

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

**Einbau unnatürlicher Aminosäuren in Proteine zur
bioorthogonalen Modifizierung sowie
Untersuchung des Dewar-Reparaturmechanismus durch
(6-4) Photolyasen**

Emine Kaya
aus
Wetzlar

2011

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 13 Abs. 3 bzw. 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 (in der Fassung der sechsten Änderungssatzung vom 16. August 2010) von Prof. Dr. Thomas Carell betreut.

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, den 24.11.2011

A black rectangular box redacting the signature of the author.

Emine Kaya

Dissertation eingereicht am 24.11.2011

1. Gutachter: Prof. Dr. Thomas Carell
2. Gutachter: Prof. Dr. Dirk Trauner

Mündliche Prüfung am 10.01.2012

“Always look on the bright side of life.”

(Eric Idle, Monty Python's Life of Brian)

Danksagung

Meinem Doktorvater, *Prof. Dr. Thomas Carell*, danke ich ganz herzlich für die spannende und vielseitige Themenstellung und das entgegengebrachte Vertrauen in meine wissenschaftlichen Fähigkeiten. Ich danke zudem für die exzellenten Arbeitsbedingungen, die angenehme Atmosphäre und für die wissenschaftliche Freiheit, die er mir gewährt hat.

Den Mitgliedern meiner Prüfungskommission danke ich für ihre Bemühungen bei der Evaluierung meiner Arbeit. Bei *Prof. Dr. Dirk Trauner* möchte ich mich herzlich für die freundliche Übernahme des Koreferates bedanken.

Ein besonderer Dank gilt den Mitarbeitern *Frau Slava Gärtner* und *Frau Sabine Voß* für die große Hilfsbereitschaft in den organisatorischen Herausforderungen des Doktoranden-Alltags.

Prof. Dr. Manfred T. Reetz möchte ich ganz herzlich für seine Gastfreundschaft am Max-Planck-Institut für Kohlenforschung (Mülheim a. d. Ruhr) bedanken. Er und seine Mitarbeiter, insbesondere *Dr. Despina Bougioukou*, waren mir eine große Hilfe bei der gerichteten Evolution der Pyrrolysyl-tRNA Synthetase.

Für die Durchführung des Umlaufs danke ich *Slava Gärtner*. Für das Korrekturlesen dieser Arbeit danke ich *Michael Gattner*, *Christian Deiml*, *Dr. Milan Vrabel*, *Korbinian Heil* und *Dr. Markus Müller*.

Allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe danke ich für die angenehme Atmosphäre. Mit Euch habe ich nicht nur die Wirren des Laboralltags auf sehr lustige Weise durchgestanden, sondern auch legendäre Ausflüge erlebt. Bei *Dr. Milan Vrabel* möchte ich mich an dieser Stelle für die unterschiedlichen Vorstellungen entschuldigen, wie eine Reaktion auszusehen hat. Ich kann jedoch wirklich nichts dafür, dass Proteine keine organischen Lösemittel mögen. *Christian Deiml* danke ich für seine Hilfsbereitschaft und ein offenes Ohr. Sei es um ein fehlgeschlagenes Experiment zu verfluchen, das Warum zu diskutieren oder sich mit mir über das ein oder andere Erfolgserlebnis zu freuen. Danke für die Überstunden an der Orbitrap und vor allem für Deine liebe Art. Ich wünsche Dir viel Erfolg in Deinem neuen Job und freu mich auf Deinen Besuch in Kalifornien. Meinem „Nachfolger“ und

Laborkollegen *Michael Gattner* danke ich für die sehr gute Zusammenarbeit, das Schließen von Wissenslücken (*Capitol-Versicherung*) und für unzählige Lachkrämpfe. Ich wünsche Dir viel Erfolg für Deine Doktorarbeit und hoffe, dass Du nicht gleich rot wirst, wenn Du das hier liest. *Dr. Sabine Schneider* danke ich für konstruktive Diskussionen, gemütliches Beisammensein an Freitag-Abenden und die Spanferkelnase. Bei *Dr. Markus Müller* möchte ich mich für konstruktive Diskussionen, hilfreiche Tipps und leckeren, vegetarischen Zwiebelkuchen bedanken. *Korbinian Heil* danke ich für viele, viele Antworten auf ebenso viele Fragen von mir sowie *Tim Gehrke* für kurze, treffende Bemerkungen und für fünf Kuchenstücke (siehe Spanferkelnase).

Für die tatkräftige Unterstützung im Labor möchte ich mich bei meinen F-Praktikantinnen/Bachelor-Studentinnen *Susanne Ciniawsky*, *Stephanie Kloppe* und *Monika Dienst* bedanken.

In 4 1/2 Jahren durchlebt man einige Mädelsabend-Konstellationen. An dieser Stelle danke ich den Beteiligten *Dr. Stephanie Schorr*, *Dr. Corinna Kaul* und *Dr. Aline Gegout* für die frühen sowie *Dorothea Matschkal*, *Veronika Reiter*, *Dr. Viviana Fluxa*, *Sandra Koch* und *Ines Thoma* für die späten Abende. Ganz herzlich möchte ich mich auch bei *Dr. Stephanie Schorr* und *Dr. Christian Trindler* für schweißtreibende Ausflüge in die Berge, zum Kletterfels und auf die Skipiste, bedanken. Dass ich jetzt Skifahr'n kann ist unter anderem Eurem tatkräftigen Einsatz auf dem Hasliberg zuzuschreiben.

Meinem Freund, *Dr. Vladimir Sofiyev*, danke ich für die aufregendste Zeit in meinem Leben - auch wenn wir sie teilweise weit getrennt voneinander erlebt haben. Du hast mich bei sehr vielen Dingen gut beraten und ermutigt.

Mein größter Dank gilt meiner Familie, mit deren Unterstützung diese Arbeit erst möglich geworden ist. Ich danke Euch für Alles.

Liste der Publikationen

1. E. Kaya, M. Vrabel, Ch. Deiml, S. Prill, V. Fluxa und T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed. (angenommen)*. "A Genetically encoded Norbornene-Amino Acid Allows Mild and Selective Cu-free Click Modification of Proteins".
2. A. F. Glas, E. Kaya, S. Schneider, K. Heil, D. Fazio, M. J. Maul und T. Carell, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 3254-3255. "(6-4) Photolyases Initiate a 4π Electrocyclic Ring Opening of Dewar DNA Lesions to Enable Dewar Repair".
3. E. Kaya, K. Gutsmedl, M. Vrabel, M. Müller, P. Thumbs und T. Carell, *ChemBioChem* **2009**, *10*, 2858-2861. "Synthesis of Threefold Glycosylated Proteins using Click Chemistry and Genetically Encoded Unnatural Amino Acids".
4. A. F. Glas, M. J. Maul, M. Cryle, T. R. M. Barends, S. Schneider, E. Kaya, I. Schlichting und T. Carell, *Proc. Nat. Acad. Sci.* **2009**, *106*, 11540-11545. "The archaeal cofactor F_0 is a light-harvesting antenna chromophore in eukaryotes".

Konferenzbeiträge

1. Poster-Präsentation: "Incorporation of unnatural amino acids into proteins for click chemistry". Heidelberg, September 2010, EMBL-Konferenz "Chemical Biology".
2. Vortrag: "Incorporation of unnatural amino acids into proteins". Bayer CropScience in Monheim, Mai 2009, GDCh Meeting.
3. Poster-Präsentation: "Identification of a novel (6-4) Photolyase". Les Houches (Frankreich), Januar 2009, 8th Winter Research Conference "Oxidative DNA Damage".

INHALTSVERZEICHNIS

1	ZUSAMMENFASSUNG	5
1.1	EINBAU UNNATÜRLICHER AMINOSÄUREN IN PROTEINE	5
1.2	DEWAR-REPARATUR DURCH (6-4) PHOTOLYASEN	7
2	SUMMARY	13
2.1	INCORPORATION OF UNNATURAL AMINO ACIDS INTO PROTEINS.....	13
2.2	REPAIR OF DEWAR-LESIONS BY (6-4) PHOTOLYASES	15
3	EINBAU UNNATÜRLICHER AMINOSÄUREN IN PROTEINE	19
3.1	DER GENETISCHE CODE UND SEINE NATÜRLICHE ERWEITERUNG	19
3.1.1	Selenocystein.....	22
3.1.2	Pyrrolysin	23
3.2	EINBAU UNNATÜRLICHER AMINOSÄUREN IN PROTEINE	25
3.3	BIOORTHOgonALE MODIFIKATION VON PROTEINEN	29
3.3.1	1,3-dipolare Cycloadditionen	30
3.3.2	Staudinger Reaktion und Staudinger Ligation	31
3.3.3	Photoinduzierte 1,3-dipolare Cycloaddition	32
3.3.4	Diels-Alder Reaktion	32
3.4	AUFGABENSTELLUNG	33
3.5	ERGEBNISSE UND DISKUSSION.....	34
3.5.1	Klonierung der Co-Expressionsplasmide	34
3.5.2	<i>Screening</i> für geeignete PylRS-Substrate	41

