Tag- und TEV-Schnittstelle-codierende Sequenzen; rot: Um 9 AS C-Terminal gekürzte AsLOV2-codierende Sequenz innerhalb des T7 Gens; blau: Lac-Operator.

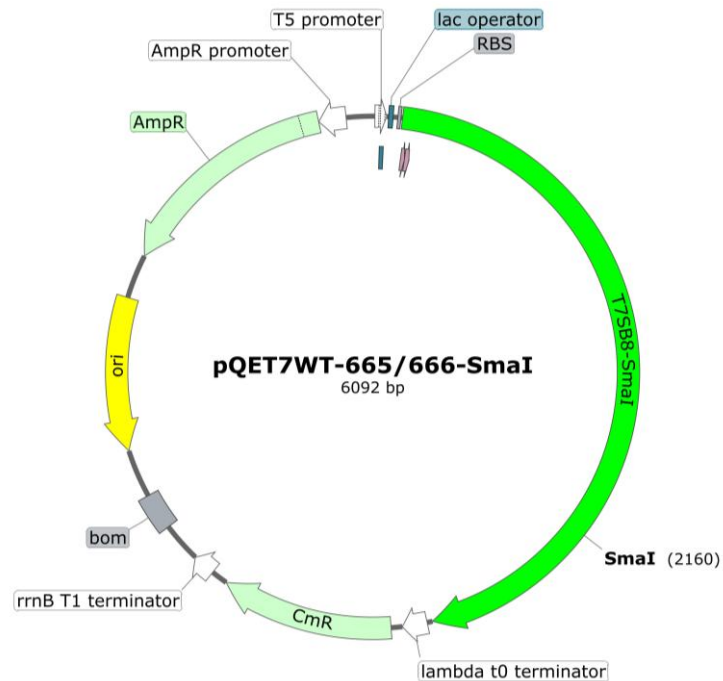


Abbildung 79: Plasmidkarte pQET7WT-665/666-SmaI (6092 bp); gelb: Replikationsursprung; hellgrün: Kanamycin- und Ampicillin-Resistenz; grün: WT-T7-RNAP-codierende Gensequenz inklusive 6x-His-Tag- und TEV-Schnittstelle-codierende Sequenzen; blau: Lac-Operator; durch QC-PCR eingefügte SmaI-Schnittstelle ist gekennzeichnet (2160 bp).

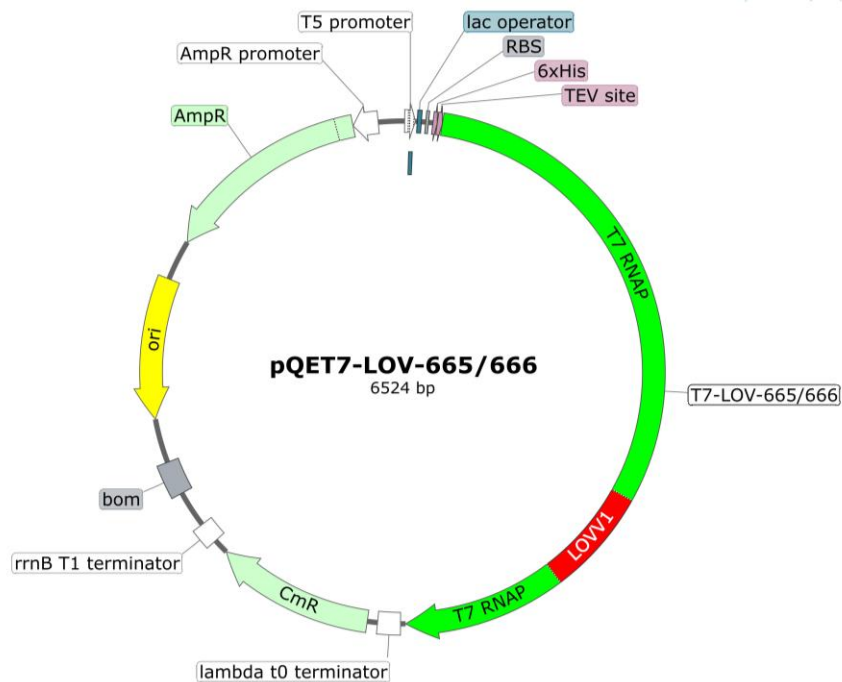


Abbildung 80: pQET7-LOV-665/666 (6524 bp); gelb: Replikationsursprung; hellgrün: Kanamycin- und Ampicillin-Resistenz; grün: Variante 600/601-codierende Gensequenz inklusive 6x-His-Tag- und TEV-Schnittstelle-codierende Sequenzen; rot: Vollängen AsLOV2-codierende Sequenz innerhalb des T7 Gens; blau: Lac-Operator.

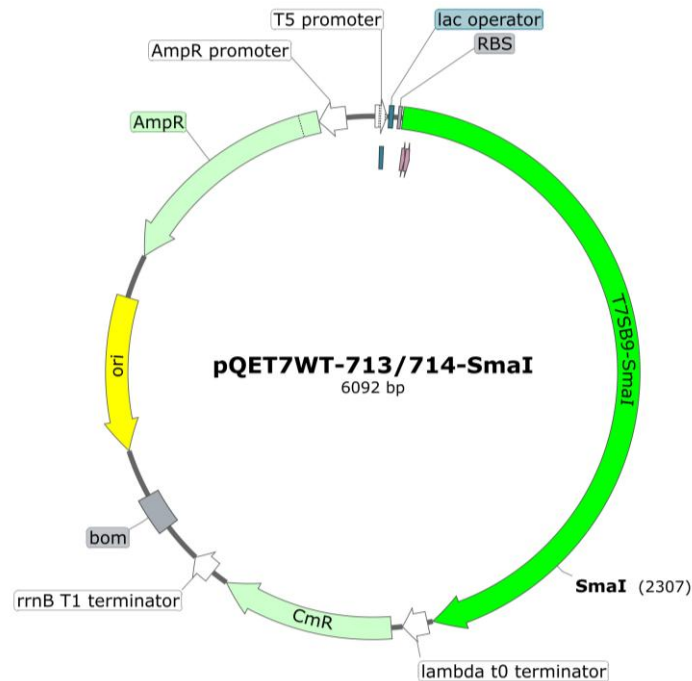


Abbildung 81: Plasmidkarte pQET7WT-713/714-SmaI (6092 bp); gelb: Replikationsursprung; hellgrün: Kanamycin- und Ampicillin-Resistenz; grün: WT-T7-RNAP-codierende Gensequenz inklusive 6x-His-Tag- und TEV-Schnittstelle-codierende Sequenzen; blau: Lac-Operator; durch QC-PCR eingefügte SmaI-Schnittstelle ist gekennzeichnet (2307 bp).

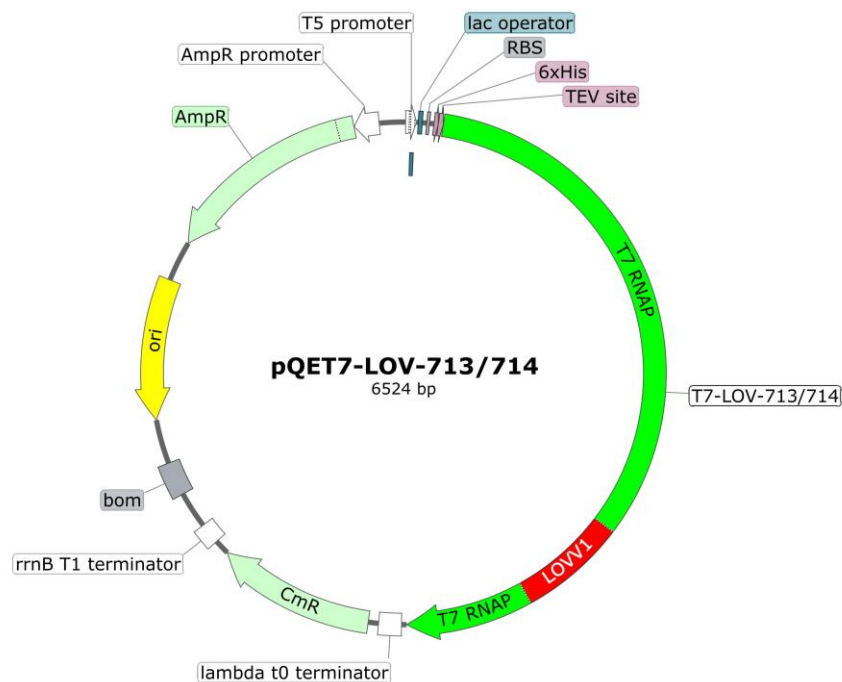


Abbildung 82: pQET7-LOV-713/714 (6524 bp); gelb: Replikationsursprung; hellgrün: Kanamycin- und Ampicillin-Resistenz; grün: Variante 713/714-codierende Gensequenz inklusive 6x-His-Tag- und TEV-Schnittstelle-codierende Sequenzen; rot: Vollängen AsLOV2-codierende Sequenz innerhalb des T7 Gens; blau: Lac-Operator.

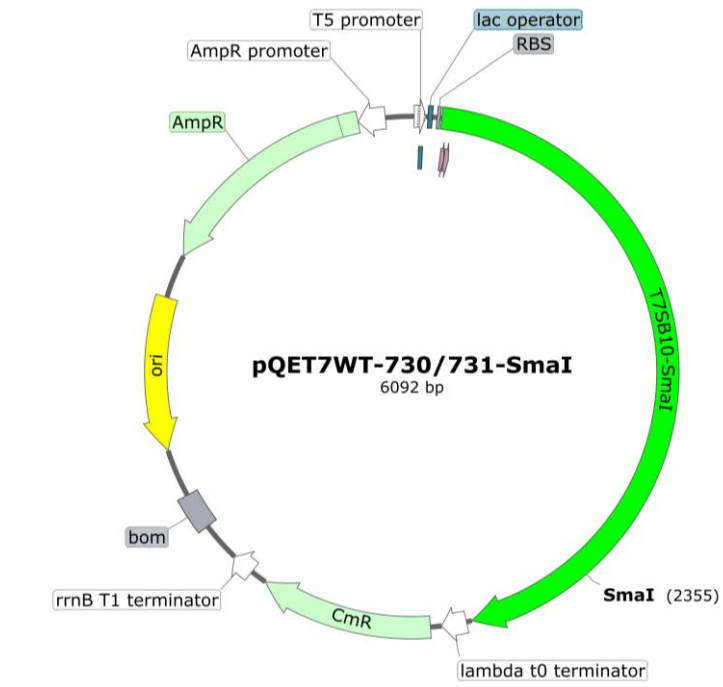


Abbildung 83: Plasmidkarte pQET7WT-730/731-SmaI (6092 bp); gelb: Replikationsursprung; hellgrün: Kanamycin- und Ampicillin-Resistenz; grün: WT-T7-RNAP-codierende Gensequenz inklusive 6x-His-Tag- und TEV-Schnittstelle-codierende Sequenzen; blau: Lac-Operator; durch QC-PCR eingefügte SmaI-Schnittstelle ist gekennzeichnet (2355 bp).

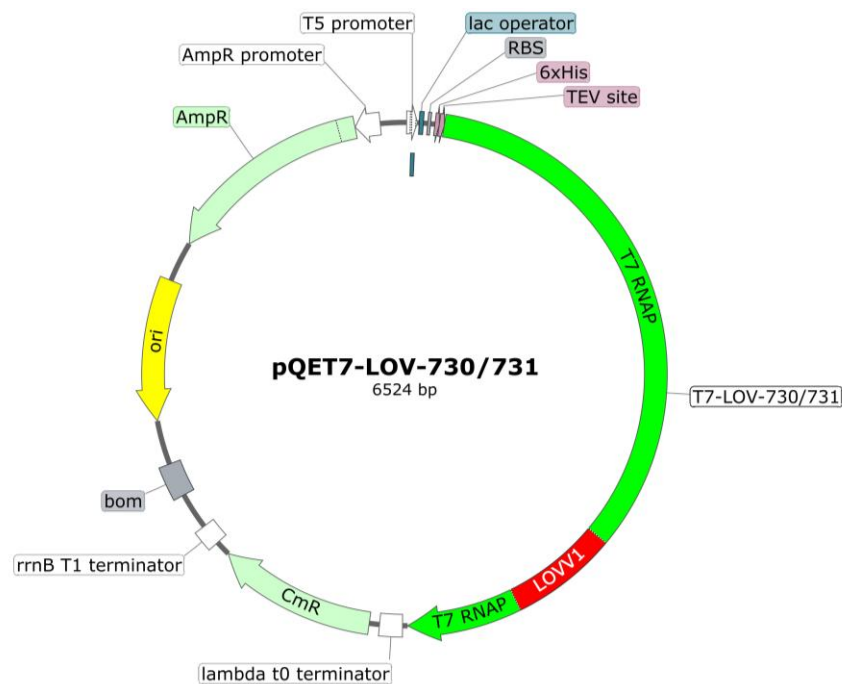


Abbildung 84: Plasmidkarte pQET7-LOV-730/731 (6524 bp); gelb: Replikationsursprung; hellgrün: Kanamycin- und Ampicillin-Resistenz; grün: Variante 730/731-codierende Gensequenz inklusive 6x-His-Tag- und TEV-Schnittstelle-codierende Sequenzen; rot: Vollängen AsLOV2-codierende Sequenz innerhalb des T7 Gens; blau: Lac-Operator.

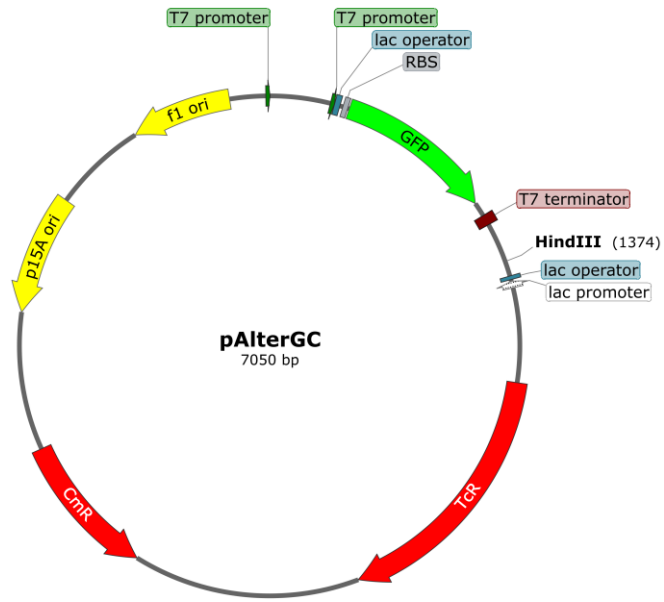


Abbildung 85: Plasmidkarte pAlterGC (7050 bp); grün: GFP-codierende Sequenz; dunkelgrün: T7-Promoter; gelb: Replikationsursprünge; rot: Chloramphenicol- und Tetracyclin-Resistenzen, braun: T7-Terminator.

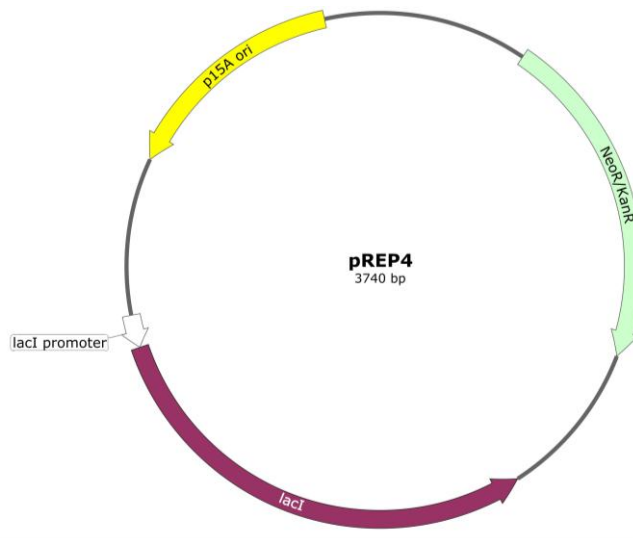


Abbildung 86: Plasmidkarte pRep4 (3740 bp); gelb: Replikationsursprung p15A; hellgrün: Kanamycin-Resistenz; weiß: lacI-Promoter; Weinrot: Lac-Repressor-codierende Sequenz.

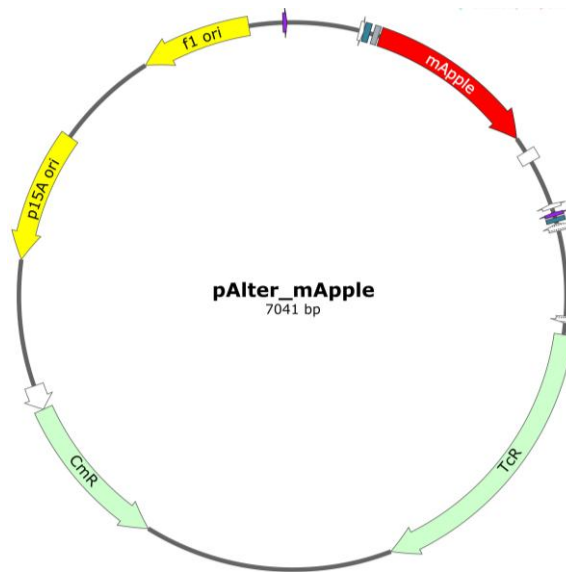


Abbildung 87: Plasmidkarte pAlter\_mApple (7041 bp); rot: RFP-codierende Sequenz; dunkelgrün: RBS; gelb: Replikationsursprünge; hellgrün: Chloramphenicol- und Tetracyclin-Resistenzen, weiß: T7-Promoter und T7-Terminator.

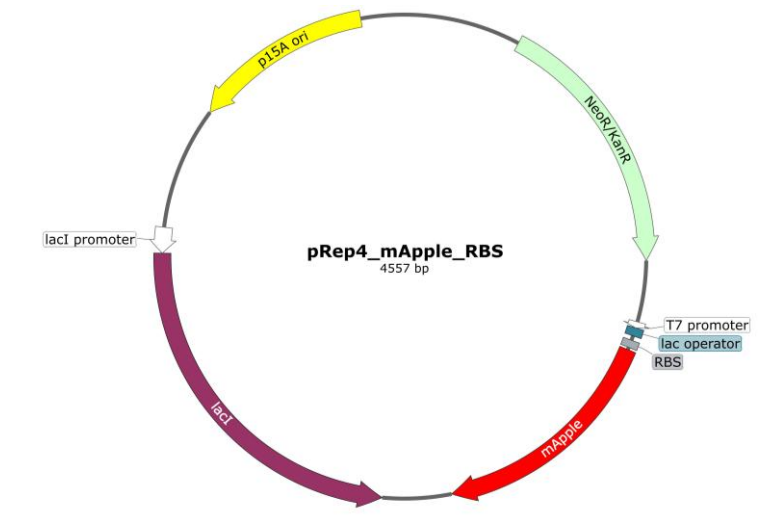


Abbildung 88: Plasmidkarte pRep4\_mApple\_RBS (4557 bp); gelb: Replikationsursprung p15A; hellgrün: Kanamycin-Resistenz; weiß: lacI-Promoter; Weinrot: Lac-Repressor-codierende Sequenz; rot: RFP mApple-codierende Gensequenz hinter dem T7-Promoter, Lac-Operator und der ribosomalen Bindestelle (RBS).