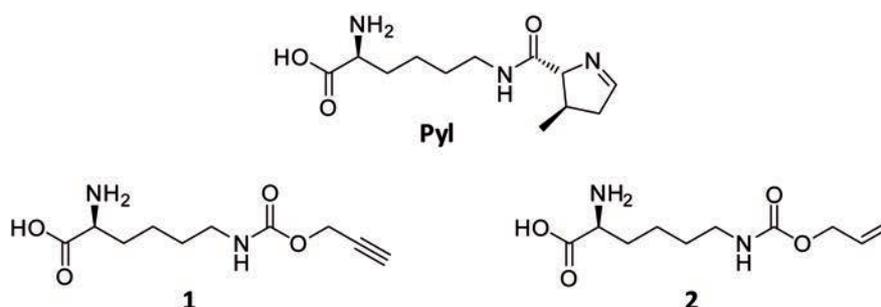
3.5.3	Aufreinigung von YFP _{Lys114Alkin}	45
3.5.4	Bestimmung der Suppressions-Effizienz	46
3.5.5	Mehrfach-Einbau des Alkin-Analogons in Proteine.....	48
3.5.6	Funktionalisierung von Alkin-Lysin im Protein	51
3.5.7	Einbau eines Alloc-Derivats von Pyrrolysin zur kupferfreien Click-Reaktion.....	54
3.5.8	Genetische Kodierung von Norbornen- und Hydroxylamin-Aminosäuren zur Durchführung Kupfer-freier Click-Reaktionen	56
3.5.9	Iterative Saturierungsmutagenese von <i>M. mazei</i> PylRS zur Generierung neuer Substratspezifität	59
3.5.10	Einbau von Norb-Lysin in die <i>humane</i> Polymerase κ	70
3.5.11	Bioorthogonale Modifizierung von genetisch kodierten Norbornenen in Proteinen	72
3.5.12	Aktivitätsbestimmung der Click-modifizierten <i>hPol</i> κ Gln163Norb.....	75
3.5.13	Bioorthogonale PEGylierung von Norb-Lysin in Proteinen	76
4	DEWAR-REPARATUR DURCH (6-4) PHOTOLYASEN	81
4.1	DNA-PHOTOSCHÄDEN	81
4.1.1	Bildung und Eigenschaften von DNA-Photoschäden.....	82
4.1.2	Reparatur von DNA-Photoschäden	84
4.1.3	(6-4)-Photolyase	85
4.2	AUFGABENSTELLUNG	91
4.3	ERGEBNISSE UND DISKUSSION.....	92
4.3.1	Enzymatische Reparatur von Dewar-Schäden	92

4.3.2	Charakterisierung des Übergangszustandes bei der Dewar-Reparatur	96
5	MATERIALIEN UND METHODEN	99
5.1	ALLGEMEINE CHEMIKALIEN UND LÖSUNGSMITTEL	99
5.2	GERÄTE	99
5.3	DNA- UND PROTEINSTANDARDS	101
5.4	PLASMIDE OHNE INSERTS	102
5.5	SPEZIELLE SYSTEME	102
5.6	ENZYME UND ANTIKÖRPER	104
5.7	PUFFER	104
5.8	LÖSUNGEN	106
5.9	MEDIEN	107
5.10	ANTIBIOTIKA (1000X STOCKLÖSUNGEN)	108
5.11	INDUKTIONSMITTEL ZUR PROTEINEXPRESSION	108
5.12	<i>E. COLI</i> -STÄMME	109
5.13	MIKROBIOLOGISCHE METHODEN	109
5.14	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	112
5.15	PROTEINCHEMISCHE METHODEN	126
5.16	ANALYTISCHE METHODEN	131
5.17	BIOCHEMISCHE METHODEN	135
6	LITERATURVERZEICHNIS	137
7	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	161
8	ANHANG	165

1 ZUSAMMENFASSUNG

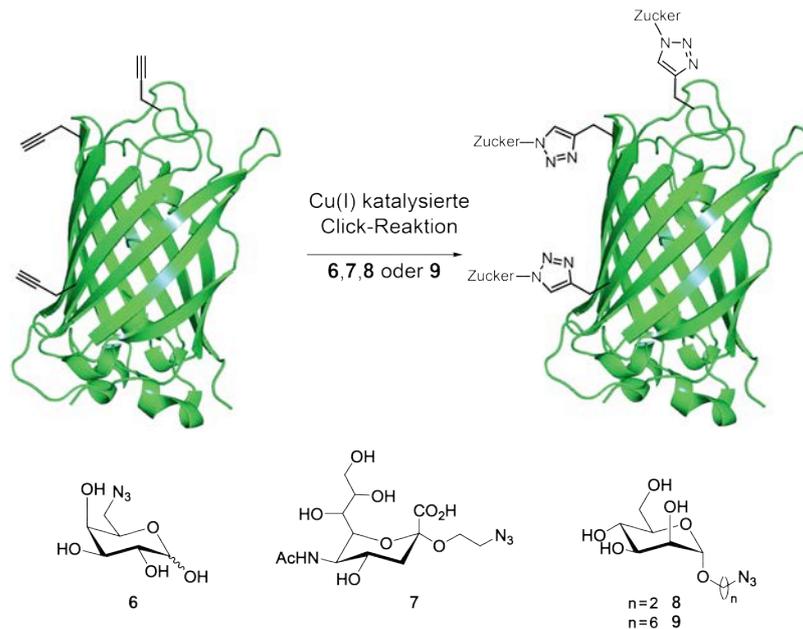
1.1 EINBAU UNNATÜRLICHER AMINOSÄUREN IN PROTEINE

Der *in vivo* Einbau unnatürlicher Aminosäuren mit besonderer Reaktivität an definierten Positionen in Proteine ist die Methode der Wahl, um Proteineigenschaften zu ändern oder diese mit gewünschten Funktionen auszustatten. Hierzu bedarf es eines orthogonalen tRNA/Aminoacyl-tRNA Synthetase (AaRS) Paares für die entsprechende Aminosäure.^[1-2] Seit neuestem wird in diesem Zusammenhang das Pyrrolysin-System verwendet, welches sich insbesondere in *E. coli* zum Einbau unnatürlicher Aminosäuren aufgrund seiner Orthogonalität zur *E. coli*-Translationsmaschinerie eignet.^[3-6] Pyrrolysin (Pyl) wurde als 22. natürliche Aminosäure identifiziert und wird mittels eines orthogonalen PyltRNA_{CUA}/PylRS Paares sowie eines internen *Amber*-codon (UAG) translatiert.^[7-9] In der Natur konnte Pyl im aktiven Zentrum von Mono-, Di- und Trimethylamin Methyltransferasen von methanogenen *Archaea* nachgewiesen werden.^[10-12] Während dieser Dissertation wurde das Pyl-System aus *Methanosarcina mazei* MS in *E. coli* angewendet, um den Einbau reaktiver Pyrrolysin-Analoga in Proteine und deren bioorthogonale Glykosylierung zu erzielen (**Schema 1.1**).



Schema 1.1: Struktur von Pyrrolysin sowie der Alkin-(1) und Alken-(2) Derivate.

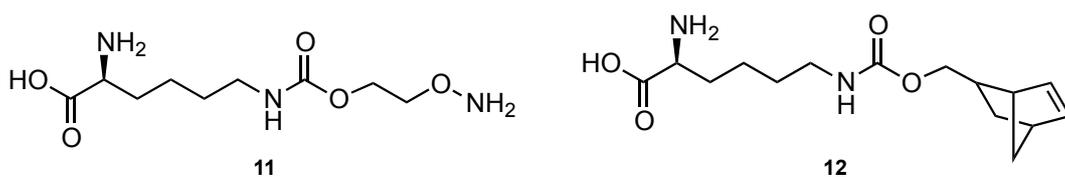
Ein Expressionssystem basierend auf dem Vektor pET-Duet1 (Novagen) wurde kloniert, welches neben der PylRS und drei PyltRNA_{CUA}-Kopien auch ein Zielprotein (mit ein bis drei internen *Amber*-Codons) kodierte. Bei Zugabe der unnatürlichen Aminosäure zur Expressionskultur konnten so bis zu drei unnatürliche Alkin- bzw. Alken-Aminosäuren in ein YFP-Molekül eingebaut werden.^[13]



Schema 1.2: Cu(I) katalysierte Click-Reaktion von dreifach Alkin-modifiziertem YFP mit Zuckeraziden.

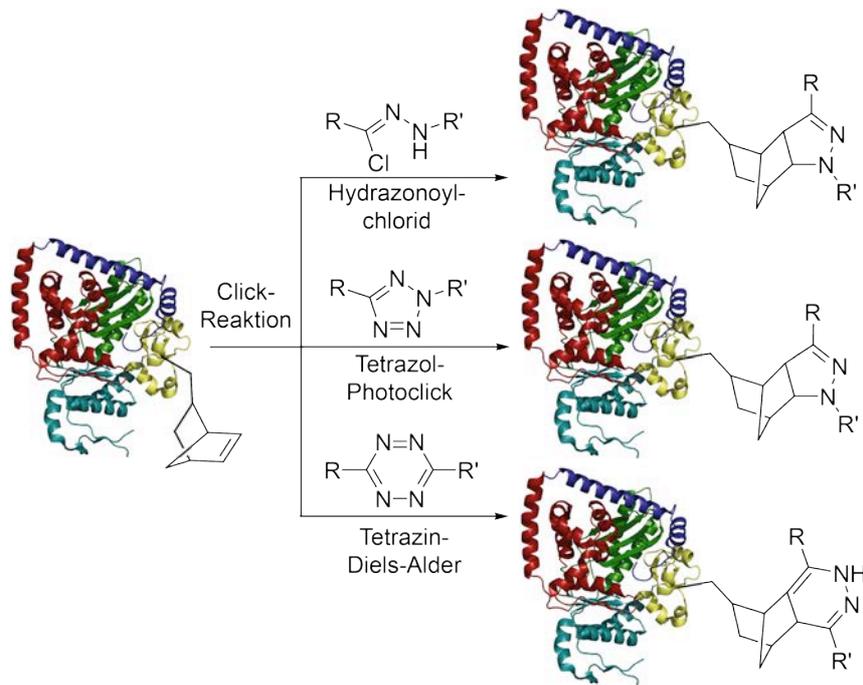
Die Alkingruppen im Protein wurden anschließend über die Cu(I)-katalysierte Huisgen-Meldal-Sharpless Reaktion mit Zuckeraziden modifiziert (**Schema 1.2**). Anschließend wurden die Position der Alkine sowie die erfolgreiche Glykosylierung über eine detaillierte Peptid-Analyse mittels moderner nano-HPLC MS/MS nachgewiesen.

Um die Katalyse mit Cu(I) zu vermeiden, welches zur Denaturierung von Proteinen führen kann, wurde im Rahmen dieser Arbeit zudem der genetische Einbau von Norbornen- und Hydroxylamin-Aminosäuren im Protein erreicht (**Schema 1.3**). Norbornene haben eine sehr reaktive Doppelbindung und sind daher geeignete Substrate für eine Vielzahl von Reaktionen. Sie stehen zum Beispiel als geeignete Reaktionspartner in 1,3-dipolaren Cycloadditionen zur Verfügung.^[14-15] Die Aminogruppe in Hydroxylaminen hingegen kann mit Aldehyden stabile Oxime bilden.



Schema 1.3: Struktur der Hydroxylamin-(11) und Norbornen-(12) Derivate von Pyl.

Da die Wildtyp PylRS diese Aminosäuren nicht oder nur unzureichend einbaut, wurde das Protein zur Generierung der gewünschten Substratspezifität über iterative Saturierungsmutagenese (ISM) evolviert.^[16] Hierbei wurden die für die Substraterkennung wichtigen Reste sukzessive randomisiert und eine daraus resultierende verbesserte Substratspezifität in einem in dieser Arbeit entwickeltem *in vivo* Fluoreszenz-Assay nachgewiesen.



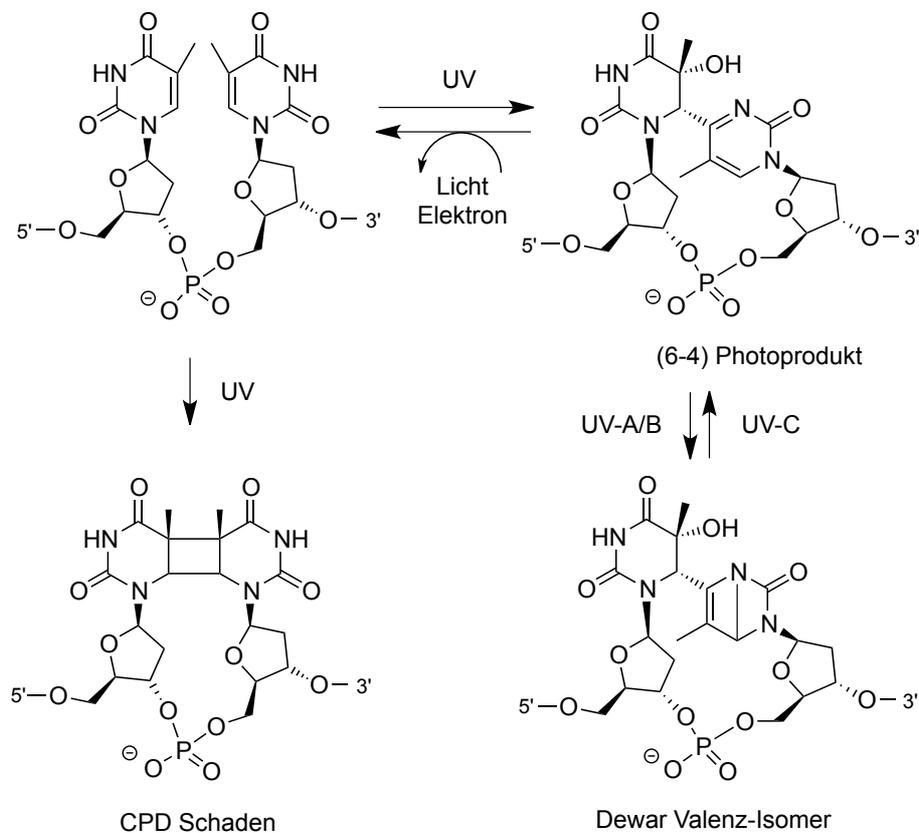
Schema 1.4: Cu(I)-freie Click-Reaktionen am Norbornen-Rest in der *humanen* Polymerase κ .

Im Anschluss wurde das Norbornen-Derivat in die *humane* Polymerase κ eingebaut und ermöglichte deren Fluoreszenz-Markierung mittels drei verschiedener Cu(I)-freier Click-Reaktionen: (i) einer photo-induzierten dipolaren Cycloaddition mit Tetrazol, (ii) einer dipolaren Cycloaddition mit Hydrazonoyl-Chlorid sowie (iii) einer inversen Diels-Alder-Reaktion mit Tetrazin (**Schema 1.4**).^[17]

1.2 DEWAR-REPARATUR DURCH (6-4) PHOTOLYASEN

UV-Strahlung führt in der DNA zur Bildung mutagener Cyclobutan Pyrimidine Dimere (CPD) und Pyrimidin(6-4)pyrimidon Photoprodukte [(6-4) Photoprodukte].^[18] Bei (6-4) Photoprodukten führt eine UV-A/B Bestrahlung zusätzlich durch eine 4π sigmatrope

Umlagerung zur Bildung der korrespondierenden Dewar Valenz-Isomere (**Schema 1.5**).^[19]

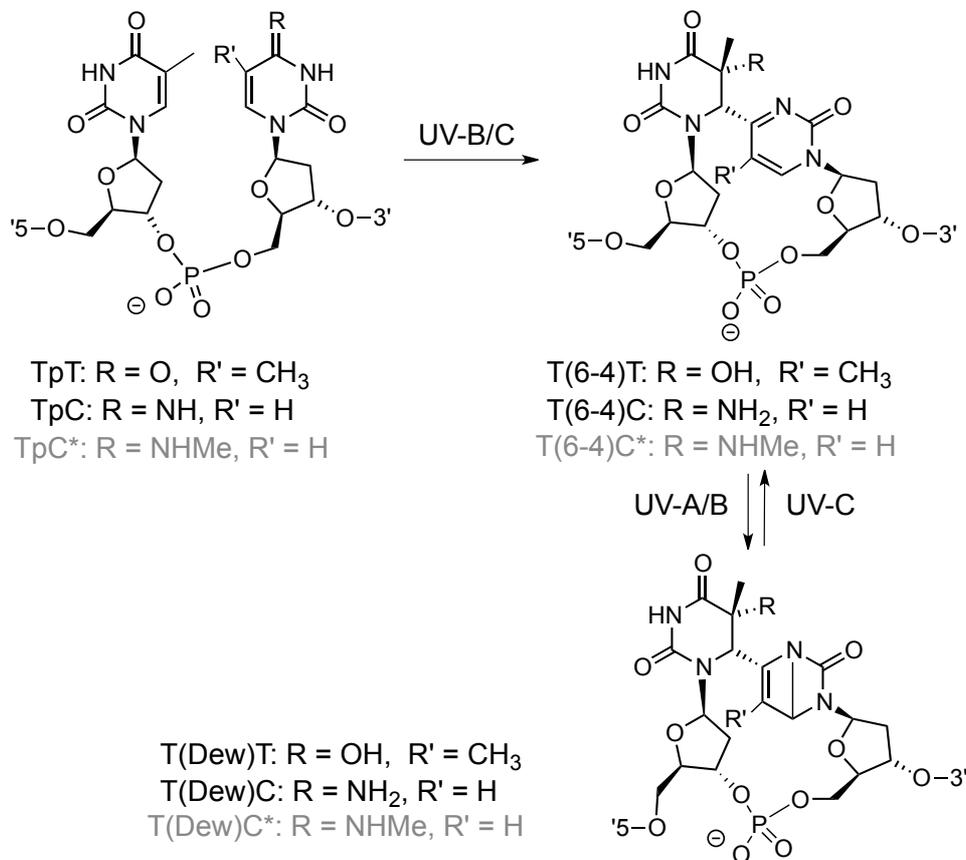


Schema 1.5: Bildung UV-induzierter DNA-Schäden in einer Dipyrimidin-Sequenz.