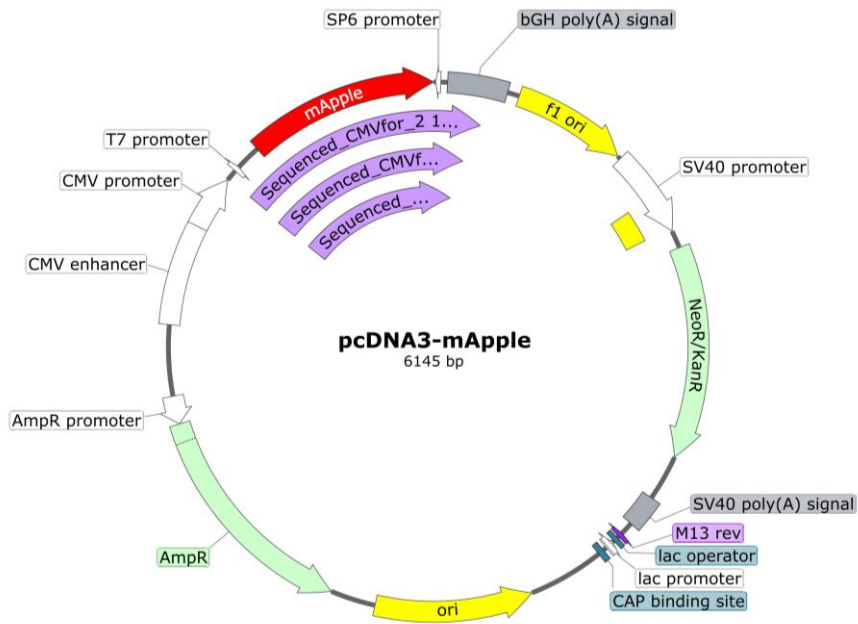


Abbildung 89: Plasmidkarte von dem von der AG Dehmelt erhaltenen Plasmid pcDNA3-mApple (6145 bp) mit der RFP mApple-codierenden Sequenz (rot); gelb: Replikationsursprünge; hellgrün: Ampicillin- und Kanamycin-Resistenzen.

## 7.2 Zusätzliche Abbildungen

### 7.2.1 Agarosegel-Bilder

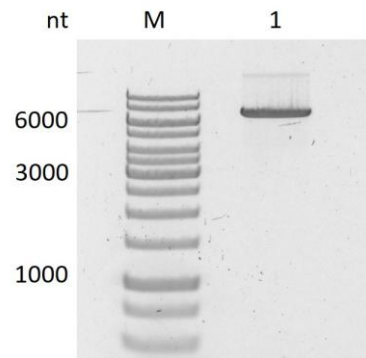


Abbildung 90: Agarosegel des linearisierten Plasmids pAlterGC. M: 3  $\mu$ L GeneRuler 1kb DNA-Leiter, Spur 1: 1  $\mu$ L linearisierte und gereinigte pAlterGC-dsDNA.

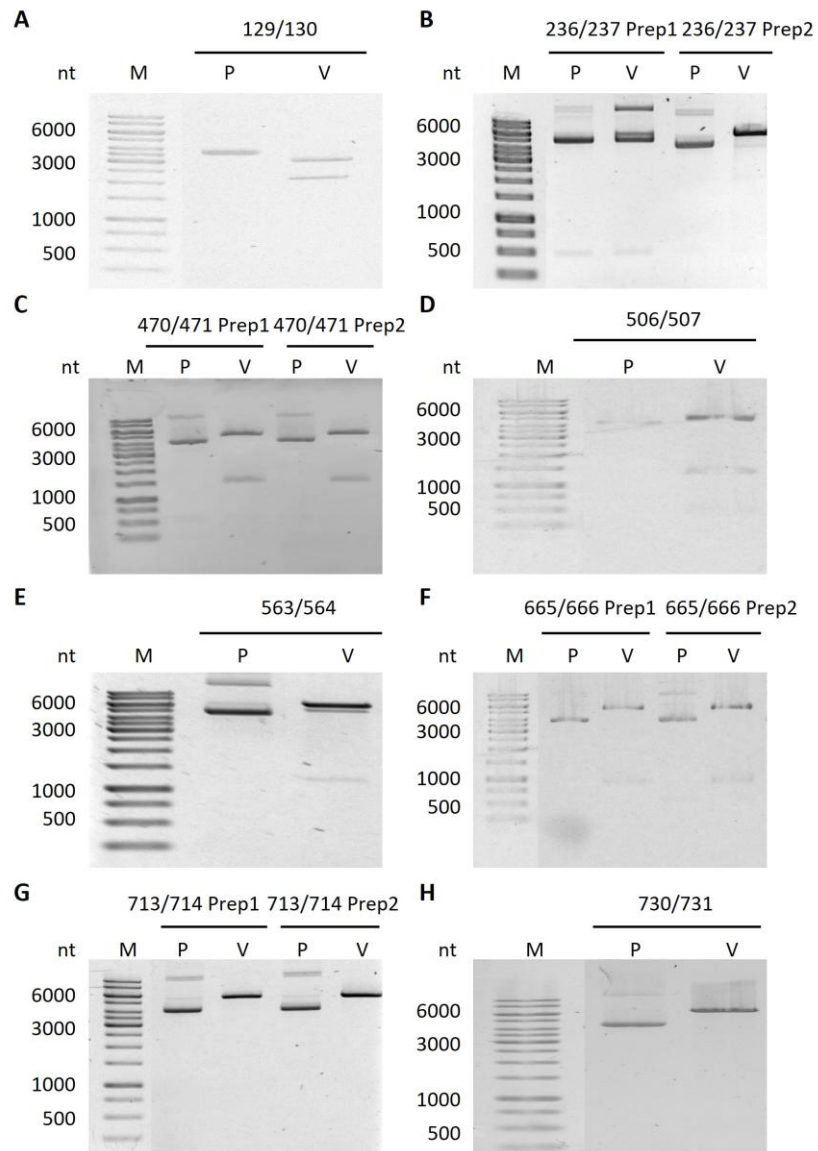


Abbildung 91: AGE der Plasmidpräparationen (P) und *Apal*-Restriktionsverdaue (V) der klonierten Gensequenzen neuer T7-RNAP-Varianten. M: 3  $\mu$ L GeneRuler 1kb DNA-Leiter.<sup>[110-111]</sup>

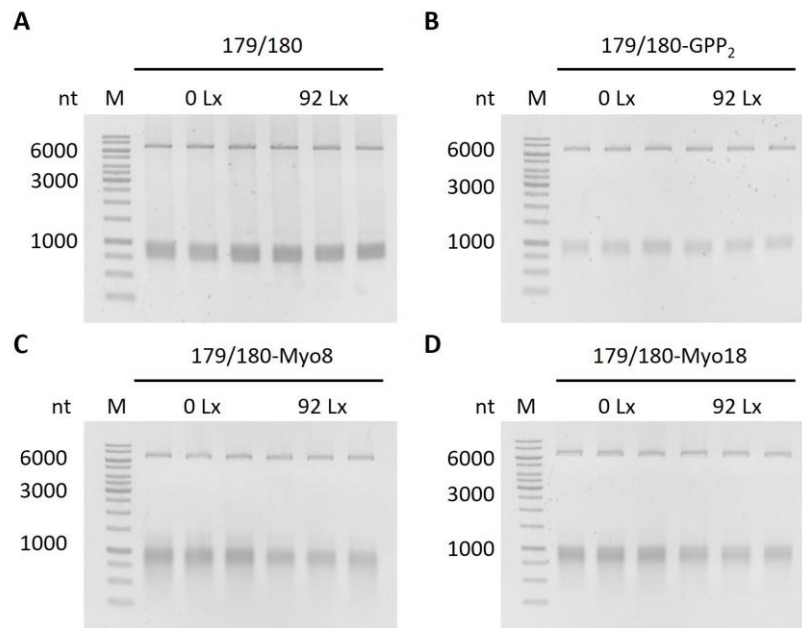


Abbildung 92: Denaturierende Agarosegele der IVT der modifizierten Varianten nach fünf Minuten Reaktionszeit. M: 3  $\mu$ L GeneRuler 1 kb DNA-Leiter, 5  $\mu$ L Reaktionsmischung je Spur. **A:** Variante 179/180, **B:** Um (GPP)<sub>2</sub> verlängerte Variante 179/180-GPP<sub>2</sub>, **C:** Um 8 AS verlängerte Variante 179/180-Myo8, **D:** Um 18 AS verlängerter Variante 179/180-Myo18.

## 7.2.2 Proteinreinigungen

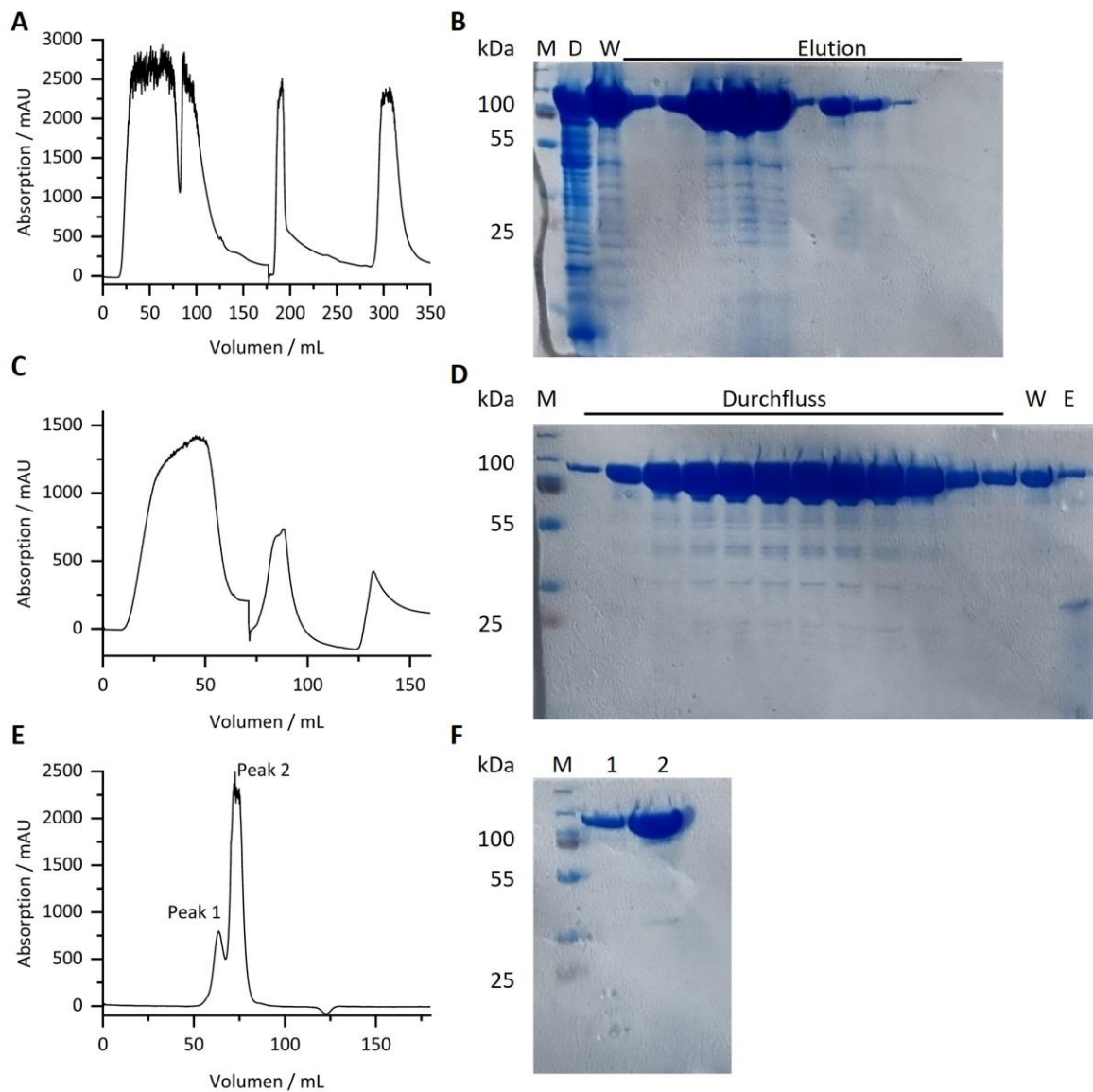


Abbildung 93: Ergebnisse der Reinigung der Variante 67/68 mit TEV-Proteaseschnittstelle zur Abtrennung des 6x-His-Tags. **A:** Chromatogramm der Ni-NTA-Chromatographie, **B:** SDS-PAGE der Ni-NTA-Chromatographie, M: 3  $\mu$ L PageRuler Plus prestained Protein Ladder, **D:** Durchfluss, W: Waschfraktion, **C:** Chromatogramm der reversen Ni-NTA-Chromatographie, **D:** SDS-PAGE der reversen Ni-NTA-Chromatographie, M: 3  $\mu$ L PageRuler Plus prestained Protein Ladder, W: Waschfraktion, E: Elution, **E:** Chromatogramm der Gelfiltration, **F:** SDS-PAGE der Gelfiltration, M: 3  $\mu$ L PageRuler Plus prestained Protein Ladder, 1: Peak 1, 2: Peak 2.<sup>[158]</sup>

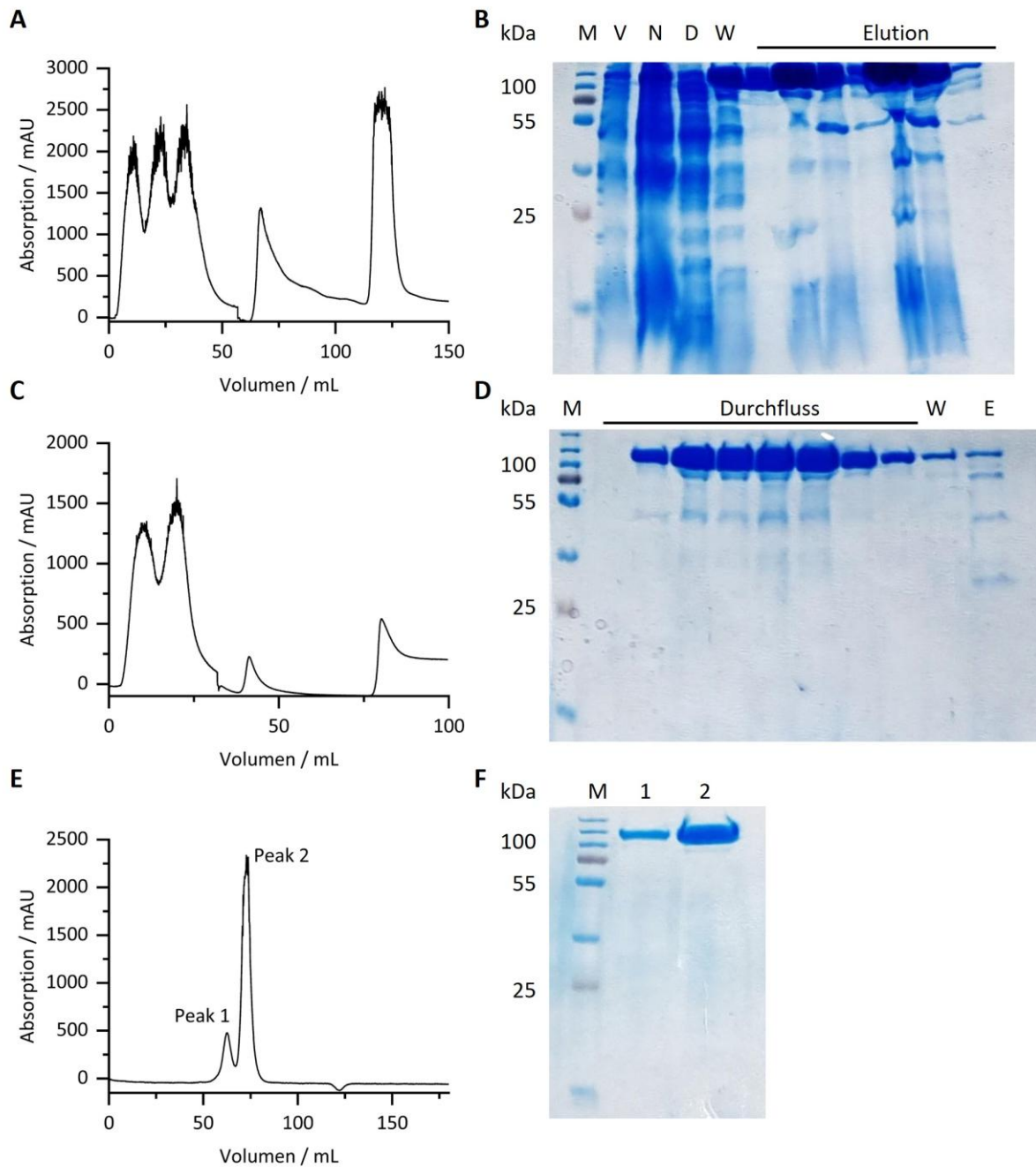


Abbildung 94: Ergebnisse der Reinigung der Variante 179/180 mit TEV-Proteaseschnittstelle zur Abtrennung des 6x-His-Tags.

**A:** Chromatogramm der Ni-NTA-Chromatographie, **B:** SDS-PAGE der Ni-NTA-Chromatographie, M: 3  $\mu$ L PageRuler Plus prestained Protein Ladder, V: Zellprobe vor Induktion mit IPTG, N: Zellprobe nach Expression des Zielproteins, D: Durchfluss, W: Waschfraktion, **C:** Chromatogramm der reversen Ni-NTA-Chromatographie, **D:** SDS-PAGE der reversen Ni-NTA-Chromatographie, M: 3  $\mu$ L PageRuler Plus prestained Protein Ladder, W: Waschfraktion, E: Elution, **E:** Chromatogramm der Gelfiltration, **F:** SDS-PAGE der Gelfiltration, M: 3  $\mu$ L PageRuler Plus prestained Protein Ladder, 1: Peak 1, 2: Peak 2.<sup>[158]</sup>

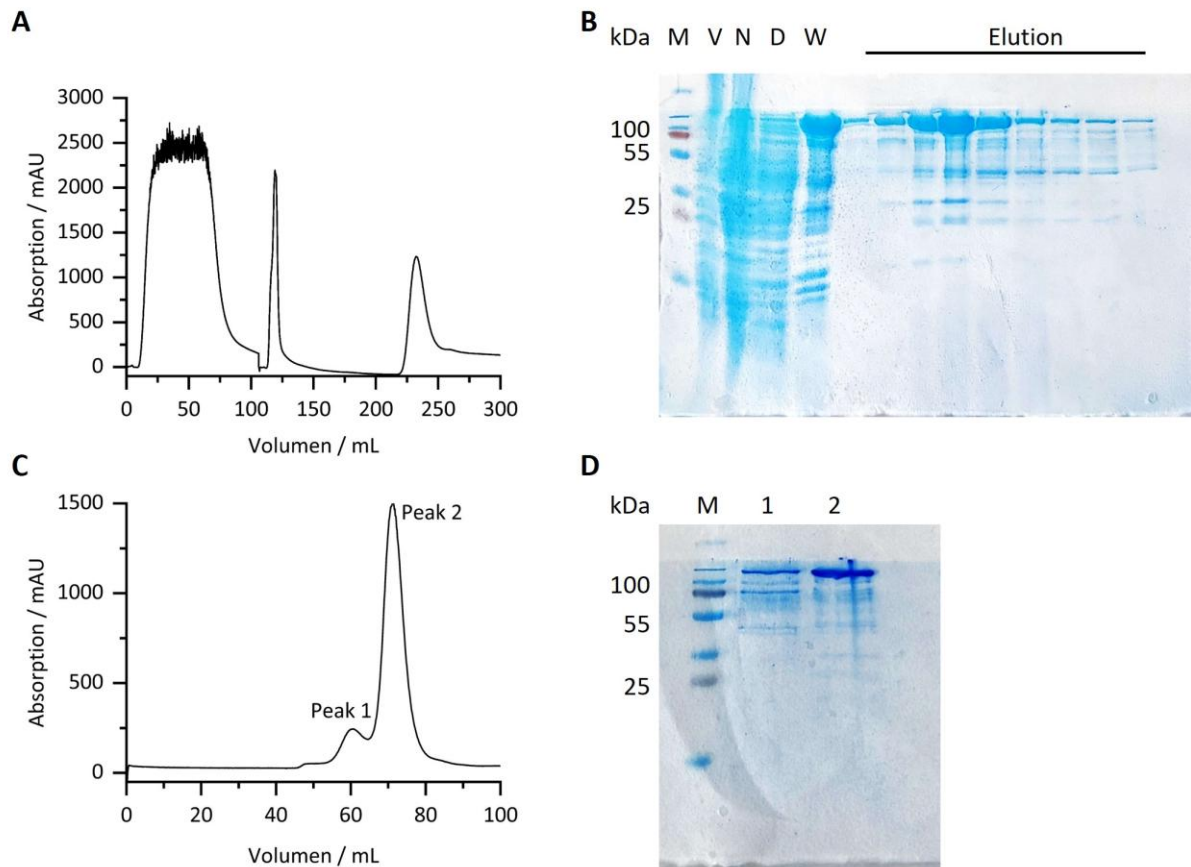


Abbildung 95: Ergebnisse der Reinigung der Variante 600/601 mit TEV-Proteaseschnittstelle zur Abtrennung des 6x-His-Tags.

**A:** Chromatogramm der Ni-NTA-Chromatographie, **B:** SDS-PAGE der Ni-NTA-Chromatographie, M: 3  $\mu$ L PageRuler Plus prestained Protein Ladder, V: Zellprobe vor Induktion mit IPTG, N: Zellprobe nach Expression des Zielproteins, D: Durchfluss, W: Waschfraktion, **C:** Chromatogramm der Gelfiltration, **D:** SDS-PAGE der Gelfiltration, M: 3  $\mu$ L PageRuler Plus prestained Protein Ladder, 1: Peak 1, 2: Peak 2.

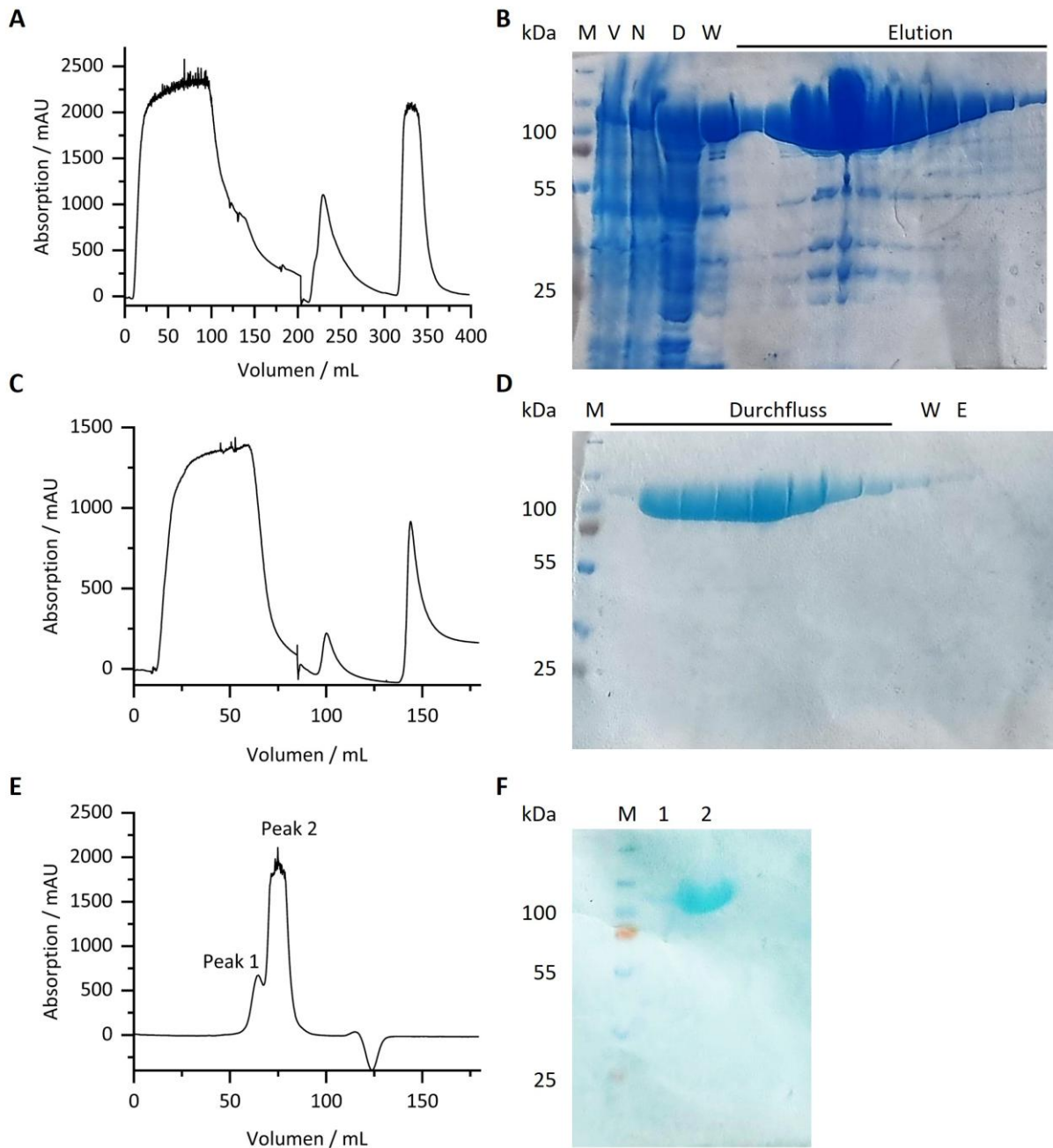


Abbildung 96: Ergebnisse der Reinigung der verkürzten Variante 67/68<sub>v</sub> mit TEV-Proteaseschnittstelle zur Abtrennung des 6x-His-Tags. **A:** Chromatogramm der Ni-NTA-Chromatographie, **B:** SDS-PAGE der Ni-NTA-Chromatographie, M: 3  $\mu$ L PageRuler Plus prestained Protein Ladder, V: Zellprobe vor Induktion mit IPTG, N: Zellprobe nach Expression des Zielproteins, D: Durchfluss, W: Waschfraktion, **C:** Chromatogramm der reversen Ni-NTA-Chromatographie, **D:** SDS-PAGE der reversen Ni-NTA-Chromatographie, M: 3  $\mu$ L PageRuler Plus prestained Protein Ladder, W: Waschfraktion, E: Elution, **E:** Chromatogramm der Gelfiltration, **F:** SDS-PAGE der Gelfiltration, M: 3  $\mu$ L PageRuler Plus prestained Protein Ladder, 1: Peak 1, 2: Peak 2.

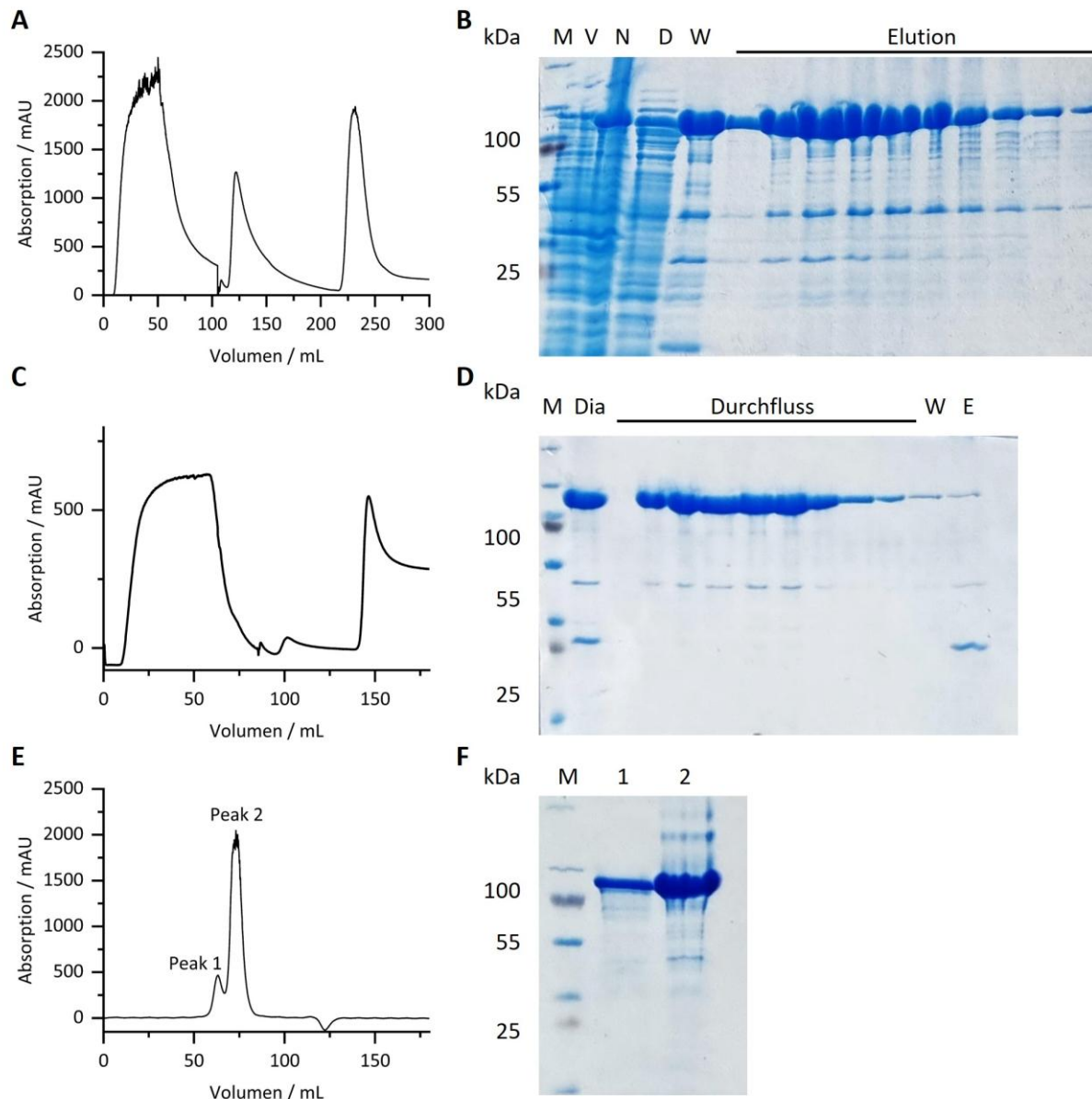


Abbildung 97: Ergebnisse der Reinigung der verkürzten Variante 179/180, mit TEV-Proteaseschnittstelle zur Abtrennung des 6x-His-Tags. **A:** Chromatogramm der Ni-NTA-Chromatographie, **B:** SDS-PAGE der Ni-NTA-Chromatographie, M: 3  $\mu$ L PageRuler Plus prestained Protein Ladder, V: Zellprobe vor Induktion mit IPTG, N: Zellprobe nach Expression des Zielproteins, D: Durchfluss, W: Waschfraktion, **C:** Chromatogramm der reversen Ni-NTA-Chromatographie, **D:** SDS-PAGE der reversen Ni-NTA-Chromatographie, M: 3  $\mu$ L PageRuler Plus prestained Protein Ladder, Dia: Probe des Dialysats nach erfolgter Dialyse mit TEV-Protease, W: Waschfraktion, E: Elution, **E:** Chromatogramm der Gelfiltration, **F:** SDS-PAGE der Gelfiltration, M: 3  $\mu$ L PageRuler Plus prestained Protein Ladder, 1: Peak 1, 2: Peak 2.

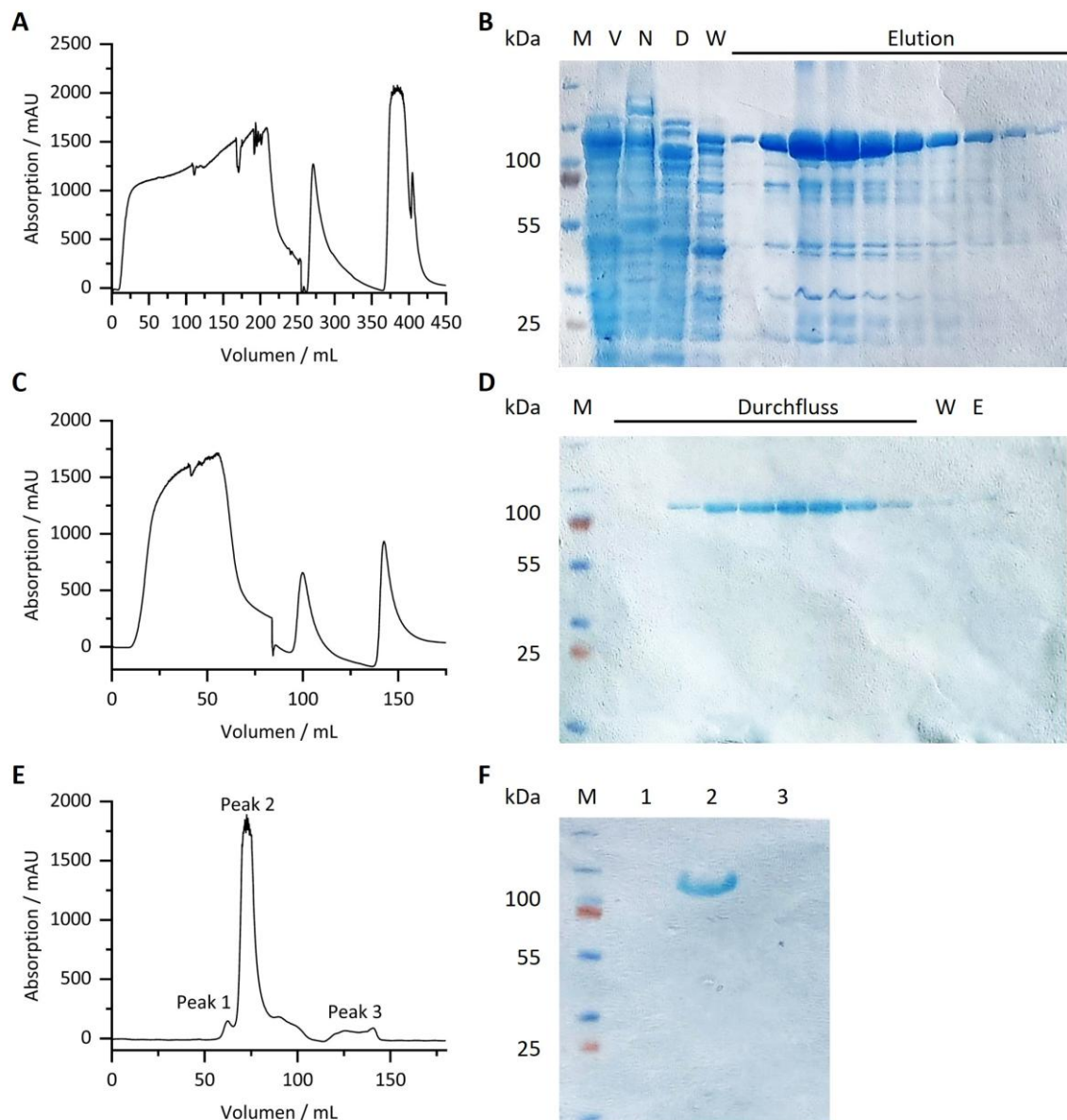


Abbildung 98: Reinigung der Variante 600/601<sub>v</sub> mit verkürzter J $\alpha$ -Helix. **A:** Chromatogramm der Ni-NTA-Chromatographie, **B:** SDS-PAGE der Ni-NTA-Chromatographie, M: 3  $\mu$ L PageRuler Plus prestained Protein Ladder, V: Zellprobe vor Induktion mit IPTG, N: Zellprobe nach durchgeführter Expression, D: Durchfluss, W: Waschfraktion, E: Elution, **C:** Chromatogramm der reversen Ni-NTA-Chromatographie, **D:** SDS-PAGE der umgekehrten Ni-NTA-Chromatographie, M: 3  $\mu$ L PageRuler Plus prestained Protein Ladder, W: Waschfraktion, E: Elution, **E:** Chromatogramm der Gelfiltration, **F:** SDS-PAGE der SEC, M: 3  $\mu$ L PageRuler Plus prestained Protein Ladder, 1: Peak 1, 2: Peak 2, 3: Peaks 3.

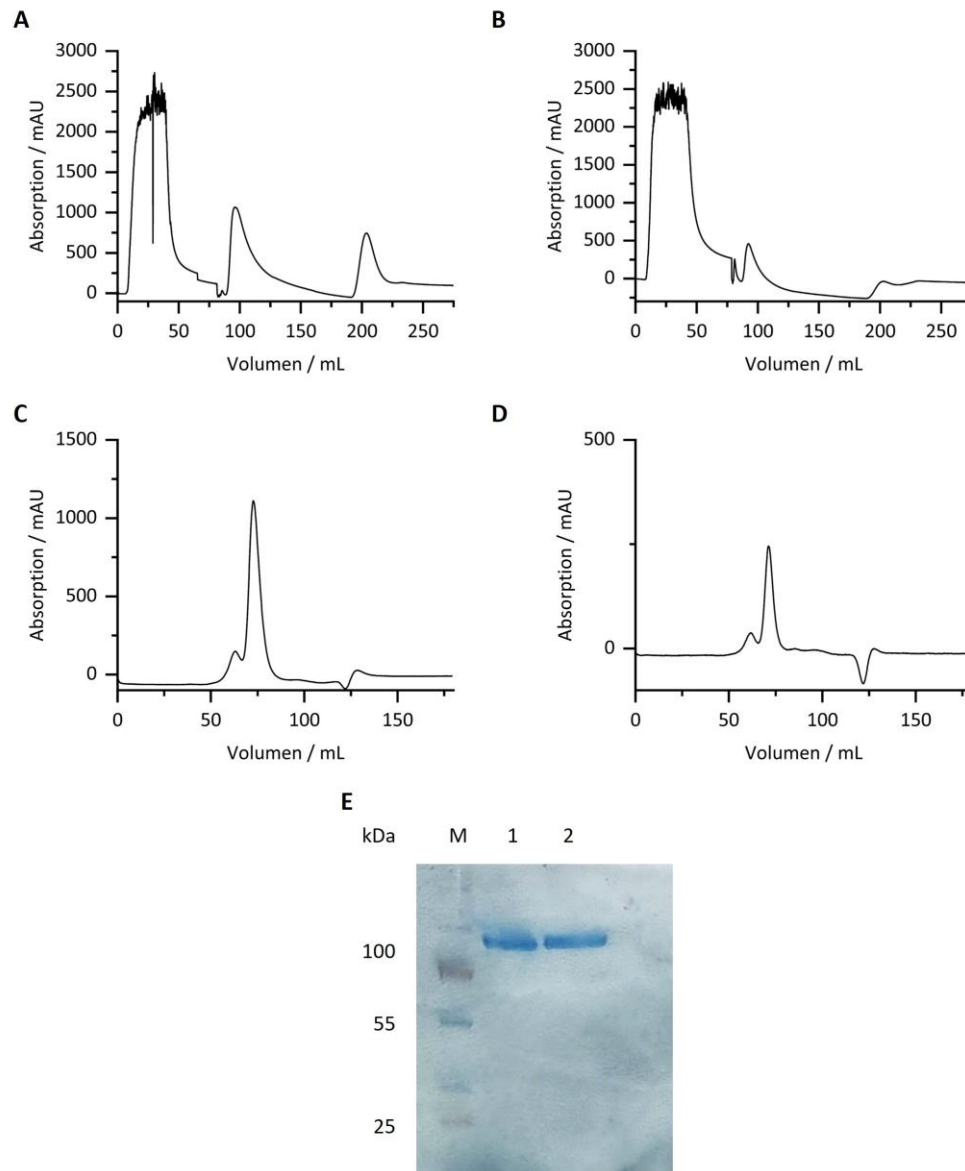


Abbildung 99: Ergebnisse der Reinigung der Myosin-verlängerten Varianten des Fusionsproteins 179/180 mit TEV-Proteaseschnittstelle zur Abtrennung des 6x-His-Tags. **A:** Chromatogramm der Ni-NTA-Chromatographie der Variante 179/180-Myo8, **B:** Chromatogramm der Ni-NTA-Chromatographie der Variante 179/180-Myo18, **C:** Chromatogramm der Gelfiltration der Variante 179/180-Myo8, **D:** Chromatogramm der Gelfiltration der Variante 179/180-Myo18, **E:** SDS-PAGE der Proteine nach Gelfiltration, M: 3  $\mu$ L PageRuler Plus prestained Protein Ladder, 1: Variante 179/180-Myo8, 2: 179/180-Myo18.