Als Reaktion auf die stetige Belastung durch UV-Strahlen haben viele Organismen einen direkten, lichtabhängigen Reparaturmechanismus entwickelt, der von CPD bzw. (6-4) Photolyasen katalysiert wird.^[20-22] CPD Photolyasen und (6-4) Photolyasen gehören der Familie der Photolyase/Cryptochrom-Blaulicht-Rezeptoren an. Sie binden FADH^- als katalytischen Cofaktor, welcher im angeregten Zustand die Reparatur des jeweiligen Photoschadens durch Elektronentransfer initiiert.^[23-25] Ein weiterer Cofaktor der Photolyasen fungiert als Photoantenne.^[26-27] Dieser ist nicht essentiell, erleichtert jedoch die Photonenabsorption und erhöht somit die Effizienz dieser lichtabhängigen Katalyse. Als zweitem Cofaktor stehen Photolyasen Methenyltetrahydrofolat (MTHF) oder 7,8-Didemethyl-8-hydroxy-5-deazaflavin (F_0) zur Verfügung.

Um die Reparatur von (6-4) Photoprodukten durch (6-4) Photolyasen zu untersuchen, synthetisierte die Arbeitsgruppe *Carell* unterschiedliche (6-4) Photoschäden

(**Schema 1.6**) in DNA.^[28] Sie konnte zeigen, dass T(6-4)T und T(6-4)C effizient, das Analogon T(6-4)C* jedoch schlechter durch die (6-4) Photolyase repariert wird.

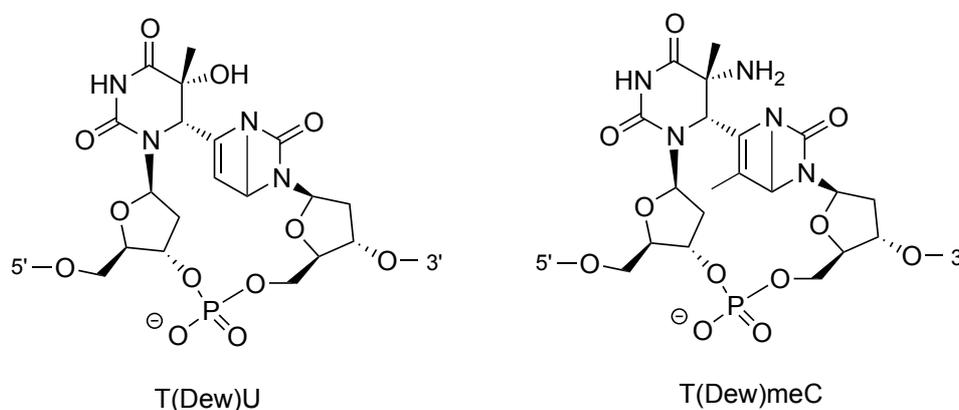


Schema 1.6: UV-induzierte T(6-4)T, T(6-4)C, T(6-4)C*, T(Dew)T, T(Dew)C und T(Dew)C* Schäden ausgehend aus den Sequenzen TpT, TpC und TpC*.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die entsprechenden Dewar Valenz-Isomere dieser (6-4) Schäden in DNA erzeugt (**Schema 1.6**) und auf ihre Reparatureigenschaft durch die (6-4) Photolyase aus *Drosophila* getestet. Es konnte nachgewiesen werden, dass die (6-4) Photolyase T(Dew)C, jedoch nicht T(Dew)T repariert. T(Dew)C*, welches ebenfalls synthetisiert und in Reparaturassays eingesetzt wurde, konnte ebenfalls durch die (6-4) Photolyase erkannt und umgewandelt werden. Während der Reparatur des T(6-4)C* kam es jedoch zur Akkumulation eines Zwischenproduktes. Bei diesem Intermediat handelte es sich vermutlich um die korrespondierende T(6-4)C* Spezies. Um zu beweisen, dass die enzymatische Reparatur von Dewar-Schäden über das (6-4) Intermediat verläuft, wurden weitere enzymatische Untersuchungen durchgeführt. Hierzu wurden die Dewar-Schäden T(Dew)T, T(Dew)C und T(Dew)C* in Reparaturassays mit einer (6-4) Photolyase-

Mutante (H365N) repariert, welche (6-4) Schäden nicht reparieren kann aber weiterhin die Elektroneninjektion auf den Pyrimidindimer katalysiert. Es konnte eine Akkumulierung der (6-4) Intermediate sowohl für T(Dew)C* als auch für T(Dew)C nachgewiesen werden. Damit ist gezeigt, dass auch diese Umwandlung sehr wahrscheinlich über Elektronentransfer erfolgt. Eine T(Dew)T Umwandlung konnte nicht beobachtet werden. Die hier gewonnen Ergebnisse verdeutlichen die beiden Funktionen von (6-4) Photolyasen: neben der Reparatur von (6-4) Schäden katalysieren sie auch die 4π sigmatropische Umwandlung von Dewar-Isomeren zu den (6-4) Spezies.

Um den Dewar-Reparaturmechanismus weiter aufzuklären, wurden zwei zusätzliche Dewar-Isomere in DNA-Strängen hergestellt: die synthetischen Derivate T(Dew)U und T(Dew)meC (**Schema 1.7**). Sie besitzen aufgrund ihrer Methyllierungsmuster veränderte Elektronendichten im 5'-Ringsystem und stellen Hybrid-Strukturen der Isomere T(Dew)T und T(Dew)C dar. Die Reparatureigenschaften dieser synthetischen Derivate wurden mit denen der natürlichen Dewar-Isomeren verglichen. Dies sollte klären, warum die (6-4) Photolyase T(Dew)C, jedoch nicht T(Dew)T reparieren kann.



Schema 1.7: Strukturen der synthetischen Dewar-Schäden T(Dew)U und T(Dew)meC.

Dabei stellte sich eine abnehmende Reparaturaktivität des Enzyms gegenüber den Substraten in der Reihenfolge T(Dew)C > T(Dew)U > T(Dew)meC > T(Dew)T heraus, wobei wie erwartet keine Reparatur des T(Dew)T-Schadens stattfand. In keinem Assay konnte das jeweilige (6-4) Intermediat nachgewiesen werden. Dies deutete auf eine langsame 4π sigmatrope Umlagerung der Dewar-Schäden hin, auf

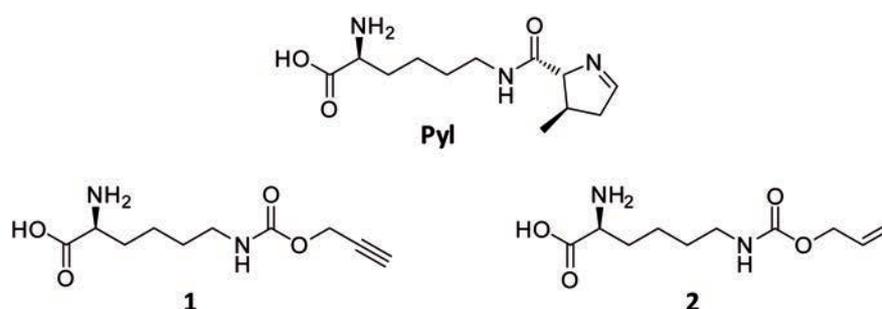
welche eine schnell ablaufende, nicht Raten-bestimmende Reparatur der (6-4) Spezies in die intakten Basen folgt. Die Reihenfolge, in der die angebotenen Substrate von der (6-4) Photolyase repariert werden, bekräftigte die Ausgangshypothese, wonach die Methylgruppe an der C5'-Position und die dadurch veränderte Elektronendichte Einfluss auf die Reparaturfähigkeit des Dewar-Isomers hat. Die erhöhte Elektronendichte führt zur Verringerung der Spindichte in der 3'-Base des Schadens und somit zur Destabilisierung der negativen Ladung in der oben beschriebenen Reihenfolge. Im Falle von T(Dew)T ist die Aufnahme des Elektrons in die 3'-Base nicht mehr möglich. Mittels *ab initio* Berechnungen, welche in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Regina De Vivie-Riedle durchgeführt wurden, konnte zudem gezeigt werden, dass hierfür ein hyperkonjugativer Effekt verantwortlich ist.