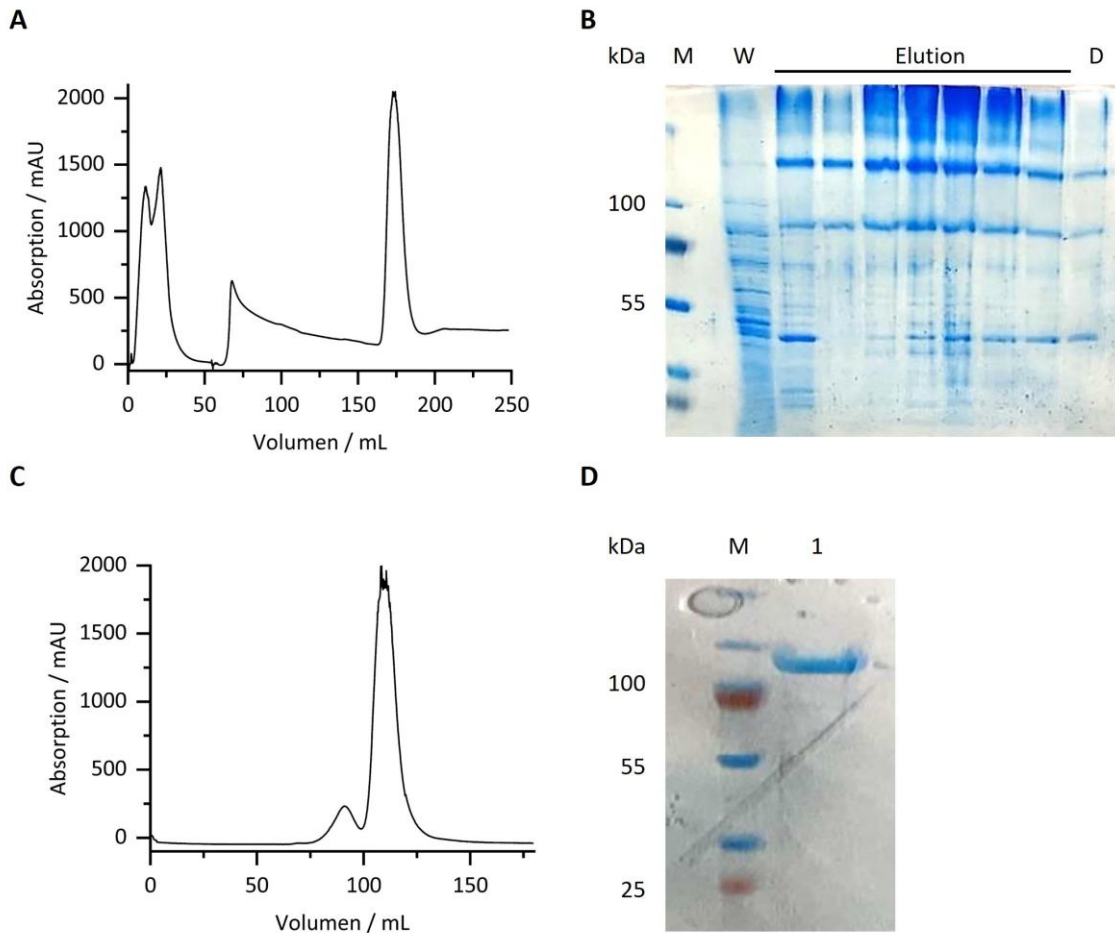


Abbildung 100: Ergebnisse der Reinigung der  $(GPP)_2$ -verlängerten Variante des Fusionsproteins 179/180 mit TEV-Proteaseschnittstelle zur Abtrennung des 6x-His-Tags. **A**: Chromatogramm der Ni-NTA-Chromatographie, **B**: SDS-PAGE der Ni-NTA-Chromatographie, M: 3  $\mu$ L PageRuler Plus prestained Protein Ladder, , D: Durchfluss, W: Waschfraktion, **C**: Chromatogramm der Gelfiltration, **D**: SDS-PAGE der Gelfiltration, M: 3  $\mu$ L PageRuler Plus prestained Protein Ladder, 1: Variante 179/180-GPP<sub>2</sub>.<sup>[116]</sup>

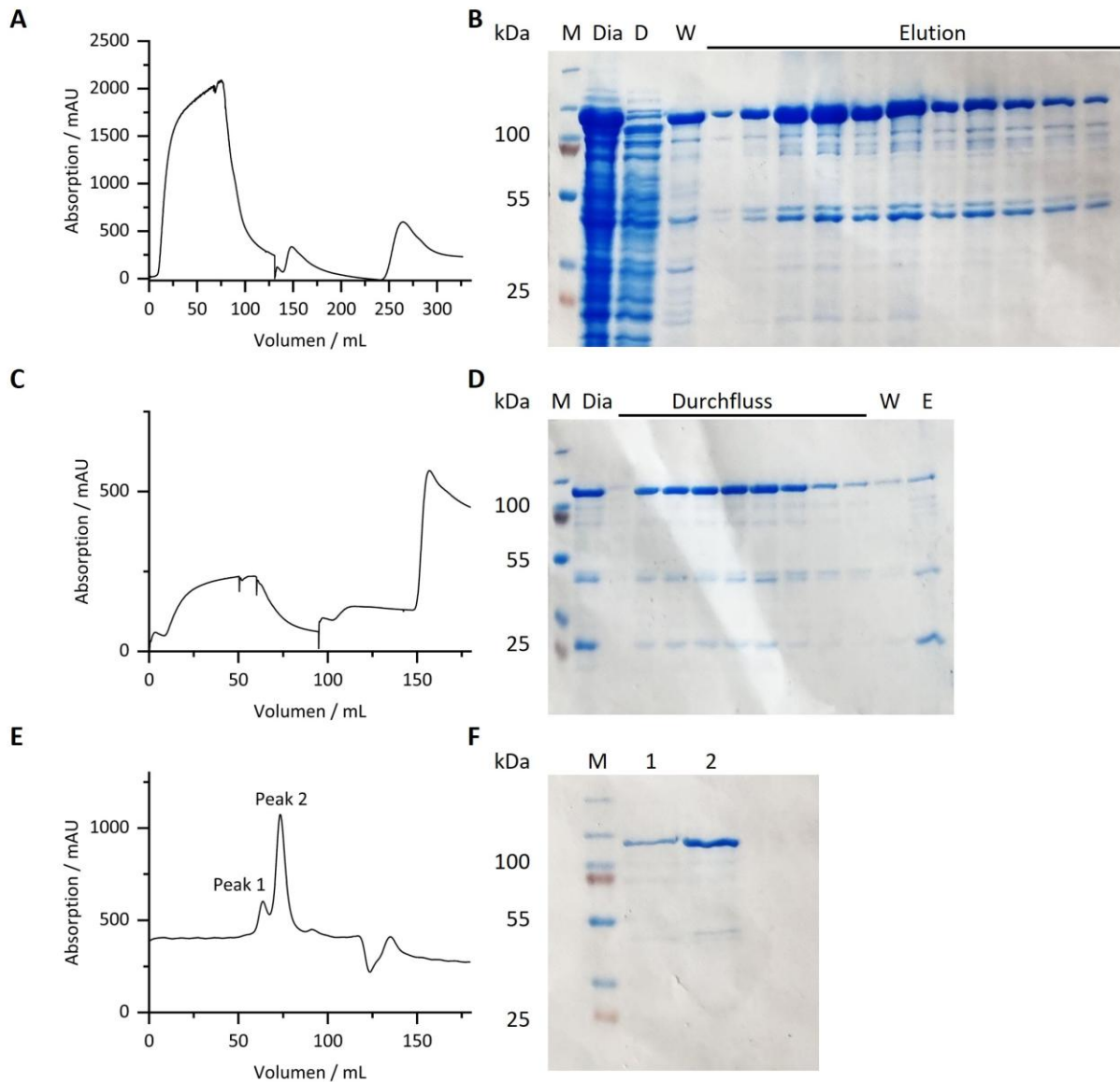


Abbildung 101: Ergebnisse der Reinigung der verkürzten Variante 179/180<sub>v</sub> mit C450A-Mutation und TEV-Proteaseschnittstelle zur Abtrennung des 6x-His-Tags. **A:** Chromatogramm der Ni-NTA-Chromatographie, **B:** SDS-PAGE der Ni-NTA-Chromatographie, M: 3  $\mu$ L PageRuler Plus prestained Protein Ladder, Dia: Probe des Überstands des zentrifugierten Dialysats, D: Durchfluss, W: Waschfraktion, **C:** Chromatogramm der reversen Ni-NTA-Chromatographie, **D:** SDS-PAGE der reversen Ni-NTA-Chromatographie, M: 3  $\mu$ L PageRuler Plus prestained Protein Ladder, Dia: Probe des Dialysats, W: Waschfraktion, E: Elution, **E:** Chromatogramm der Gelfiltration, **F:** SDS-PAGE der Gelfiltration, M: 3  $\mu$ L PageRuler Plus prestained Protein Ladder, 1: Peak 1, 2: Peak 2.

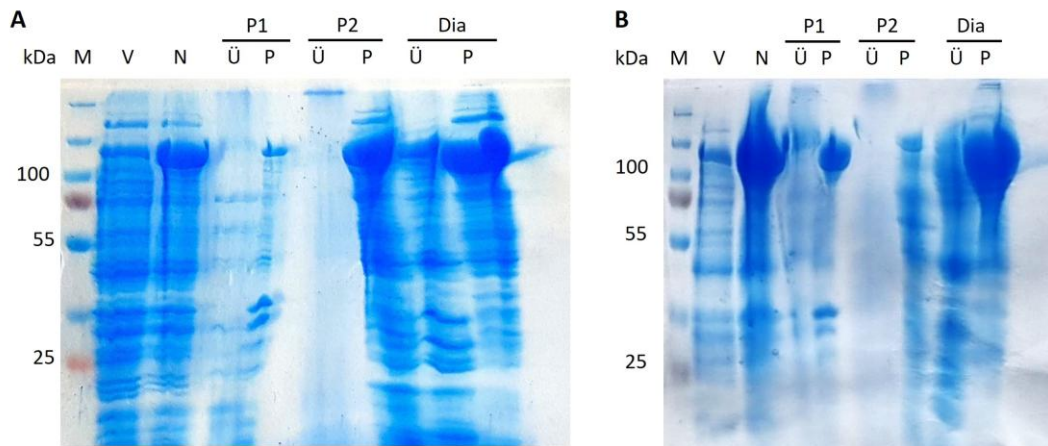


Abbildung 102: Bilder der SDS-PAGE- der Expression und Aufreinigung der beiden unlöslichen Varianten. M: PageRuler plus prestained protein ladder (10-250 kDa), V: Zellprobe vor Induktion mit IPTG, N: Zellprobe nach Expression des Zielproteins, P1: Proben der PEI-Fällungsreaktion, P2: Proben der Ammoniumsulfatfällung, Dia: Proben nach erfolgter Dialyse, P: Probe aus dem Pellet, Ü: Probe des Überstands. **A:** Variante 563/564, **B:** Variante 7730/731.<sup>[111]</sup>

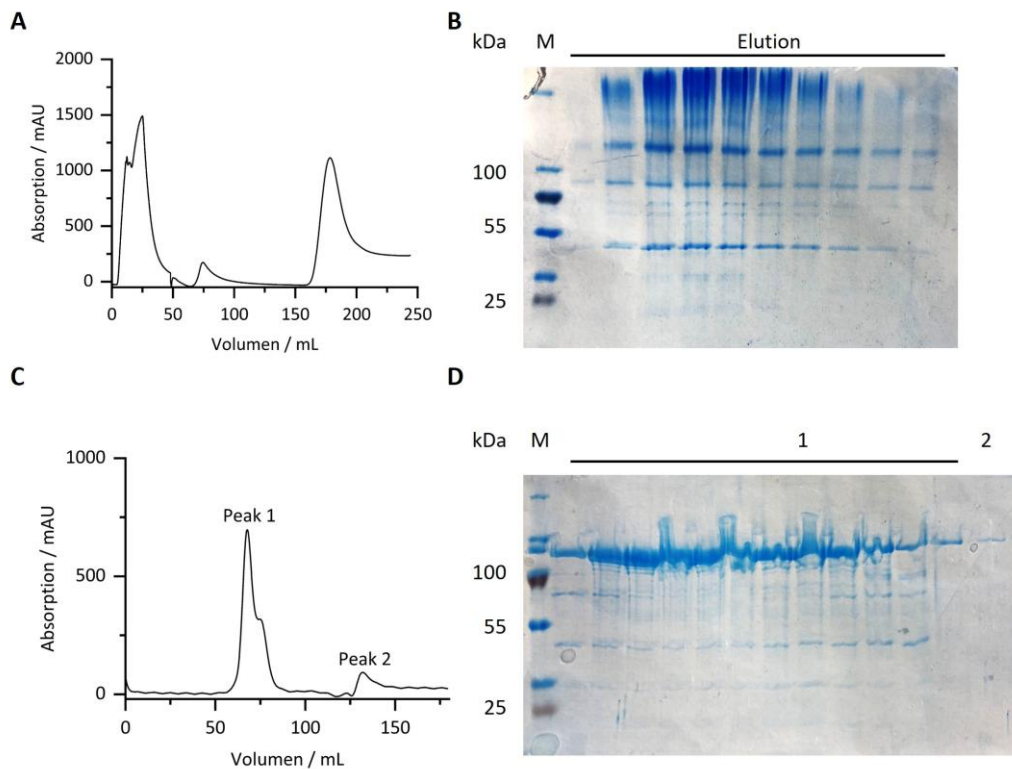


Abbildung 103: Ergebnisse der Reinigung der Variante 470/471. **A:** Chromatogramm der Ni-NTA-Chromatographie, **B:** SDS-PAGE der Ni-NTA-Chromatographie, M: 3  $\mu$ L PageRuler Plus prestained Protein Ladder, **C:** Chromatogramm der Gelfiltration, **D:** SDS-PAGE der Gelfiltration, M: 3  $\mu$ L PageRuler Plus prestained Protein Ladder, 1: Peak 1, 2: Peak 2.<sup>[110]</sup>

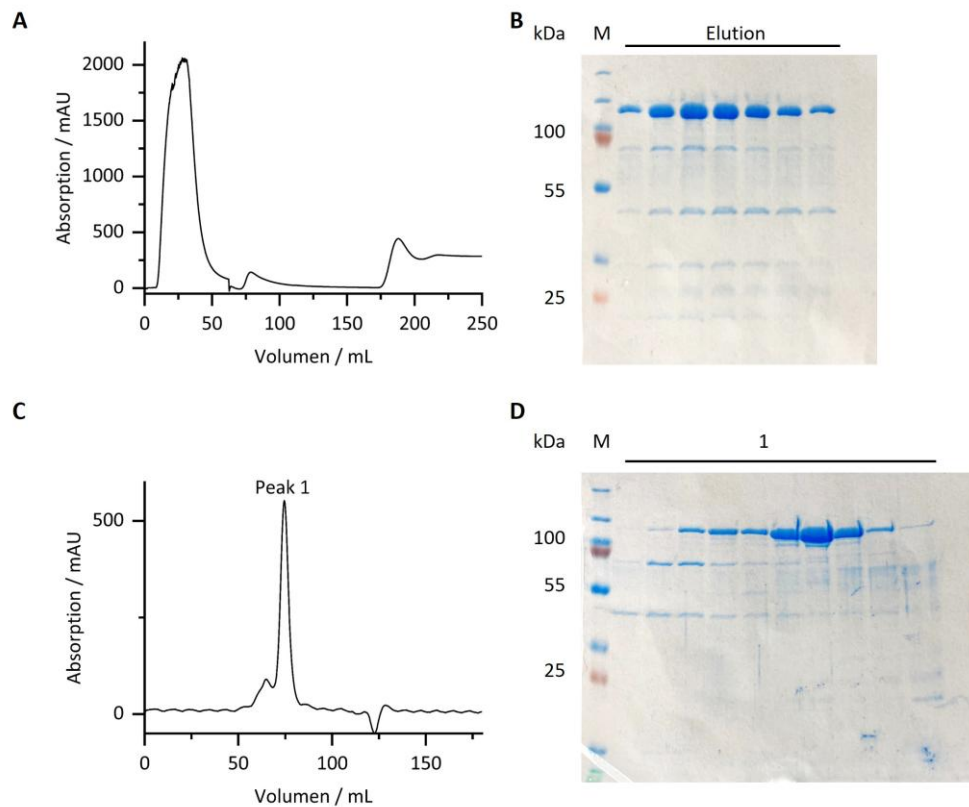


Abbildung 104: Ergebnisse der Reinigung der Variante 506/507. **A:** Chromatogramm der Ni-NTA-Chromatographie, **B:** SDS-PAGE der Ni-NTA-Chromatographie, M: 3  $\mu$ L PageRuler Plus prestained Protein Ladder, **C:** Chromatogramm der Gelfiltration, **D:** SDS-PAGE der Gelfiltration, M: 3  $\mu$ L PageRuler Plus prestained Protein Ladder, 1: Peak 1.<sup>[110]</sup>