2 SUMMARY

2.1 INCORPORATION OF UNNATURAL AMINO ACIDS INTO PROTEINS

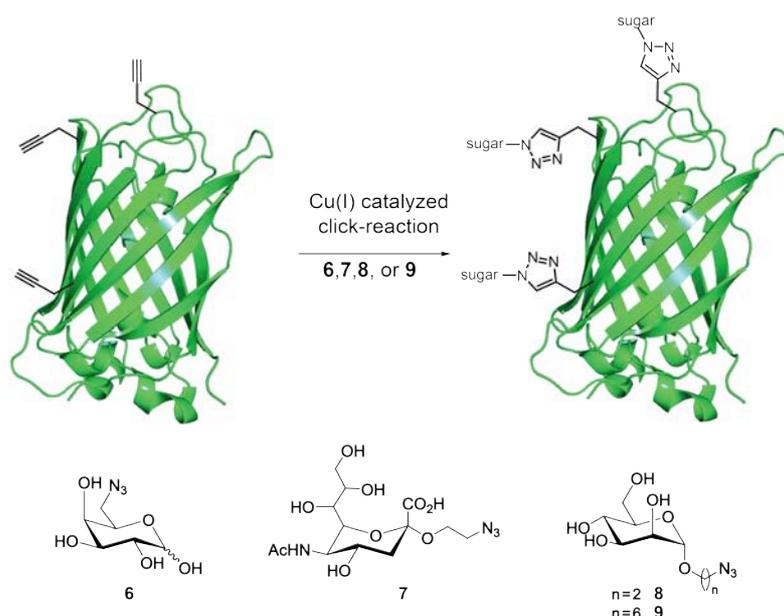
The genetic encoding and *in vivo* incorporation of unnatural amino acids (UAAs) with unique reactivity at a defined site is a desirable method to evolve new protein functions and enhance their properties. This method requires an orthogonal tRNA/aminoacyl-tRNA synthetase (AaRS) pair.^[1-2]

Pyl has been identified as the 22nd amino acid that is translated by an orthogonal pyrrolysyl-tRNA/pyrrolysyl-tRNA synthetase (PyltRNA_{CUA}/PylRS) pair.^[3-6] This amino acid has been identified^[7-9] in the active site of mono-, di-, and trimethylamine methyltransferases from methanogenic *archae* and is encoded by an in-frame *Amber*-codon (UAG).^[10-12] We have employed the pyrrolysine system of *Methanosarcina mazei* for incorporation of reactive pyrrolysine (Pyl) derivatives (**Scheme 2.1**) that were later on used for site-specific glycosylation.



Scheme 2.1: Structures of pyrrolysine and its alkyne (1) and alkene (2) analogs.

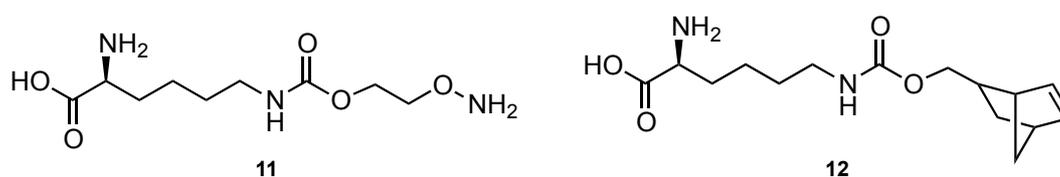
We created an expression system based on the vector pET-Duet1 (Novagen) encoding a recombinant PylRS and three copies of PyltRNA_{CUA} in the first and the protein of interest (including the *Amber*-codon) in the second multiple cloning site. By insertion of more than one *Amber*-codon into the open reading frame of YFP we showed that incorporation of up to three artificial alkyne or alkene amino acids is possible.^[13]



Scheme 2.2: Cu(I) catalyzed click-reaction of threefold alkyne-modified YFP with sugar-azides.

The alkyne functionalities in the protein were then modified with sugar moieties by the Cu(I)-catalyzed Huisgen-Meldal-Sharpless reaction (**Scheme 2.2**). Using modern peptide-fragment-based proteomic mass spectrometry techniques the position of the alkyne units and the corresponding glycosylated sites were verified.

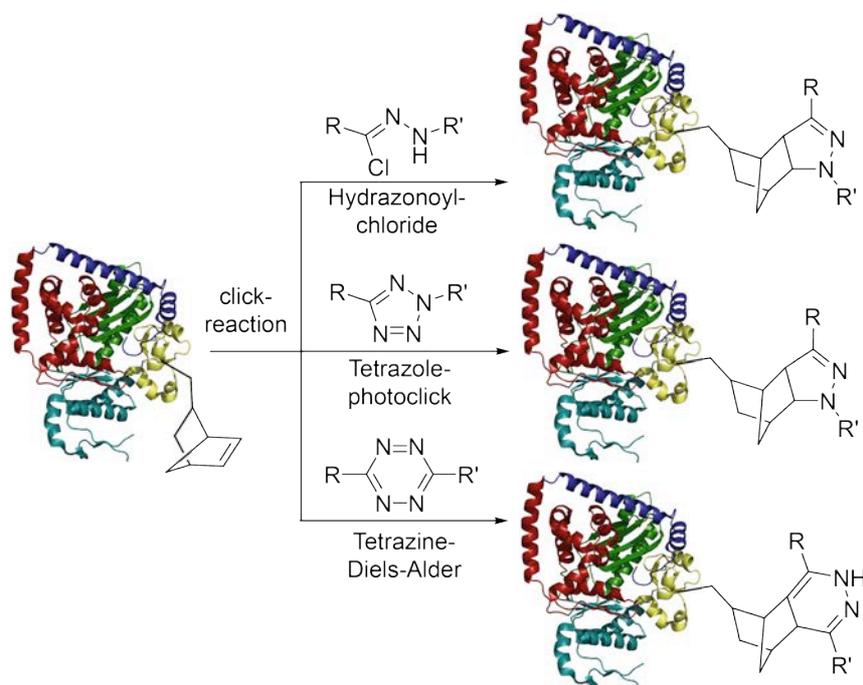
In order to avoid the use of Cu(I), which is known to denature more delicate proteins, we focused on norbornene and hydroxylamine derivatives of pyrrolysine (**Scheme 2.3**). Norbornenes have a highly reactive double bond and are therefore useful derivatives for a variety of reactions. For example, one could perform efficient 1,3-dipolar cycloaddition reactions under mild conditions as we published before on norbornene containing oligonucleotides.^[15] The amine moiety of the hydroxylamine amino acid can react with various ketones or aldehydes to form stable oximes.



Scheme 2.3: Structures of hydroxylamine (11) and norbornene (12) analogs of Pyl.

As the substrate specificity of PylRS for the new amino acids was not sufficient we engineered the enzyme using iterative saturation mutagenesis (ISM).^[16] In the course

of ISM the residues of interest in the enzyme were saturated stepwise and increased substrate specificity was reflected in higher fluorescence intensity due to incorporation of the UAAs into our YFP expression assay.

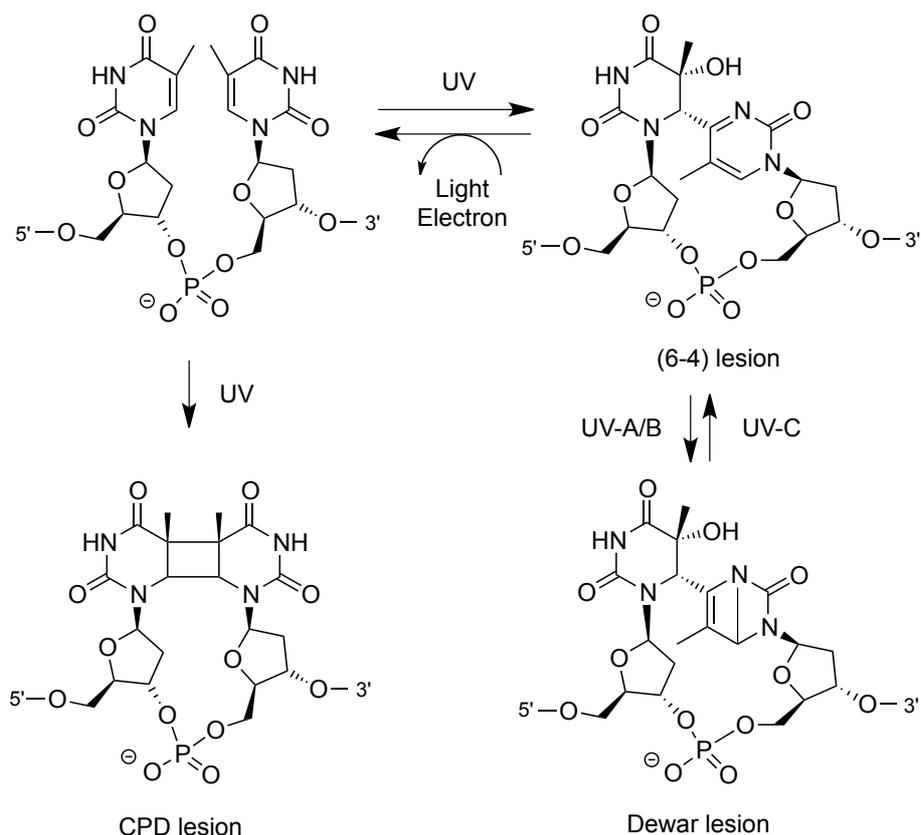


Scheme 2.4: Cu(I)-free click-reaction with the norbornene moiety in *human* polymerase κ .