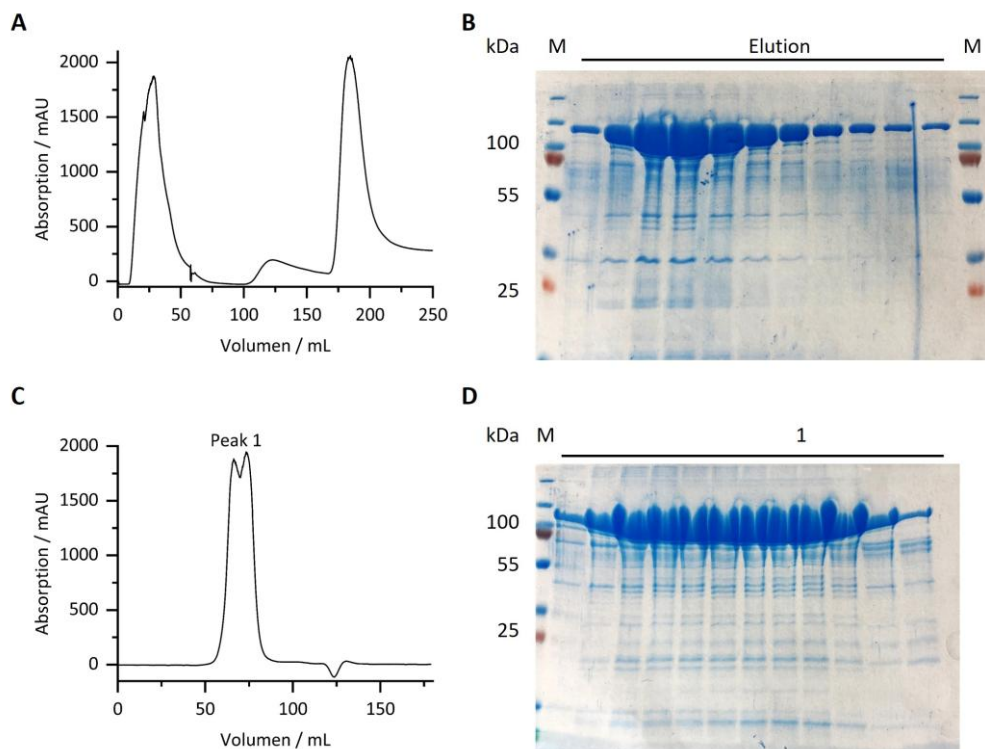


Abbildung 105: Ergebnisse der Reinigung der Variante 665/666. **A:** Chromatogramm der Ni-NTA-Chromatographie, **B:** SDS-PAGE der Ni-NTA-Chromatographie, M: 3  $\mu$ L PageRuler Plus prestained Protein Ladder, **C:** Chromatogramm der Gelfiltration, **D:** SDS-PAGE der Gelfiltration, M: 3  $\mu$ L PageRuler Plus prestained Protein Ladder, 1: Peak 1.<sup>[110]</sup>

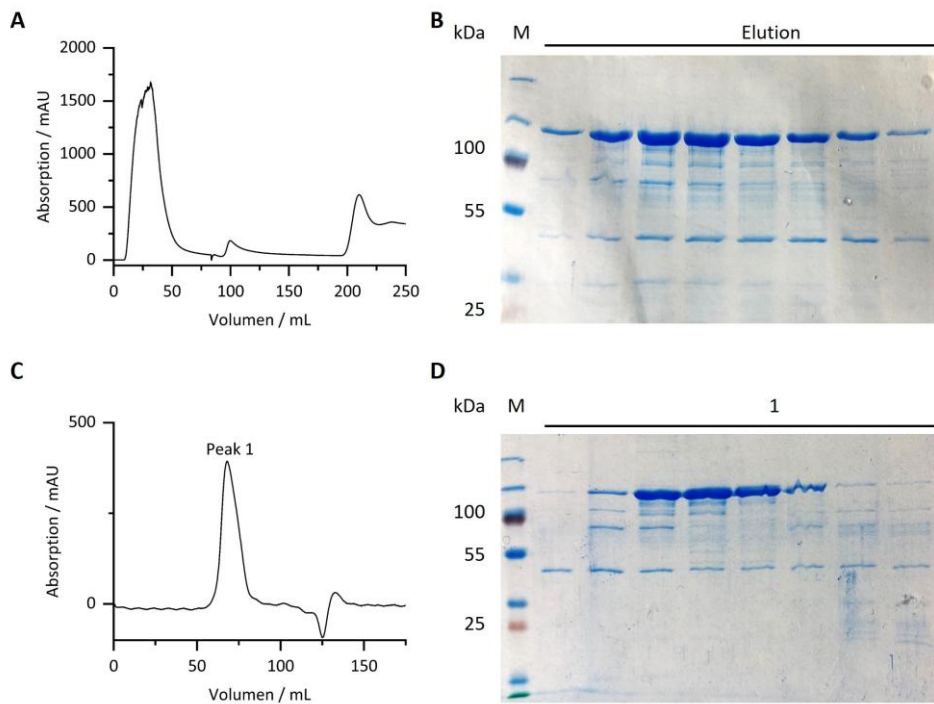


Abbildung 106: Ergebnisse der Reinigung der Variante 713/714. **A:** Chromatogramm der Ni-NTA-Chromatographie, **B:** SDS-PAGE der Ni-NTA-Chromatographie, M: 3  $\mu$ L PageRuler Plus prestained Protein Ladder, **C:** Chromatogramm der Gelfiltration, **D:** SDS-PAGE der Gelfiltration, M: 3  $\mu$ L PageRuler Plus prestained Protein Ladder, 1: Peak 1.<sup>[110]</sup>

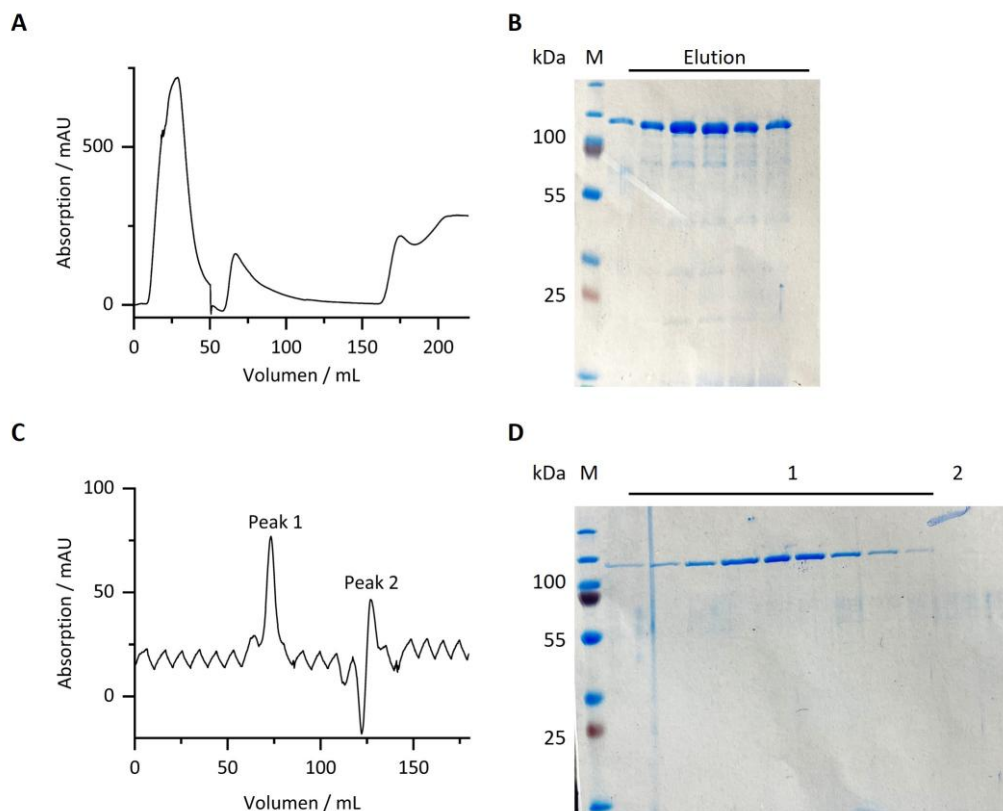


Abbildung 107: Ergebnisse der Reinigung der Variante 129/130. **A:** Chromatogramm der Ni-NTA-Chromatographie, **B:** SDS-PAGE der Ni-NTA-Chromatographie, M: 3  $\mu$ L PageRuler Plus prestained Protein Ladder, **C:** Chromatogramm der Gelfiltration, **D:** SDS-PAGE der Gelfiltration, M: 3  $\mu$ L PageRuler Plus prestained Protein Ladder, 1: Peak 1, 2: Peak 2.<sup>[110]</sup>

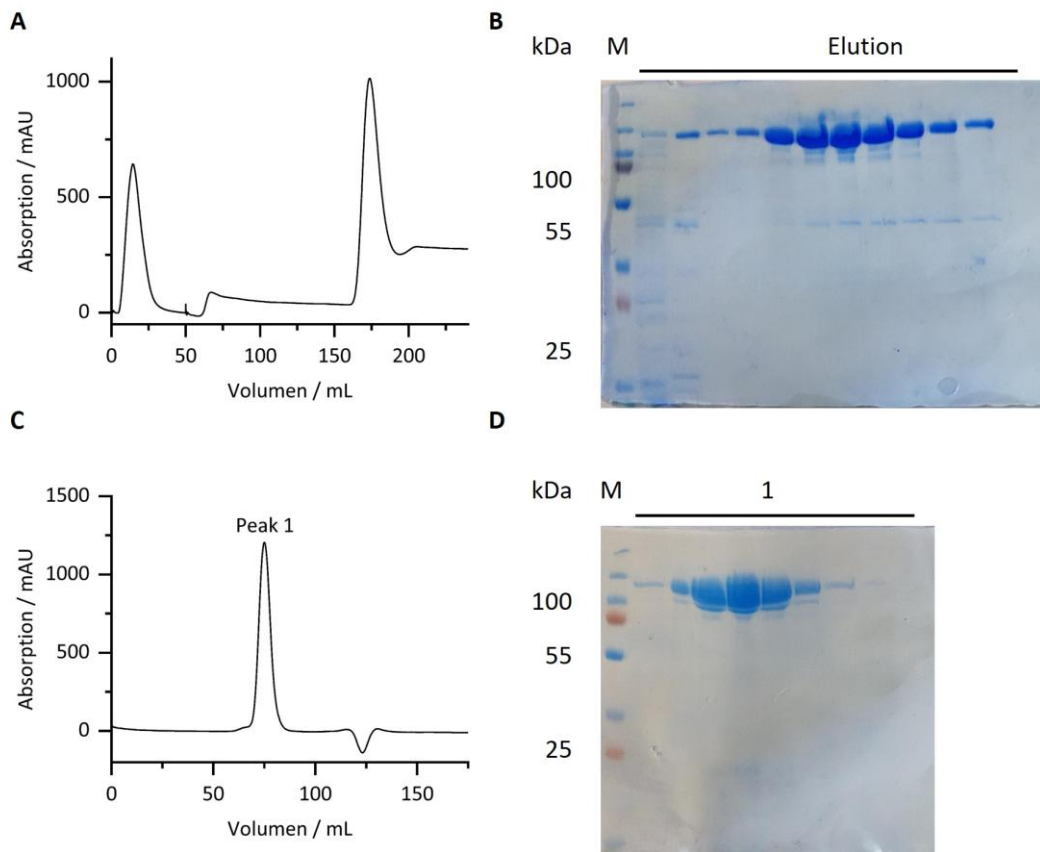


Abbildung 108: Ergebnisse der Reinigung der Variante 236/237. **A:** Chromatogramm der Ni-NTA-Chromatographie, **B:** SDS-PAGE der Ni-NTA-Chromatographie, M: 3  $\mu$ L PageRuler Plus prestained Protein Ladder, **C:** Chromatogramm der Gelfiltration, **D:** SDS-PAGE der Gelfiltration, M: 3  $\mu$ L PageRuler Plus prestained Protein Ladder, 1: Peak 1.<sup>[111]</sup>

### 7.2.3 AlphaFold-Modellierungen

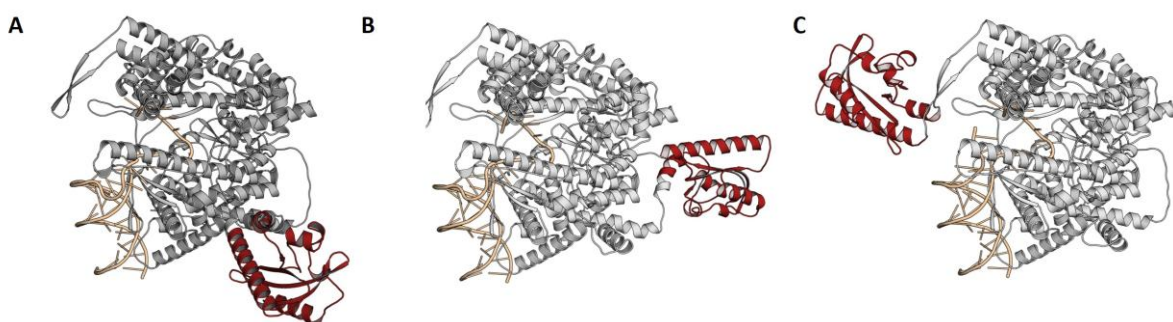


Abbildung 109: AlphaFold3-Modellierungen der Initiationskomplexe der photoaktiven Varianten mit dsDNA des T7-Promots (ockerfarben), Die LOV-Domäne ist in rot dargestellt. **A:** Variante 67/68, **B:** Variante 179/180, **C:** Variante 600/601.<sup>[130]</sup>

## 7.2.4 Berechnung neuer Insertionspositionen

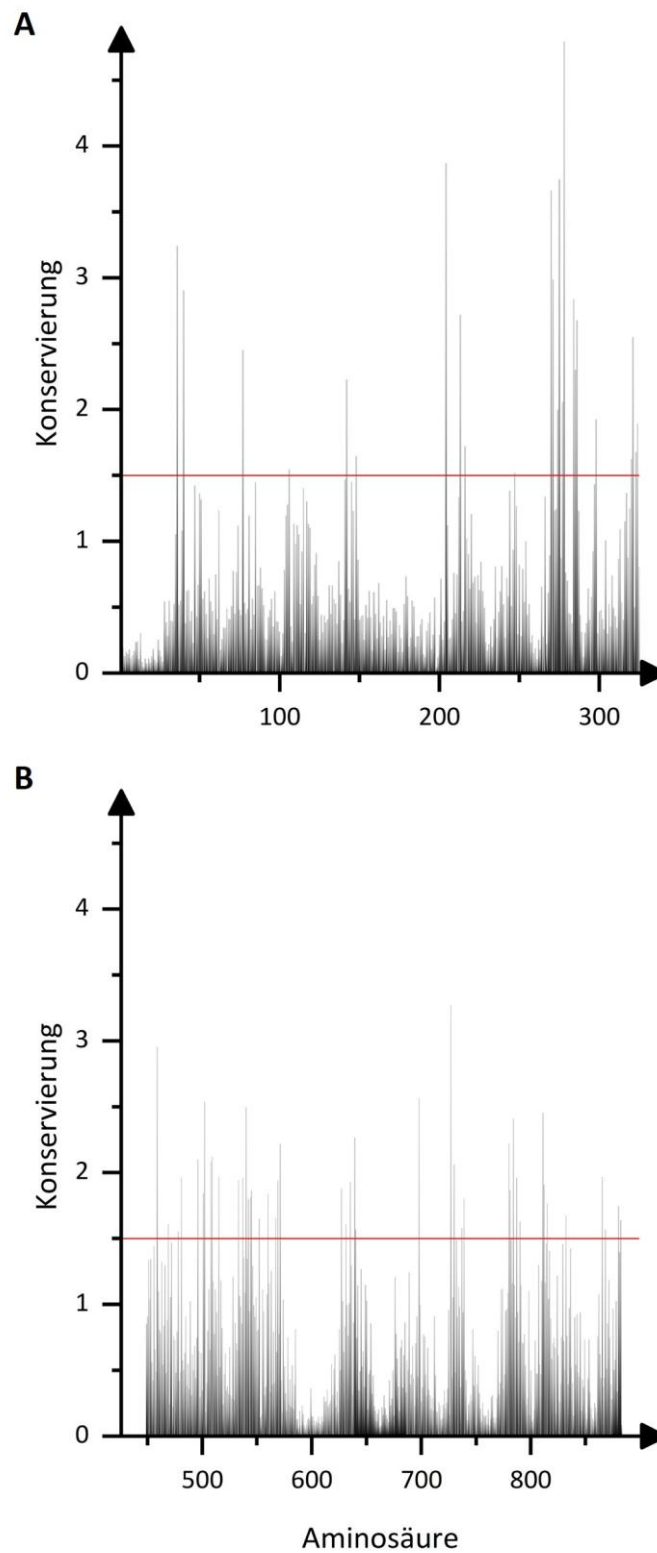


Abbildung 110: Mit MISTIC<sup>[105]</sup> bestimmte Konservierung (Kullback-Leibler-Divergenz<sup>[106]</sup>) der gesamten Primärstruktur der WT-T7-RNAP. **A:** N-Terminale Domäne AS 1-325, **B:** Polymerasedomäne AS 326-883.

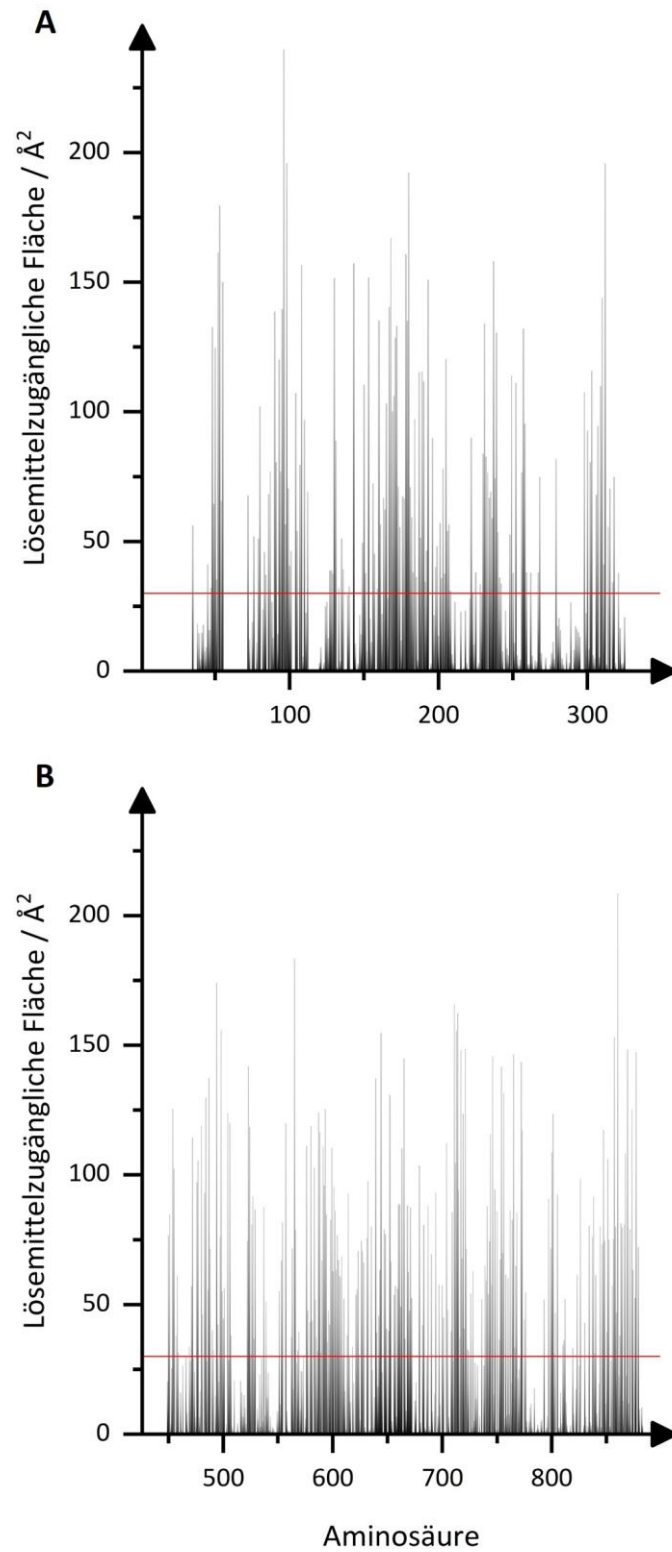


Abbildung 111: Mit STRIDE<sup>[107-108]</sup> bestimmte Lösemittelzugängliche Fläche / Å<sup>2</sup> der gesamten Primärstruktur der WT-T7-RNAP. **A:** N-Terminale Domäne AS 1-325, **B:** Polymerasedomäne AS 326-883.

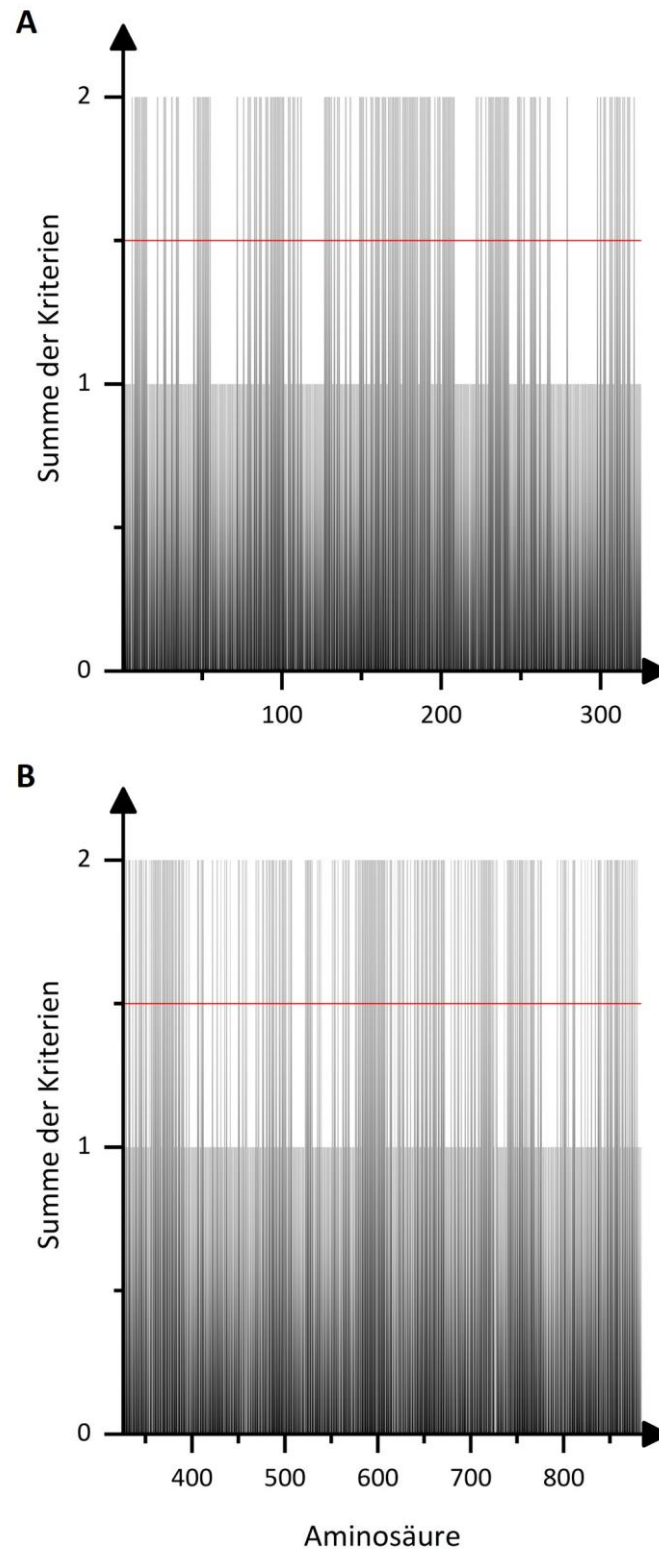


Abbildung 112: Kumulierte Auswertung der Konservierung und der Solvent-zugänglichen Fläche der gesamten Primärsequenz der WT-T7-RNAP, pro erfülltem Kriterium Addition von eins. **A**: N-Terminale Domäne AS 1-325, **B**: Polymerasedomäne AS 326-883.

### 7.2.5 Zellexperimente

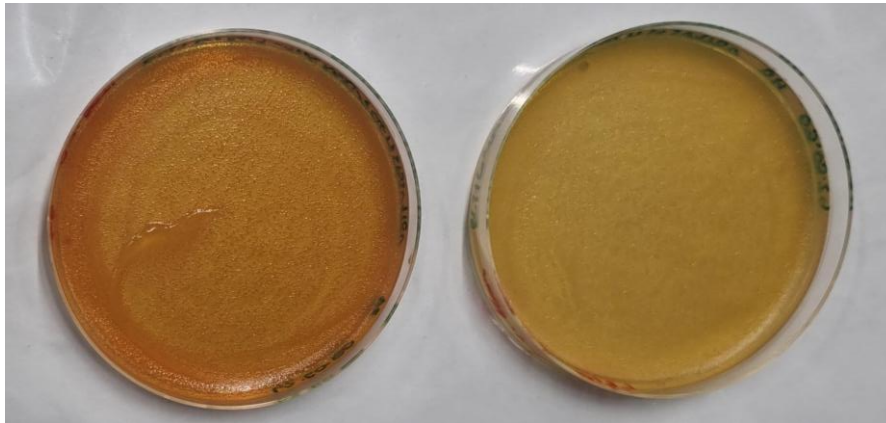


Abbildung 113: LB-Agar-Platten der Zellen BL21[pRep4-mApple-RBS]/pQET7-LOV-179/180 nach 16-stündiger Inkubation bei 37 °C. **Links:** Deutlich zu erkennende frühzeitige Expression des rotfluoreszierenden Proteins mApple, LB-Agar + Selektionsmarker ohne Glucose. **Rechts:** Keine vorzeitige Expression erkennbar, LB-Agar + Selektionsmarker + 1 % (w/v) Glucose.

### 7.2.6 Kristallisation

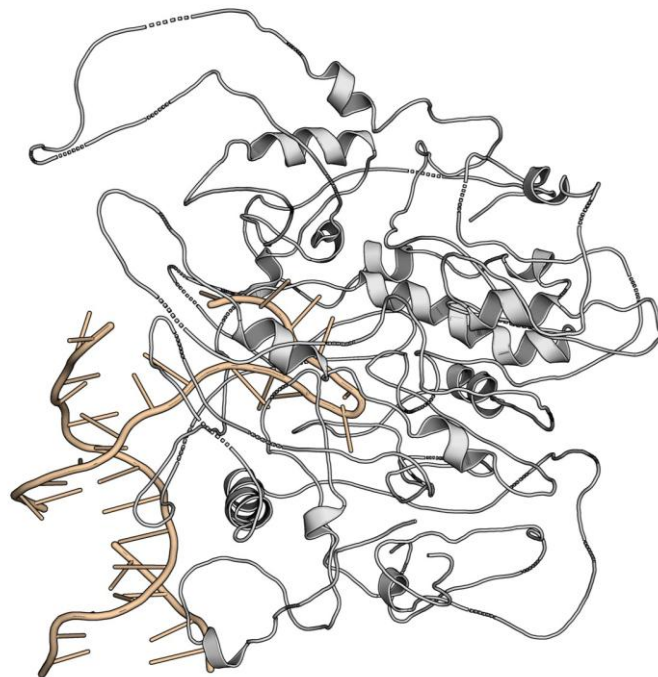


Abbildung 114: Kristallstruktur des Initiationskomplexes der WT-T7-RNA-Polymerase. Ockerfarben: T7-Promoter, Auflösung 3.5 Å. Sekundärstrukturelemente nicht vollständig aufgelöst und mehrere Lücken innerhalb der Elektronendichte.

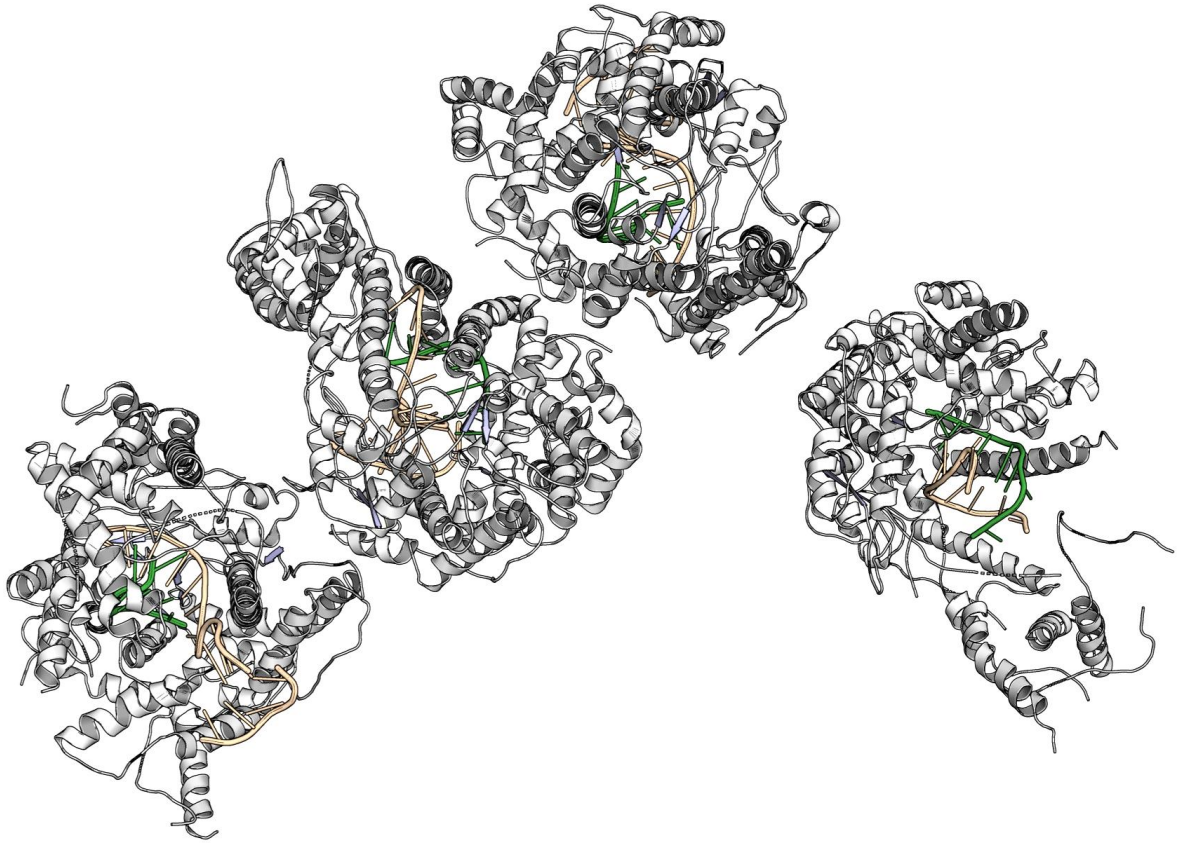


Abbildung 115: Kristallstruktur des Elongationskomplexes der WT-T7-RNA-Polymerase bei einer Auflösung von 4.5 Å.  
Ockerfarben: DNA, grün: RNA, hellblau:  $\beta$ -Faltblätter.

|            |       | Glycerin / % |     |      |      |      |
|------------|-------|--------------|-----|------|------|------|
|            |       | 0 %          | 5 % | 10 % | 15 % | 20 % |
| HCOONa / M | 3.5 M |              |     |      |      |      |
|            | 4.0 M |              |     |      |      |      |
|            | 4.5 M |              |     |      |      |      |

Proteinkonzentration: 5-15 mg/mL  
Temperatur: 20 °C

Abbildung 116: Für die Reproduktion der in den Screenings (Abbildung 47A) gefundenen Kristallisationsbedingungen der Variante 179/180<sub>v</sub> (Abbildung 48A) gewählter Ansatz.

|                     |      | Glycerin / % |     |      |      |      |
|---------------------|------|--------------|-----|------|------|------|
|                     |      | 0 %          | 5 % | 10 % | 15 % | 20 % |
| PEG 20000 / % (w/v) | 12 % |              |     |      |      |      |
|                     | 15 % |              |     |      |      |      |
|                     | 18 % |              |     |      |      |      |

100 mM HEPES pH 7.5  
 Proteinkonzentration: 5-15 mg/mL  
 Temperatur: 20 °C

Abbildung 117: Für die Reproduktion der in den Screenings (Abbildung 47B) gefundenen Kristallisationsbedingungen der Variante 600/601<sub>v</sub> (Abbildung 48B) gewählter Ansatz.

**A**

|  |  | KNO <sub>3</sub> / M |        |       |        |       |
|--|--|----------------------|--------|-------|--------|-------|
|  |  | 0.1 M                | 0.15 M | 0.2 M | 0.25 M | 0.3 M |
|  |  |                      |        |       |        |       |

20 % (w/v) PEG 3350  
 Proteinkonzentration: 10-20 mg/mL  
 Temperatur: 4 °C

**B**

|  |  | LiSO <sub>4</sub> / M |        |       |        |       |
|--|--|-----------------------|--------|-------|--------|-------|
|  |  | 0.1 M                 | 0.15 M | 0.2 M | 0.25 M | 0.3 M |
|  |  |                       |        |       |        |       |

100 mM Tris pH 8.5  
 40 % (v/v) PEG 400  
 Proteinkonzentration: 2.5-7.5 mg/mL  
 Temperatur: 4 °C

**C**

|  |  | MgSO <sub>4</sub> / mM |        |      |        |       |
|--|--|------------------------|--------|------|--------|-------|
|  |  | 0 mM                   | 2.5 mM | 5 mM | 7.5 mM | 10 mM |
|  |  |                        |        |      |        |       |

100 mM Tris HCl pH 8.0  
 35 % (v/v) 1,6-Hexandiol  
 Proteinkonzentration: 2.5-7.5 mg/mL  
 Temperatur: 4 °C

Abbildung 118: Für die Reproduktion der in den Screenings gefundenen Kristallisationsbedingungen der Variante 67/68<sub>v</sub> gewählte Ansätze.

50 mM HEPES pH

|      | 7.5 | 8.0 |
|------|-----|-----|
| 8 %  |     |     |
| 10 % |     |     |
| 12 % |     |     |

50 mM HEPES pH 7.5/ pH 8.0  
 15 mM MgCl<sub>2</sub>  
 1 mM Sermidin  
 Proteinkonzentration: 3.3 mg/mL  
 Temperatur: 20 °C

Abbildung 119: Für die Reproduktion der in den Screenings gefundenen Kristallisationsbedingungen der Variante 600/601<sub>v</sub> (Abbildung 49E) gewählter Ansatz.

(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> / M

|      | 0.8 M | 0.9 M | 1.0 M | 1.1 M | 1.2 M |
|------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 1 mM |       |       |       |       |       |
| 2 mM |       |       |       |       |       |
| 3 mM |       |       |       |       |       |

50 mM HEPES pH 7.5  
 15 mM MgCl<sub>2</sub>  
 Proteinkonzentration: 20-30 mg/mL  
 Temperatur: 4 °C

Abbildung 120: Für die Reproduktion der in den Screenings gefundenen Kristallisationsbedingungen der Variante 600/601<sub>v</sub> (Abbildung 49D) gewählter Ansatz.

## Predicted sequence features

```

1...*...10...*...20...*...30...*...40...*...50...*...60...*...70...*...80...*...90...*...100
GMNTINIAKNDFSDIELAAIPFNTLADHYGERLAREQLALEHESYEMGEARFRKMFERQLKAGEVADKLATTLERIEKNFVITDPRLPDNPIIFASDSFL
...*...110...*...120...*...130...*...140...*...150...*...160...*...170...*...180...*...190...*...200
QLTEYSREEILGRNCRFLQGPETDRATVRKIRDAIDNQTEVTVQLINYTKSGKFWNLFHLQPMRDQKGDVQVFIGVQLDGTEHVRDAAEREGVMLIKKT
...*...210...*...220...*...230...*...240...*...250...*...260...*...270...*...280...*...290...*...300
AENAAAKPLITLLPKMIARINDWFEEVKAKRGKRPTAFQFLQEIKPEAVAVYITIKTTLACLTSADNTVQAVASAIGRAIEDEARFGRIRDLEAKHFKK
...*...310...*...320...*...330...*...340...*...350...*...360...*...370...*...380...*...390...*...400
NVEEQLNKRVGHVYKAFMQVVEADMLSKGLLGGEAWSSWHKEDSIHVGVRCIEMLIESTGMVSLHRQNAGVVGQDSETIELAPEYAEAIATRAGALAGI
...*...410...*...420...*...430...*...440...*...450...*...460...*...470...*...480...*...490...*...500
SPMFQPCVVPPKPWTGITGGGYWANGRRPLALVRTHSKKALMRYEDVYMPEVYKAINAQNTANKINKVLAVANVITKWKHCPVEDIPAIEREELPMKP
...*...510...*...520...*...530...*...540...*...550...*...560...*...570...*...580...*...590...*...600
EDIDMNPEALTAWKRAAAAVRKDKARSRRISLEFMLEQANKFANHKAIWFPYNMDWRGRVYAVSMFNPQGNDMTKGLLTLAKGKPIGKEGYYWLKIHG
...*...610...*...620...*...630...*...640...*...650...*...660...*...670...*...680...*...690...*...700
ANCAGVDKVPFPERIKFIEENHENIMACAKSPLENTWAEQDSPFCFLAFCFEYAGVQHGLSYNCSLPLAFDGSCSGIQHSAMLRDEVGGRAVNLLPS
...*...710...*...720...*...730...*...740...*...750...*...760...*...770...*...780...*...790...*...800
ETVQDIYGIVAKKVNEILQADAINGTDNEVVTVTDENTGEISEKVKLGTKALAGQWLAYGVTRSVTKRSVMTLAYGSKEFGRQQVLEDTIQPAIDSGKG
...*...810...*...820...*...830...*...840...*...850...*...860...*...870...*...880...*...890...*...900
LMFTQPNQAAGYMAKLIWESVSVTVAAVEAMNLKSAAKLLAEVKDKKTGEILRKRCAVHVTPDGFPVWQEYKKPIQTRLNLMFLGQFRLQTINTN
...*...910...*...920...*...930...*...940...*...950...*...960...*...970...*...980...*...990...*...1000
KDSEIDAHKQESGIAPNFVHSQDGSHLRKTVWAHEKYGIESFALIHDSFGTIPADANLFKAVRETMVDTYESCDVLADFYDQFADQLHESQLDKMPAL
...*...1010...*...
PAKGNLNLRDILESDFAFA

```

## Legend

|                |   |
|----------------|---|
| LOOP           | loop secondary structure predicted by <a href="#">PSIPRED</a>   |
| HELIX          | helix secondary structure predicted by <a href="#">PSIPRED</a>  |
| STRAND         | strand secondary structure predicted by <a href="#">PSIPRED</a> |
| DISORDER       | disordered region predicted by <a href="#">DISOPRED2</a>        |
| LOW COMPLEXITY | low complexity region predicted by <a href="#">SEG</a>          |
| COILS          | coiled coils region predicted by <a href="#">COILS</a>          |

Abbildung 121: Resultat der mit Xtal-Pred-RF<sup>[150]</sup> durchgeführten Analyse der Aminosäuresequenz der Variante 67/68v.