The norbornene analog was then incorporated into *human* polymerase κ and used for labeling of the protein with fluorescent dyes by different copper-free click-reactions (**Scheme 2.4**): (i) a dipolar cycloaddition reaction of nitrilimines generated from the corresponding hydrazonoyl chloride or (ii) photocleavage from tetrazole and (iii) an inverse electron demand Diels-Alder reaction with tetrazine.^[17]

2.2 REPAIR OF DEWAR-LESIONS BY (6-4) PHOTOLYASES

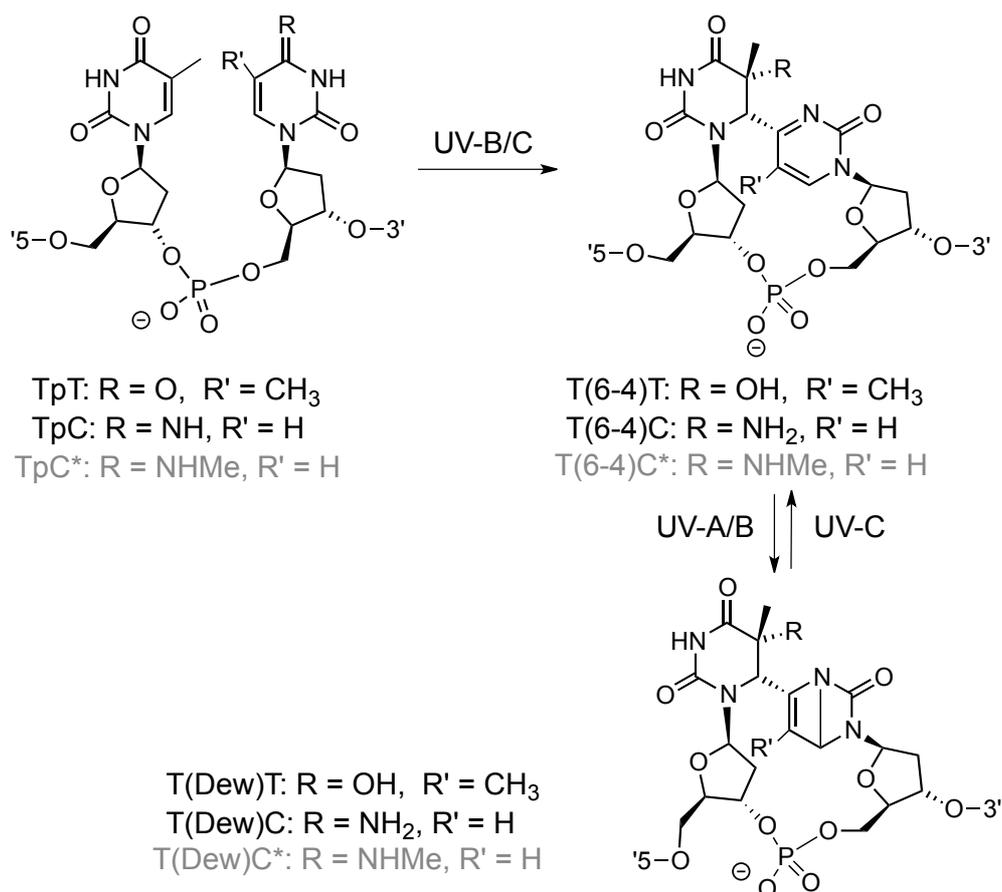
UV irradiation of DNA gives rise to the formation of cyclobutane pyrimidine dimers (CPD) and pyrimidine(6-4)pyrimidone photoproducts [(6-4) photoproducts] as the major photolesions.^[18] The (6-4) photoproducts undergo a 4π sigmatropic rearrangement upon further irradiation with UV-A/B to give the corresponding Dewar valence isomers (**Scheme 2.5**).^[19]



Scheme 2.5: Formation of UV-induced DNA-lesions in a di-pyrimidine sequence.

In response to the constant challenge of UV irradiation, organisms have developed a direct light-induced repair reaction catalyzed by CPD and (6-4) photolyases, respectively.^[20-22] CPD photolyases and (6-4) photolyases are members of the photolyase/cryptochrome blue-light receptor family. These enzymes bind two chromophores: FADH⁻ acts as a catalytically essential cofactor, which transfers an electron to the lesion upon photoexcitation.^[23-25] This leads to repair of the photolesion. The other chromophore can either be methenyltetrahydrofolate (MTHF) or 7,8-didemethyl-8-hydroxy-5-deazaflavine (F₀).^[26-27] In contrast to FADH⁻ these cofactors are not essential but act as light-harvesting cofactors.

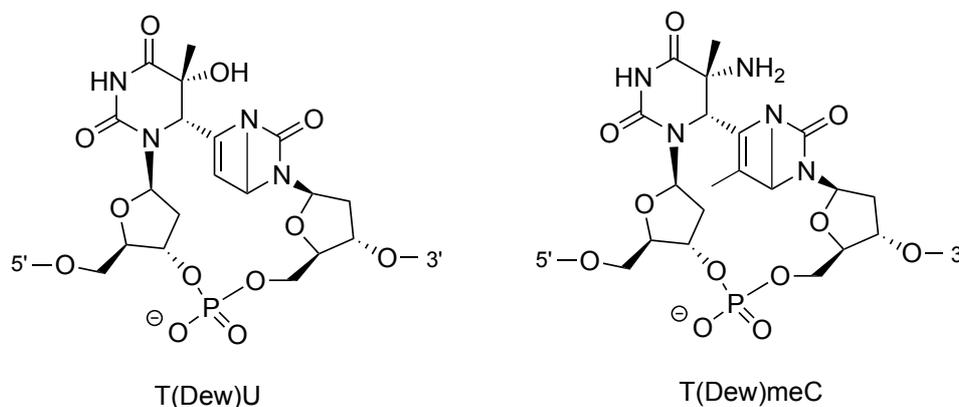
In order to investigate the repair of (6-4) photoproducts by (6-4) photolyases *Carell* and coworkers created different (6-4) photolesions in DNA (**Scheme 2.6**).^[28] They could show that T(6-4)T and T(6-4)C were efficiently repaired by the enzyme while repair of the T(6-4)C* analog was less efficient.



Scheme 2.6: UV-induced T(6-4)T, T(6-4)C, T(6-4)C*, T(Dew)T, T(Dew)C, and T(Dew)C* lesions derived from TpT, TpC, and TpC* sequences, respectively.

In this study, repair assays with the *Drosophila* (6-4) photolyase and the corresponding Dewar lesions T(Dew)T, T(Dew)C, and T(Dew)C* were performed. The assays revealed different repairability of the Dewar isomers by the enzyme. The (6-4) photolyase repaired T(Dew)C, but not T(Dew)T. During repair of T(Dew)C*, T(6-4)C* occurs as a repair intermediate. To prove that the enzyme converts the Dewar isomers into the respective (6-4) lesions, all three Dewar-lesion containing oligonucleotides were repaired with a mutant enzyme (H365N), which is able to transfer an electron to the di-pyrimidine lesion but is unable to repair (6-4) lesions. In these experiments we observed the accumulation of the (6-4) lesion intermediate not only for the T(Dew)C* but also for the T(Dew)C. No rearrangement of the T(Dew)T lesion was observed, showing that in this case the Dewar to (6-4) rearrangement is impossible. In summary this data shows the two functions of the (6-4) photolyases: these enzymes not only split (6-4) lesions but also catalyze the 4π sigmatropic rearrangement of Dewar isomers to the corresponding (6-4) species.

In order to understand the different repairabilities of T(Dew)T and T(Dew)C, DNA containing the synthetic derivatives T(Dew)U and T(Dew)meC (**Scheme 2.7**) were also investigated in repair assays. These lesions differ in the electron density of the 3' and 5' ring system and represent hybrids of the naturally occurring lesions.



Scheme 2.7: Structures of the synthetic lesions T(Dew)U und T(Dew)meC.

Our studies revealed that the repairability is indeed influenced by the electron density resulting from different methylation patterns. The ability of the (6-4) photolyase to repair the Dewar isomers was decreased in the order T(Dew)C > T(Dew)U > T(Dew)meC > T(Dew)T. No repair could be observed for T(Dew)T, in agreement with previous results. In all other cases, no (6-4) intermediate could be detected. Thus, the 4π electrocyclic ring opening reaction, which gives rise to the (6-4) lesion as an intermediate, is subsequently followed by the fragmentation to the repaired di-pyrimidine.

The results clearly show the effect of the electron density. A higher electron density in the 3' ring system destabilizes the negative charge introduced by the FADH^- cofactor. Our results were in agreement with *ab initio* calculations performed by the group of *Prof. Dr. Regina De Vivie-Riedle*. Herein, a hyperconjugative effect was found to change the stability of the intermediate.

3 EINBAU UNNATÜRLICHER AMINOSÄUREN IN PROTEINE

3.1 DER GENETISCHE CODE UND SEINE NATÜRLICHE ERWEITERUNG

Die Biosynthese von Proteinen erfolgt über die Übersetzung (Translation) der genetischen Information in eine Aminosäure-Sequenz und basiert auf dem genetischen Code. Hierbei sind es insbesondere RNA-Polymerasen, neben einer Vielzahl von regulatorischen und prozessierenden Faktoren, die den Fluss der genetischen Information einleiten:^[29-31] eine definierte DNA-Sequenz wird in einen mobilen Informationsträger, die sogenannte *messenger* RNA (mRNA), umgeschrieben (Transkription).