## Predicted sequence features

```

1...*...10...*...20...*...30...*...40...*...50...*...60...*...70...*...80...*...90...*...100
GMNTINIAKNDFSDIELAAIPFNTLADHYGERLAREQLALEHESYEMGEARFRKMFERQLKAGEVADNAAAKPLITTLLPKMIARINDWFEEVKAKRGKR
...*...110...*...120...*...130...*...140...*...150...*...160...*...170...*...180...*...190...*...200
PTAFQFLQEIKPEAVAYITIKTTLACLTSADNTTVQAVASAIGRAIEDEARFGRIRDLEAKHFKKNVEEQLNKRVGHVYKAFMQVVEADMLSKGLLGGE
...*...210...*...220...*...230...*...240...*...250...*...260...*...270...*...280...*...290...*...300
AWSSWHKEDSIHVGVRCIEMLIESTGMVSLHRQNAGVVGQDSETIELAPEYAEAIATRAGALAGISPMFQPCVVPKPWTGITGGGYWANGRRPLALVRT
...*...310...*...320...*...330...*...340...*...350...*...360...*...370...*...380...*...390...*...400
HSKALMRYEDVYMPEVYKAINIAQNTAWKINKKVLAVANVITKWKHCPVEDIPAIEREELPMKPEDIDMNEALTAWKRAAAAVYRKDKARKSRRISLE
...*...410...*...420...*...430...*...440...*...450...*...460...*...470...*...480...*...490...*...500
FMLEQANKFANHKAIWFPYNMDWRGRVYAVSMFNPQGNDMTKGLLTLAKGKPIGKEGYYWLKIHGANCAGVDKVPPPERIKFIEENHENIMACAKSPLEN
...*...510...*...520...*...530...*...540...*...550...*...560...*...570...*...580...*...590...*...600
TWAEQDSPFCFLAFCFEYAGVQHHGLSYNCSLPLAFDGSCSGIQHFSAMLRDEVGGRAVNLLPSETVQDIYGIVAKKVNEILQADAINGTDNEVTVTD
...*...610...*...620...*...630...*...640...*...650...*...660...*...670...*...680...*...690...*...700
EKLATTLERIEKNFVITDPRLDPNPIIFASDSFLQLTEYSREEILGRNCRFLQGPETDRATVRKIRDAIDNQTEVTVQLINYTKSGKKFWNLFHLQPMRD
...*...710...*...720...*...730...*...740...*...750...*...760...*...770...*...780...*...790...*...800
QKGDVQYFIGVQLDTEHVRDAAEREGVMLIKKTAENTGEISEKVKLGTALAGQWLAYGVTRSVTKRSVMTLAYGSKEFGFRQVLEDTIQPAIDSGKG
...*...810...*...820...*...830...*...840...*...850...*...860...*...870...*...880...*...890...*...900
LMFTQPNQAAGYMAKLIWESVSVTVVAAIVEAMNWLKSAAKLLAAEVKDKTGEILRKRCAVHWTPDGFPVWQEYKKPIQTRLNLMFLGQFRLQPTINTN
...*...910...*...920...*...930...*...940...*...950...*...960...*...970...*...980...*...990...*...1000
KDSEIDAHKQESGIAPNFVHSQDGSHLRKTVVWAHEKYGIESFALIHDSFGTIPADAANLFKAVRETMVDTYESCDVLADFYDQFADQLHESQLDKMPAL
...*...1010...*...
PAKGNLNRDILESDFAFA

```

## Legend

|                |   |
|----------------|---|
| LOOP           | loop secondary structure predicted by <a href="#">PSIPRED</a>   |
| HELIX          | helix secondary structure predicted by <a href="#">PSIPRED</a>  |
| STRAND         | strand secondary structure predicted by <a href="#">PSIPRED</a> |
| DISORDER       | disordered region predicted by <a href="#">DISOPRED2</a>        |
| LOW COMPLEXITY | low complexity region predicted by <a href="#">SEG</a>          |
| COILS          | coiled coils region predicted by <a href="#">COILS</a>          |

Abbildung 122: Resultat der mit Xtal-Pred-RF<sup>[150]</sup> durchgeführten Analyse der Aminosäuresequenz der Variante 179/180v.

## 7.2.7 Aktivitätsbestimmungen

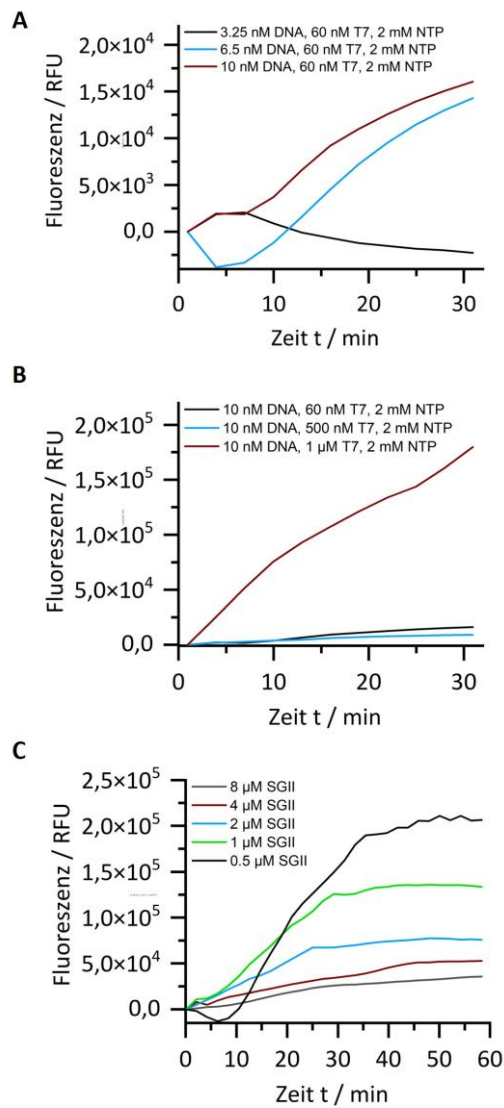


Abbildung 123: Optimierung der Reaktion für die Bestimmung kinetischer Parameter. **A:** Variation der Konzentration des linearisierten Plasmides pAlterGC<sup>[95]</sup>, **B:** Variation der Konzentration der WT-T7-RNAP, **C:** Sukzessive Erhöhung des Fluoreszenzfarbstoffes SG.

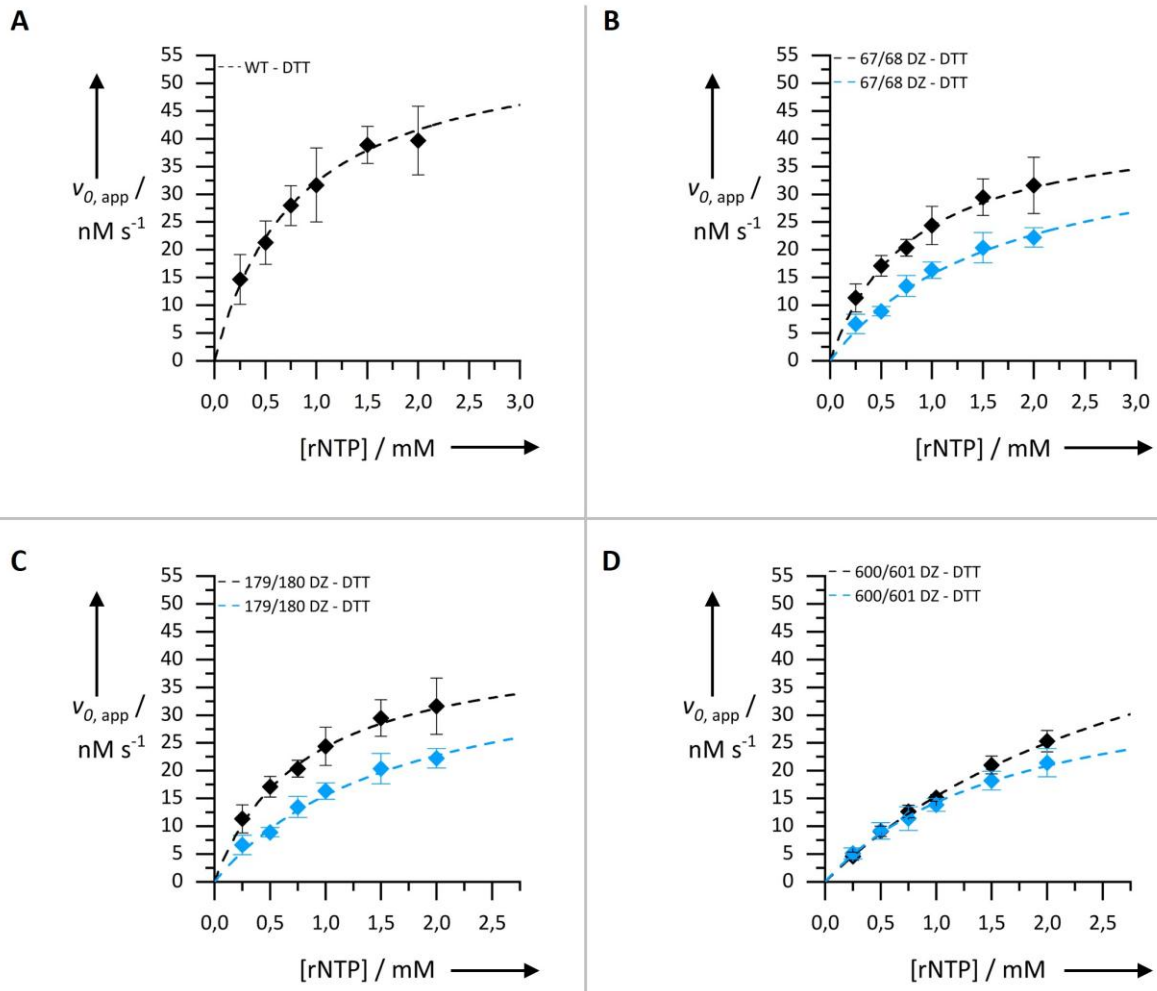


Abbildung 124: Ergebnisse der Michaelis-Menten-Kinetik ohne Vorinkubation mit DTT. Die Anfangsgeschwindigkeit  $v_0/\text{nM s}^{-1}$  wurde gegen  $[\text{rNTP}]/\text{mM}$  aufgetragen. Kurven der Dunkelzustände sind in schwarz gezeichnet (0 Lx), Kurven der Lichtzustände in hellblau ( $\lambda = 470 \text{ nm}$ , 92 Lx). **A:** Kurven des Wildtypenzym, **B:** Michaelis-Menten-Kurven der photoaktiven Variante 67/68, **C:** Variante 179/180, **D:** Ergebnisse der Variante 600/601.



Abbildung 125: Runde Beleuchtungsapparatur für die IVT-Endpunktbestimmungen.



Abbildung 126: Rechteckige Beleuchtungsapparatur für die kinetische Bestimmung der Aktivitäten.

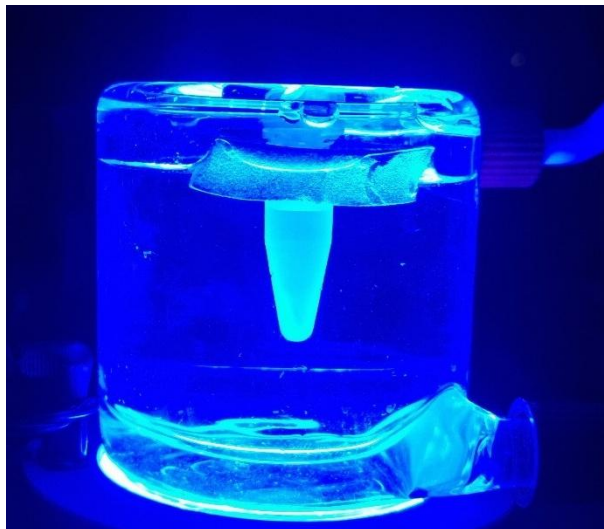


Abbildung 127: Doppelwandiges Becherglas mit Anschlüssen für einen Thermostaten zur Temperierung der Reaktionslösung während der Beleuchtung mit blauem Licht zur Bestimmung der apparenten Michaelis-Menten-Kinetik.

## 7.3 Zusätzliche Tabellen

## 7.3.1 Schmelzkurvenanalyse

Tabelle 34: Resultate der Schmelzpunktanalyse der Variante 67/68, dargestellt ist die jeweilige Schmelztemperatur  $T_m/^\circ\text{C}$  in Abhängigkeit vom jeweiligen pH-Wert und der entsprechenden NaCl-Konzentration. Farbcodierung von rot (niedrig) nach blau (hoch).

|        | 0 mM NaCl | 50 mM NaCl | 100 mM NaCl | 150 mM NaCl | 200 mM NaCl | 250 mM NaCl | 500 mM NaCl | 1 M NaCl |
|--------|-----------|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|----------|
| Wasser | 42        | 45         | 47.5        | 49          | 49          | 48          | 49          | 50       |
| pH 4.5 | 36        | 37         | 36          | 36          | 43          | 36          | 38          | 38.5     |
| pH 5.0 | 40        | 41.5       | 41          | 42.5        | 42.5        | 43          | 45          | 47.5     |
| pH 5.5 | 40        | 42.5       | 43.5        | 44.5        | 44.5        | 45.5        | 47          | 47.5     |
| pH 6.0 | 40        | 40         | 42.5        | 42.5        | 44          | 44.5        | 45.5        | 46       |
| pH 6.5 | 40        | 42         | 44          | 42          | 45          | 45.5        | 47          | 48.5     |
| pH 7.0 | 40        | 43.5       | 44.5        | 45.5        | 45.5        | 46.5        | 47.5        | 49       |
| pH 7.5 | 42        | 44.5       | 46.5        | 47.5        | 42.5        | 47.5        | 48.5        | 50       |
| pH 8.0 | 43        | 45         | 46          | 46.5        | 47.5        | 47.5        | 49          | 49.5     |
| pH 8.5 | 44        | 45         | 45.5        | 46.5        | 46.5        | 47          | 48.5        | 49.5     |
| pH 9.0 | 44.5      | 45         | 45.5        | 46.5        | 47          | 45.5        | 48.5        | 49.5     |
| pH 9.5 | 43.5      | 44         | 45          | 45          | 45          | 45.5        | 48          | 48.5     |

Tabelle 35: Resultate der Schmelzpunktanalyse der verkürzten Variante 179/180<sub>v</sub>, dargestellt ist die jeweilige Schmelztemperatur  $T_m/^\circ\text{C}$  in Abhängigkeit vom jeweiligen pH-Wert und der entsprechenden NaCl-Konzentration. Farbcodierung von rot (niedrig) nach blau (hoch).

|        | 0 mM NaCl | 50 mM NaCl | 100 mM NaCl | 150 mM NaCl | 200 mM NaCl | 250 mM NaCl | 500 mM NaCl | 1 M NaCl |
|--------|-----------|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|----------|
| Wasser | 48.5      | 48.5       | 49.5        | 50.5        | 50.5        | 49.5        | 49.5        | 50       |
| pH 4.5 | 49        | 45.5       | 46          | 45          | 47          | 43.5        | 42          | 33       |
| pH 5.0 | 47.5      | 47         | 47          | 47          | 37.5        | 48          | 49.5        | 50.5     |
| pH 5.5 | 48.5      | 48.5       | 49          | 46.5        | 49.5        | 50.5        | 51          | 50       |
| pH 6.0 | 47.5      | 47.5       | 47.5        | 48          | 49          | 48          | 49.5        |          |
| pH 6.5 | 47.5      | 48         | 48.5        | 48.5        | 48.5        | 49.5        | 50          |          |
| pH 7.0 | 47.5      | 47.5       | 48          | 48.5        | 48.5        | 49          | 49.5        |          |
| pH 7.5 | 49        | 48.5       | 49          | 48.5        | 49          | 49          | 50.5        |          |
| pH 8.0 | 48.5      | 48.5       | 49          | 49          | 48.5        | 48          | 50.5        |          |
| pH 8.5 | 48        | 48.5       | 48.5        | 49          | 49          | 48.5        | 49.5        |          |
| pH 9.0 | 47        | 47.5       | 47.5        | 48.5        | 48          | 49          | 49.5        |          |
| pH 9.5 | 47.5      | 47.5       | 48.5        | 48.5        | 47.5        | 49          | 49          |          |

Tabelle 36: Resultate der Schmelzpunktanalyse der Variante 179/180; dargestellt ist die jeweilige Schmelztemperatur  $T_m/^\circ\text{C}$  in Abhängigkeit vom jeweiligen pH-Wert und der entsprechenden NaCl-Konzentration. Farbcodierung von rot (niedrig) nach blau (hoch).

|        | 0 mM NaCl | 50 mM NaCl | 100 mM NaCl | 150 mM NaCl | 200 mM NaCl | 250 mM NaCl | 500 mM NaCl | 1 M NaCl |
|--------|-----------|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|----------|
| Wasser | 40        | 46         | 47.5        | 49.5        | 48.5        | 48          | 48          | 50       |
| pH 4.5 | 37.5      | 39.5       | 38.5        | 38.5        | 40          | 38          | 40.5        | 40.5     |
| pH 5.0 | 43.5      | 43         | 43.5        | 44          | 44.5        | 44.5        | 46.5        | 48.5     |
| pH 5.5 | 43        | 44         | 45          | 45          | 46          | 46          | 46.5        | 49       |
| pH 6.0 | 40.5      | 42         | 44          | 44.5        | 45          | 45          | 46.5        | 47       |
| pH 6.5 | 41.5      | 44         | 45          | 45.5        | 46          | 47.5        | 47.5        | 48.5     |
| pH 7.0 | 41        | 44.5       | 45.5        | 45.5        | 46.5        | 46.5        | 47.5        | 49       |
| pH 7.5 | 42.5      | 45         | 46.5        | 46.5        | 47          | 47.5        | 48.5        | 50       |
| pH 8.0 | 45.5      | 46         | 46.5        | 47          | 47          | 47.5        | 48.5        | 49.5     |
| pH 8.5 | 45.5      | 45.5       | 46          | 46.5        | 46.5        | 47          | 48          | 49       |
| pH 9.0 | 45        | 45         | 45.5        | 45.5        | 46.5        | 46.5        | 48          | 49       |
| pH 9.5 | 44.5      | 43.5       | 44.5        | 44          | 44.5        | 45          | 47.5        | 49       |

Tabelle 37: Resultate der Schmelzpunktanalyse der verkürzten Variante 600/601<sub>v</sub>; dargestellt ist die jeweilige Schmelztemperatur  $T_m/^\circ\text{C}$  in Abhängigkeit vom jeweiligen pH-Wert und der entsprechenden NaCl-Konzentration. Farbcodierung von rot (niedrig) nach blau (hoch).

|        | 0 mM NaCl | 50 mM NaCl | 100 mM NaCl | 150 mM NaCl | 200 mM NaCl | 250 mM NaCl | 500 mM NaCl | 1 M NaCl |
|--------|-----------|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|----------|
| Wasser | 41.5      | 43         | 42          | 42.5        | 42.5        | 43          | 42.5        | 43       |
| pH 4.5 | 42.5      | 40         | 39.5        | 41.5        | 42          | 40          | 36.5        | 41.5     |
| pH 5.0 | 40        | 40         | 39.5        | 41          | 41          | 40.5        | 43          |          |
| pH 5.5 | 40.5      | 42.5       | 41.5        | 44          | 45.5        | 46          | 41          |          |
| pH 6.0 | 41        | 40.5       | 40          | 41.5        | 42.5        | 44.5        | 42.5        |          |
| pH 6.5 | 41.5      | 41.5       | 41          | 43          | 45.5        | 45.5        | 42          |          |
| pH 7.0 | 41        | 41         | 41          | 43.5        | 42          | 44.5        | 42.5        |          |
| pH 7.5 | 42        | 43         | 41.5        | 42.5        | 45.5        | 45          | 43          |          |
| pH 8.0 | 42.5      | 43         | 41          | 44          | 44          | 42.5        | 43          |          |
| pH 8.5 | 42        | 43.5       | 41.5        | 43.5        | 44          | 43.5        | 42          |          |
| pH 9.0 | 41.5      | 42.5       | 41.5        | 42.5        | 43          | 42          | 42.5        |          |
| pH 9.5 | 42.5      | 43         | 41          | 42.5        | 42.5        | 42.5        | 41.5        |          |

Tabelle 38: Resultate der Schmelzpunktanalyse der Variante 600/601, dargestellt ist die jeweilige Schmelztemperatur  $T_m/^\circ\text{C}$  in Abhängigkeit vom jeweiligen pH-Wert und der entsprechenden NaCl-Konzentration. Farbcodierung von rot (niedrig) nach blau (hoch).

|        | 0 mM NaCl | 50 mM NaCl | 100 mM NaCl | 150 mM NaCl | 200 mM NaCl | 250 mM NaCl | 500 mM NaCl | 1 M NaCl |
|--------|-----------|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|----------|
| Wasser | 39.5      | 40         | 33          | 31          | 32.5        | 43.5        | 45.5        | 44.5     |
| pH 4.5 | 33        | 32.5       | 33          | 33          | 33          | 32.5        | 34          | 35       |
| pH 5.0 | 38        | 38.5       | 39          | 39          | 39.5        | 39.5        | 41          | 42.5     |
| pH 5.5 | 38        | 38         | 39          | 39.5        | 41.5        | 39.5        | 42          | 43.5     |
| pH 6.0 | 37        | 37         | 37.5        | 38.5        | 39          | 39.5        | 41          | 42       |
| pH 6.5 | 36.5      | 37.5       | 39          | 40          | -           | 41.5        | 42.5        | 44.5     |
| pH 7.0 | 36.5      | 39         | 41          | 41          | 42          | 39          | 43.5        | 45       |
| pH 7.5 | 38.5      | 39.5       | 41.5        | 42.5        | 43          | 43.5        | 45          | 45.5     |
| pH 8.0 | 39        | 40.5       | 41.5        | 42.5        | 41          | 43          | 44.5        | 44.5     |
| pH 8.5 | 39.5      | 41         | 41.5        | 42.5        | 42.5        | 38.5        | 44.5        | 45       |
| pH 9.0 | 39.5      | 40.5       | 41.5        | 42.5        | 41          | 43.5        | 43.5        | 44       |
| pH 9.5 | 38        | 40         | 40          | 39.5        | 39.5        | 41          | 43          | 43       |

### 7.3.2 Korrelation zwischen Aktivität und Kriterien

Tabelle 39: Korrelation zwischen Aktivität, Schaltbarkeit und Eigenschaften der Insertionspositionen.

| Variante  | SAA / $\text{\AA}^2$ | Konservierung        | B-Faktor?       | Löslich & aktiv? | Schaltbarkeit / % |
|-----------|----------------------|----------------------|-----------------|------------------|-------------------|
| WT        | -                    | -                    | -               | aktiv            | -                 |
| N67/A68   | -                    | 0.49/0.41            | -               | aktiv            | ≈ 40              |
| A129/D130 | 37.6/151.6           | 0.39/0.41            | 52.6/60.3       | inaktiv          | -                 |
| K179/K180 | 135.0/192.0          | 0.73/0.59            | 129.3/121.3     | aktiv            | ≈ 45              |
| V236/V237 | 58.9/158.0           | 0.27/0.46            | 58.3/57.3       | inaktiv          | -                 |
| H346/C347 | 160.4/26.6           | 1.50/0.41            | 67.7/70.0       | inaktiv          | -                 |
| V470/D471 | 28.3/57.0            | 0.55/2.06            | 72.4/78.6       | aktiv            | ≈ 23              |
| D506/S507 | 120.2/38.1           | 2.16/1.29            | 55.7/50.8       | aktiv            | Nein              |
| P563/S564 | 71.7/17.5            | 2.08/0.83            | 75.8/81.0       | unlöslich        | -                 |
| S564/E565 | 17.5/183.3           | 0.83/1.40            | 81.0/84.7       | unlöslich        | -                 |
| E600/N601 | 62.8/95.4            | 0.71/0.45            | 158.5/ 158.5    | aktiv            | ≈ 30              |
| L665/M666 | 144.9/36.9           | 0.15/0.35            | 64.8/67.8       | aktiv            | Nein              |
| K713/K714 | 155.6/162.5          | 0.40/0.43            | 114.5/116.6     | aktiv            | ≈ 30              |
| P730/D731 | 27.5/13.6            | 3.42/1.06            | 61.0/59.3       | unlöslich        | -                 |
|           | <b>&gt; 30</b>       | <b>&lt; 2 (50 %)</b> | <b>&lt; 100</b> |                  |                   |

## 7.3.3 Datenstatistiken zu den gelösten Kristallstrukturen

Tabelle 40: Datenstatistik zur gelösten Kristallstruktur des Initiationskomplexes der Wildtyp-T7-RNAP.

| Datensammlung                         | T7WTTEV Initiationskomplex             |
|---------------------------------------|--|
| Raumgruppe                            | P 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 (18) |
| <b>Zellkonstanten</b>                 |  |
| a, b, c (Å)                           | 73.97, 80.86, 222.71                   |
| α, β, γ (°)                           | 90.00, 90.00, 90.00                    |
| Auflösung (Å)                         | 50.00-2.80 (2.90-2.80)                 |
| R <sub>Meas</sub> (%)                 | 17.2 (181.1)                           |
| I/σ                                   | 15.27 (2.11)                           |
| CC <sub>1/2</sub>                     | 99.8 (75.9)                            |
| Vollständigkeit (%)                   | 99.9 (100.0)                           |
| Redundanz                             | 13.0 (14.5)                            |
| <b>Modellverfeinerung</b>             |  |
| Auflösung (Å)                         | 40.43 - 2.80 (2.90-2.80)               |
| Anzahl der Reflexe                    | 33716 (3310)                           |
| R <sub>work</sub> / R <sub>free</sub> | 0.2178/0.2566 (0.3202/0.3719)          |
| <b>Anzahl der Atome</b>               |  |
| Protein                               | 6354                                   |
| DNA                                   | 649                                    |
| Ligand                                | 8                                      |
| <b>B-Faktoren (Å<sup>2</sup>)</b>     |  |
| Protein                               | 77.29                                  |
| DNA                                   | 80.78                                  |
| Liganden/Ionen                        | 82.94                                  |
| <b>RMS-Abweichung</b>                 |  |
| Bindungslängen (Å)                    | 0.005                                  |
| Bindungswinkel (°)                    | 0.782                                  |
| Wellenlänge (Å)                       | 1.0000                                 |
| Temperatur (K)                        | 100                                    |
| Beamline                              | X10SA                                  |
| Detektor                              | Eiger2 16M                             |
| <b>Ramachandran Plot</b>              |  |
| Outliers (%)                          | 0.00                                   |
| Erlaubt (%)                           | 3.64                                   |
| Favorisiert (%)                       | 96.36                                  |

Tabelle 41: Datenstatistik zur Kristallstruktur des Elongationskomplexes der Wildtyp-T7-RNAP. DOI 10.15151/ESRF-ES-925653639.

| <b>Datensammlung</b>              | <b>T7WTTEV Elongationskomplex</b> |
|-----------------------------------|-----------------------------------|
| Raumgruppe                        | P 1 (1)                           |
| <b>Zellkonstanten</b>             |                                   |
| a, b, c (Å)                       | 81.02, 86.44, 204.83              |
| $\alpha, \beta, \gamma$ (°)       | 87.73, 85.71, 70.01               |
| Auflösung (Å)                     | 50.00 - 4.50 (4.60 - 4.50)        |
| $R_{Meas}$ (%)                    | 21.6 (50.0)                       |
| I/ $\sigma$ I                     | 6.61 (4.09)                       |
| CC <sub>1/2</sub>                 | 98.5 (84.5)                       |
| Vollständigkeit (%)               | 97.8 (98.7)                       |
| Redundanz                         | 3.7 (3.8)                         |
| <b>Modellverfeinerung</b>         |                                   |
| Auflösung (Å)                     | 39.92 - 4.50 (4.66 - 4.50)        |
| Anzahl der Reflexe                | 28168 (2920)                      |
| $R_{work} / R_{free}$             | 0.2250/0.3264 (0.2322/0.3699)     |
| <b>Anzahl der Atome</b>           |                                   |
| Protein                           | 32890                             |
| DNA/RNA                           | 3060                              |
| Ligand                            | 2                                 |
| <b>B-Faktoren (Å<sup>2</sup>)</b> |                                   |
| Protein                           | 121.48                            |
| DNA/RNA                           | 168.15                            |
| Liganden/Ionen                    | 57.20                             |
| <b>RMS-Abweichung</b>             |                                   |
| Bindungslängen (Å)                | 0.034                             |
| Bindungswinkel (°)                | 2.809                             |
| Wellenlänge (Å)                   | 0.967697                          |
| Temperatur (K)                    | 100                               |
| Beamline                          | ID30A-3                           |
| Detektor                          | Eiger1 X 4M                       |
| <b>Ramachandran Plot</b>          |                                   |
| Outliers (%)                      | 3.06                              |
| Erlaubt (%)                       | 15.28                             |
| Favorisiert (%)                   | 81.66                             |

## 7.4 Sequenzen

## 7.4.1 Alignment mOrange und mApple

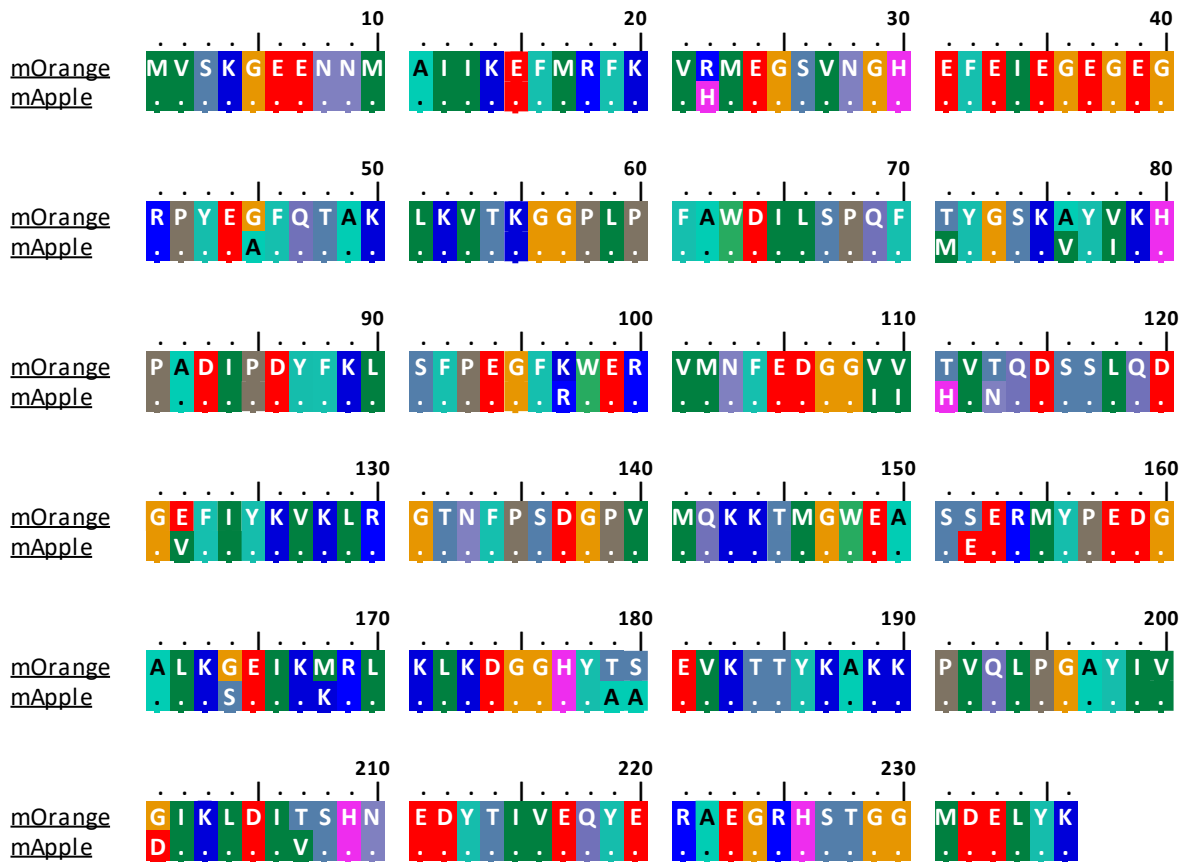


Abbildung 128: Sequenzalignment der Aminosäuresequenzen von mOrange und mApple zur Darstellung der 18 Mutationen.

## 7.4.2 T7-RNA-Polymerase



Abbildung 129: Aminosäuresequenz der Wildtyp T7 RNA Polymerase.

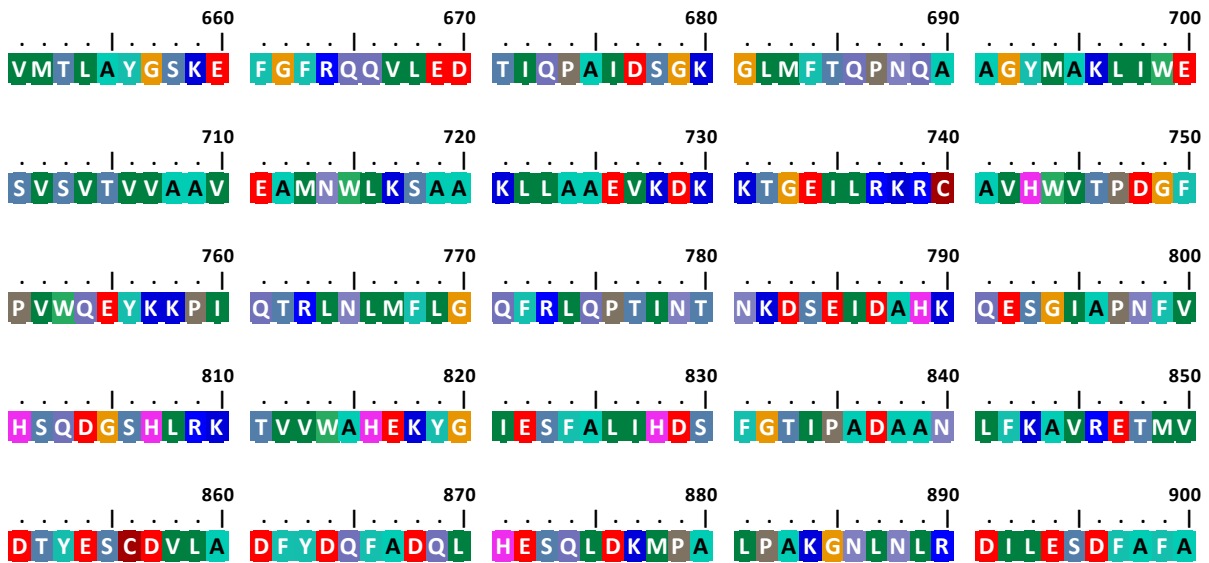


Abbildung 129 (Fortsetzung): Aminosäuresequenz der Wildtyp T7 RNA Polymerase.

### 7.4.3 AsLOV2

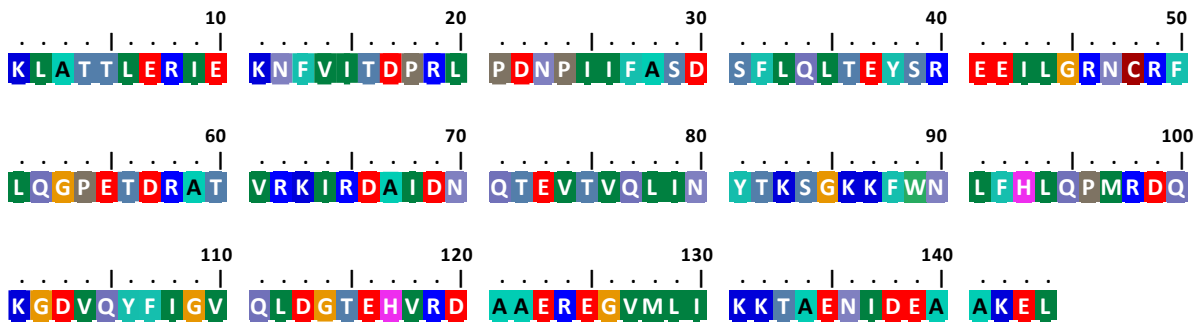


Abbildung 130: Verwendete Primärsequenz der AsLOV2-Domäne.

## 7.5 Sequenzierungsdaten

Auf Grund der Datenmenge sind die Sequenzierungsdaten unter folgendem Link zugänglich:  
<https://tu-dortmund.sciebo.de/s/CwwsC75L1tkz5Hp>

## 7.6 Eidesstattliche Versicherung

## Eidesstattliche Versicherung (Affidavit)

\_\_\_\_\_  
Name, Vorname  
(Surname, first name)

\_\_\_\_\_  
Matrikel-Nr.  
(Enrolment number)

## Belehrung:

Wer vorsätzlich gegen eine die Täuschung über Prüfungsleistungen betreffende Regelung einer Hochschulprüfungsordnung verstößt, handelt ordnungswidrig. Die Ordnungswidrigkeit kann mit einer Geldbuße von bis zu 50.000,00 € geahndet werden. Zuständige Verwaltungsbehörde für die Verfolgung und Ahndung von Ordnungswidrigkeiten ist der Kanzler/die Kanzlerin der Technischen Universität Dortmund. Im Falle eines mehrfachen oder sonstigen schwerwiegenden Täuschungsversuches kann der Prüfling zudem exmatrikuliert werden, § 63 Abs. 5 Hochschulgesetz NRW.

Die Abgabe einer falschen Versicherung an Eides statt ist strafbar.

Wer vorsätzlich eine falsche Versicherung an Eides statt abgibt, kann mit einer Freiheitsstrafe bis zu drei Jahren oder mit Geldstrafe bestraft werden, § 156 StGB. Die fahrlässige Abgabe einer falschen Versicherung an Eides statt kann mit einer Freiheitsstrafe bis zu einem Jahr oder Geldstrafe bestraft werden, § 161 StGB.

Die oben stehende Belehrung habe ich zur Kenntnis genommen:

## Official notification:

Any person who intentionally breaches any regulation of university examination regulations relating to deception in examination performance is acting improperly. This offence can be punished with a fine of up to EUR 50,000.00. The competent administrative authority for the pursuit and prosecution of offences of this type is the chancellor of the TU Dortmund University. In the case of multiple or other serious attempts at deception, the candidate can also be unenrolled, Section 63, paragraph 5 of the Universities Act of North Rhine-Westphalia.

The submission of a false affidavit is punishable.

Any person who intentionally submits a false affidavit can be punished with a prison sentence of up to three years or a fine, Section 156 of the Criminal Code. The negligent submission of a false affidavit can be punished with a prison sentence of up to one year or a fine, Section 161 of the Criminal Code.

I have taken note of the above official notification.

\_\_\_\_\_  
Ort, Datum  
(Place, date)

\_\_\_\_\_  
Unterschrift  
(Signature)

\_\_\_\_\_  
Titel der Dissertation:  
(Title of the thesis):

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe angefertigt habe. Ich habe keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt sowie wörtliche und sinngemäße Zitate kenntlich gemacht.  
Die Arbeit hat in gegenwärtiger oder in einer anderen Fassung weder der TU Dortmund noch einer anderen Hochschule im Zusammenhang mit einer staatlichen oder akademischen Prüfung vorgelegen.

I hereby swear that I have completed the present dissertation independently and without inadmissible external support. I have not used any sources or tools other than those indicated and have identified literal and analogous quotations.

The thesis in its current version or another version has not been presented to the TU Dortmund University or another university in connection with a state or academic examination.\*

\*Please be aware that solely the German version of the affidavit ("Eidesstattliche Versicherung") for the PhD thesis is the official and legally binding version.

\_\_\_\_\_  
Ort, Datum  
(Place, date)

\_\_\_\_\_  
Unterschrift  
(Signature)