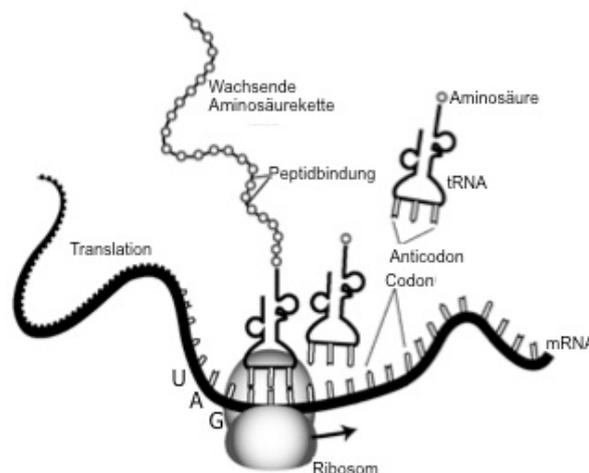


Abbildung 3.1: Ribosomale Proteintranslation. Während der dargestellten Elongation der Peptidkette wandert das Ribosom entlang der mRNA und rekrutiert mit Hilfe von Translationsfaktoren Aminoacyl-tRNAs. Hierbei katalysiert das Ribosom den Transfer der wachsenden Peptidkette der P-Stelle auf die jeweils neue Aminoacyl-tRNA an der A-Stelle.

Diese mRNA stellt ein Programm dar, nach dem die Ribosomen, große RNA/Protein-Komplexe, die Aminosäure-Bausteine in der vorgegebenen Sequenz sukzessive zu einer Peptidkette zusammenfügen.^[32-34] Die Übersetzung erfolgt dabei stets nach demselben Prinzip: das Ribosom liest die genetische Sequenz aus den vier Nucleobasen A, G, C und U als Triplet-Codon aus und übersetzt jedes dieser Codons mit einer sehr geringen Fehlerrate von 10^{-5} bis 10^{-3} in je eine Aminosäure.^[35]

Somit werden der Biosynthese Apparatur $4^3=64$ mögliche Triplet-Codons angeboten, welche es in die 20 kanonischen Aminosäuren zu übersetzen gilt.^[36-42] Der genetische Code wird daher als degeneriert bezeichnet.^[39, 43] Als „Übersetzungshilfe“ stehen dem ribosomalen Komplex sogenannte *transfer* RNAs (tRNAs) zur Verfügung.^[44-45] Dies sind kleine RNA-Oligomere mit einer Länge von 70-80 bp und einer charakteristischen L-förmigen Faltung. Durch ihr Anticodon, welche komplementär zu den Triplet-Codons der mRNA sind, sowie die Acylierung (Beladung) mit der entsprechenden Aminosäure erfüllen sie alle Voraussetzungen, um die Übersetzung der RNA- in eine Aminosäuresequenz zu ermöglichen (**Abbildung 3.1**).^[46] Doch nicht alle Triplet-Codons stehen ihnen als Substrat zur Verfügung. Neben den 61 Triplet-Kombinationen, die eine definierte Aminosäure bestimmen (*sense* Codons), existieren drei sogenannte Stopp-Codons (*nonsense* Codons), welche das Ende der Translation signalisieren. Statt eine beladene tRNA zu binden, um so die Peptidkette zu verlängern, rekrutieren Stopp-Codons *Release* Faktoren (RFs),^[47] welche den Zerfall des ribosomalen Komplexes katalysieren und somit die Translation beenden. Die Natur hat dafür die Triplets UGA (*Opal*-Codon), UAA (*Ochre*-Codon) sowie UAG (*Amber*-Codon) vorgesehen, und - so glaubte man lange Zeit - keine „passende“ tRNA bereitgestellt.

Die Dechiffrierung des genetischen Codes erfolgte Mitte der 1960er Jahre.^[48] Zu dieser Zeit war kein Organismus bekannt, der nicht den erst kürzlich aufgeklärten Regeln gehorchte. Es wurde in dieser Zeit viel über die Evolution des genetischen Codes spekuliert und nachgedacht. Die wohl bekannteste Hypothese aus dieser Zeit ist die *frozen accident* Theorie von *Francis Crick* (1968).^[49] Hierin postulierte *Crick*, dass nach den Anfängen des genetischen Codes immer mehr Aminosäuren in das Repertoire der frühen Organismen hinzukamen, bis eine ausreichende Komplexität erreicht wurde. Auf diesem Level „erstarrte“ die Evolution, da jeder weitere Gewinn an Komplexität nachteilig für den Organismus wäre. *Crick* vermutete, dass ein immer höher werdendes Maß an Komplexität zu Beginn der Entwicklung von Vorteil war, dass aber ab einem kritischen Punkt jede weitere Veränderung des Codes irgendwann zu viele intakte Proteine „gefährden“ würde. *J. Tze-Fei Wong* hingegen postulierte in seiner Co-Evolutions-Hypothese, dass der genetische Code die Konsequenz aus einer Serie von graduellen Veränderungen im Laufe der Evolution war, bei denen biosynthetisch verwandte Aminosäuren ähnliche Codons zugewiesen wurden.^[50] Eine andere, ebenfalls populäre Theorie, versuchte die Entwicklung des

genetischen Codes als Kompromiss früher Organismen zwischen Robustheit und Mutagenität zu verstehen. Hiernach ist Robustheit die treibende Kraft für den genetischen Code, Aminosäure-Substitutionen in Proteinen zu verhindern. Die Mutagenität stellt jedoch sicher, dass die Evolution der Organismen voranschreitet.^[51-52]

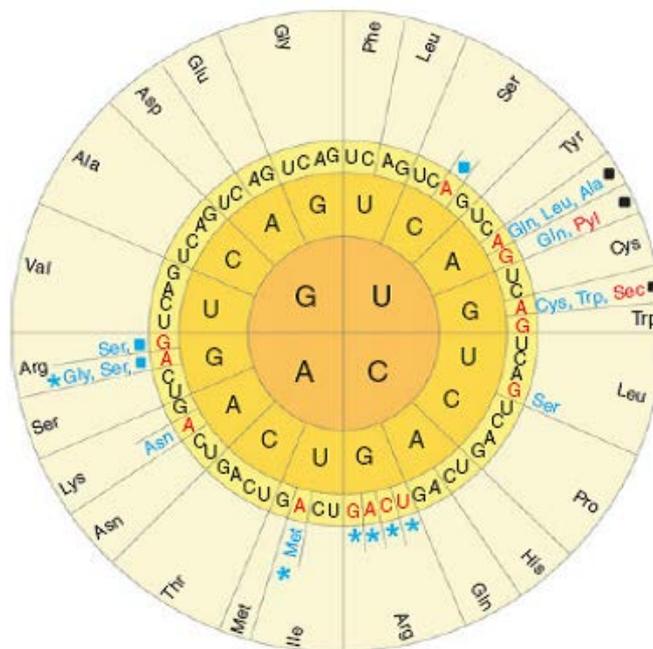
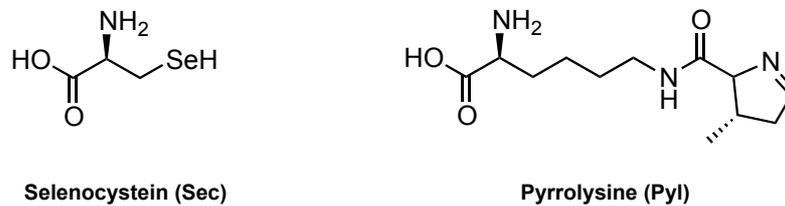


Abbildung 3.2 Natürliche Erweiterungen des genetischen Codes. Neben Neudefinitionen einiger *sense*-Codons wurden im Laufe der Erweiterung des genetischen Codes auch *nonsense*-Codons umprogrammiert; diese werden in einigen Organismen zur Kodierung von Aminosäuren verwendet.

All diese Theorien haben eines gemeinsam: sie alle verstehen den genetischen Code als universell und nicht mehr veränderbar.^[53-55] Doch mit der Entdeckung einiger natürlicher Erweiterungen des genetischen Codes musste diese Annahme erweitert werden (siehe **Abbildung 3.2**).^[10] Die ersten Abweichungen vom Standard-Code wurden in einigen Organismen gefunden, in denen einzelne *sense*-Codons für eine andere Aminosäure umprogrammiert wurden.^[56-60] Weitaus wichtiger war jedoch die Entdeckung der sogenannten *nonsense*-Suppression: Durch Neudefinition von *nonsense*-Codons und die Bereitstellung einer nicht-kanonischen Aminoacyl-tRNA waren einzelne Organismen nun in der Lage, den Einbau anderer nicht-kanonischer Aminosäuren zu ermöglichen.^[7, 61-62] Statt die Termination der Translation zu katalysieren, konnte das neu definierte Stopp-Codon eine tRNA rekrutieren und das „Weiterlesen“ erlauben. Auf diese Weise war es einigen Organismen gelungen, zwei

weitere Bausteine in ihr Aminosäure-Repertoire aufzunehmen: Selenocystein und Pyrrolysin (**Schema 3.1**).



Schema 3.1: Strukturen der 21. natürlichen Aminosäure Selenocystein und der 22. natürlichen Aminosäure Pyrrolysin.

3.1.1 SELENOCYSTEIN

Der Einbau der 21. natürlichen Aminosäure Selenocystein (Sec) erfolgt über *nonsense*-Suppression am *Opal*-Codon (UGA).^[63] Sec konnte mittlerweile im aktiven Zentrum von Selenoproteinen in Organismen aus allen drei Lebensreichen gefunden werden. *Archaea*, Bakterien und Eukaryoten unterscheiden sich dabei in der Art des cotranslationellen Einbaus von Sec, der Mechanismus ist in allen Fällen jedoch sehr komplex.^[64-65] Der Einbau von Sec in Bakterien wurde weitestgehend in *E. coli* erforscht und aufgeklärt.^[66] Hier zeigt sich, dass eine ungewöhnliche tRNA-Spezies, die sogenannte tRNA^{Sec}, eine zentrale Rolle spielt.^[67] Diese wird, ähnlich wie eine natürliche tRNA^{Ser}, von der Seryl-tRNA Synthetase als Substrat erkannt und in Ser-tRNA^{Sec} umgewandelt. An der Ser-tRNA^{Sec} erfolgt im Anschluss die Bildung von Selenocystein durch die Selenocystein Synthase (SelA).^[68-69] Dieses Enzym verwendet aktiviertes Selen, in Form von Selenophosphat,^[70-71] und überträgt es auf den Serin-Rest. Die dabei geformte Sec-tRNA^{Sec} bindet nun GTP und den speziellen Translationsfaktor SelB.^[72] Dieser Komplex besitzt eine hohe Affinität zu einer einzigartigen mRNA-Struktur im Zieltranskript, welcher aufgrund seiner Funktion als SECIS Element (*selenocysteine insertion element*) bezeichnet wird.^[73-74] Diese Wechselwirkungen zwischen dem Translationsfaktor SelB und dem Struktur-Element SECIS erlauben es dem Organismus zwischen einem UGA^{Sec} *sense*-Codon und einem UGA *nonsense*-Codon zu unterscheiden.

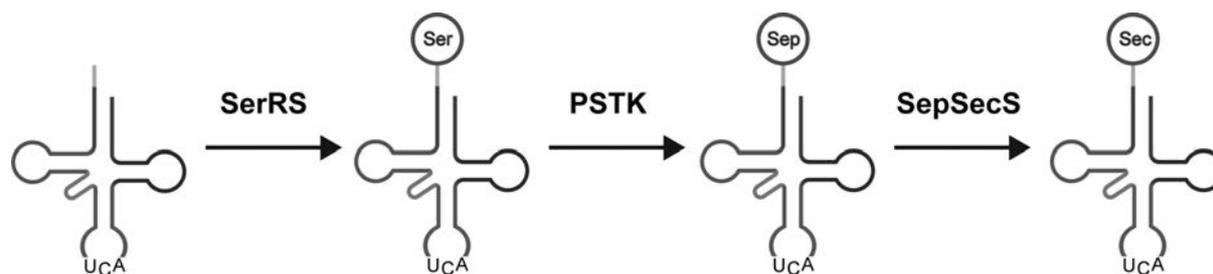


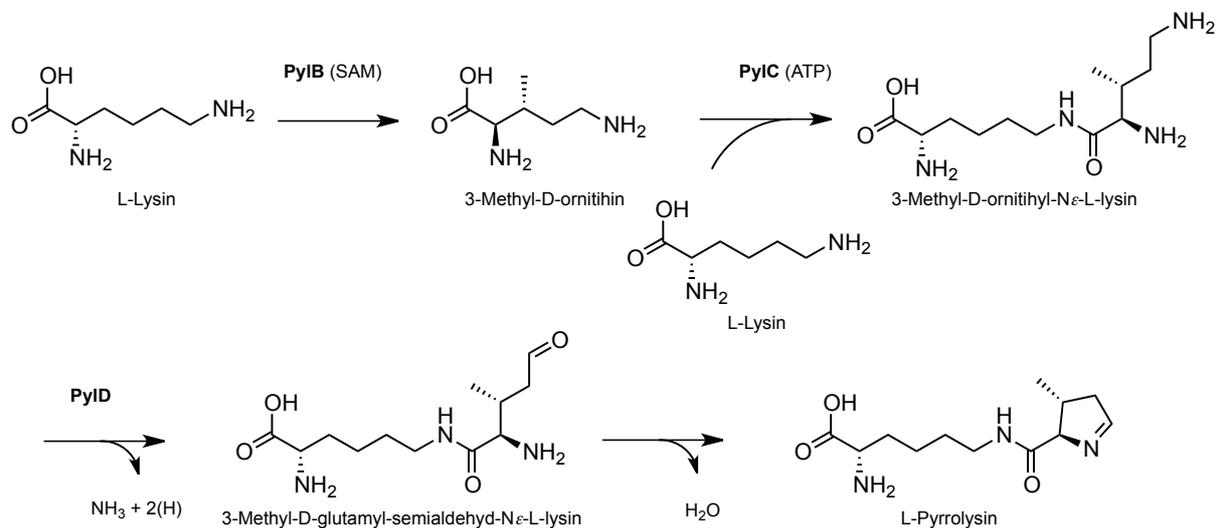
Abbildung 3.3: Schematische Darstellung der tRNA^{Sec}-Beladung mit Selenocystein in Eukaryoten und *Archaea*.

Der Mechanismus, welcher dem Einbau von Sec in *Archaea* und Eukaryoten zugrunde liegt, konnte in den letzten Jahren ebenfalls aufgeklärt werden (siehe **Abbildung 3.3**). Auch hier existiert ein SECIS-Element, welches sich nicht wie bei Bakterien unmittelbar nach dem UGA *sense*-Codon befindet, sondern am 3'-UTR. Lange Zeit konnte kein Homolog von SelA gefunden werden. Dies änderte sich mit der Identifizierung der O-Phosphoserin-tRNA Kinase (PTSK).^[68, 75] Dieses Enzym phosphoryliert Ser-tRNA^{Sec} zu O-phosphoserin-tRNA^{Sec} (Sep-tRNA^{Sec}), welches von einem SelA-ähnlichem Protein, der Sep-tRNA:Sec-tRNA Synthase (SepSecS),^[67, 76] zur gewünschten tRNA^{Sec} Spezies umgewandelt wird und durch Erkennung des SECIS-Elements mittels Translationsfaktoren an das vorgesehene *Opal*-Codon transportiert wird.

3.1.2 PYRROLYSIN

Pyrrrolisine (Pyl) wurde im Jahr 2002 als 22. Mitglied der Aminosäure-Familie entdeckt. Die Verbreitung von Pyl ist im Gegensatz zu Sec geringer und beschränkt sich neben der Existenz in einigen methanogenen *Archaea*, den *Methanosarcinae*, auf das Bakterium *Desulfitobacterium hafniense* und den Symbionten *Olavius algarvensis*.^[77-78] Pyl bildet in diesen Organismen die essentielle Aminosäure in den aktiven Zentren von Mono-, Di- und Trimethylamin-Methyltransferasen (MtmB, MtbB bzw. MttB).^[79-83] Im Gegensatz zu Selenocystein erfolgt die Kodierung von Pyrrrolisin über ein internes *Amber*-Codon (UAG),^[11] wobei kein SECIS-homologes Element im mRNA-Transkript benötigt wird.^[84-85] Auch die Beladung der tRNA ist grundlegend verschieden.^[12] Anders als Selenocystein existiert Pyrrrolisin als freie, biosynthetisch hergestellte Aminosäure.^[9, 78, 85-86] Der entsprechende Biosyntheseweg konnten insbesondere durch Studien von *Krzycki*^[87-88] und *Geierstanger*^[89] aufgeklärt

werden. Sie konnten zeigen, dass die mehrstufige Synthese von Pyrrolysin von zwei Lysininen ausgeht und von insgesamt drei Enzymen (PylB, PylC und PylD) katalysiert wird (**Schema 3.2**). PylB, ein *radical* SAM-Enzym,^[90-91] katalysiert die erste Reaktion zur Generierung von Pyrrolysin. Hierzu wandelt es ein L-Lysin Molekül in D-Ornithin, welches dem nächsten Enzym der Kaskade, PylC, zur Verfügung steht. PylC zeigt Homologien zu D-Aminosäure Ligasen und verknüpft unter ATP-Verbrauch D-Ornithin mit einem weiteren L-Lysin Molekül, um ein Dipeptid zu erhalten. Die ϵ -Aminogruppe des Dipeptids wird im letzten Schritt durch die Dehydrogenase PylD oxidiert, welche eine spontane Kondensations-Zyklisierung zum Pyrrolring ermöglicht. Die für die Pyrrolysin-Biosynthese verantwortlichen Enzyme befinden sich auf dem Genabschnitt *pyITSBCD*, welches zwei weitere Transkripte kodiert.^[12]



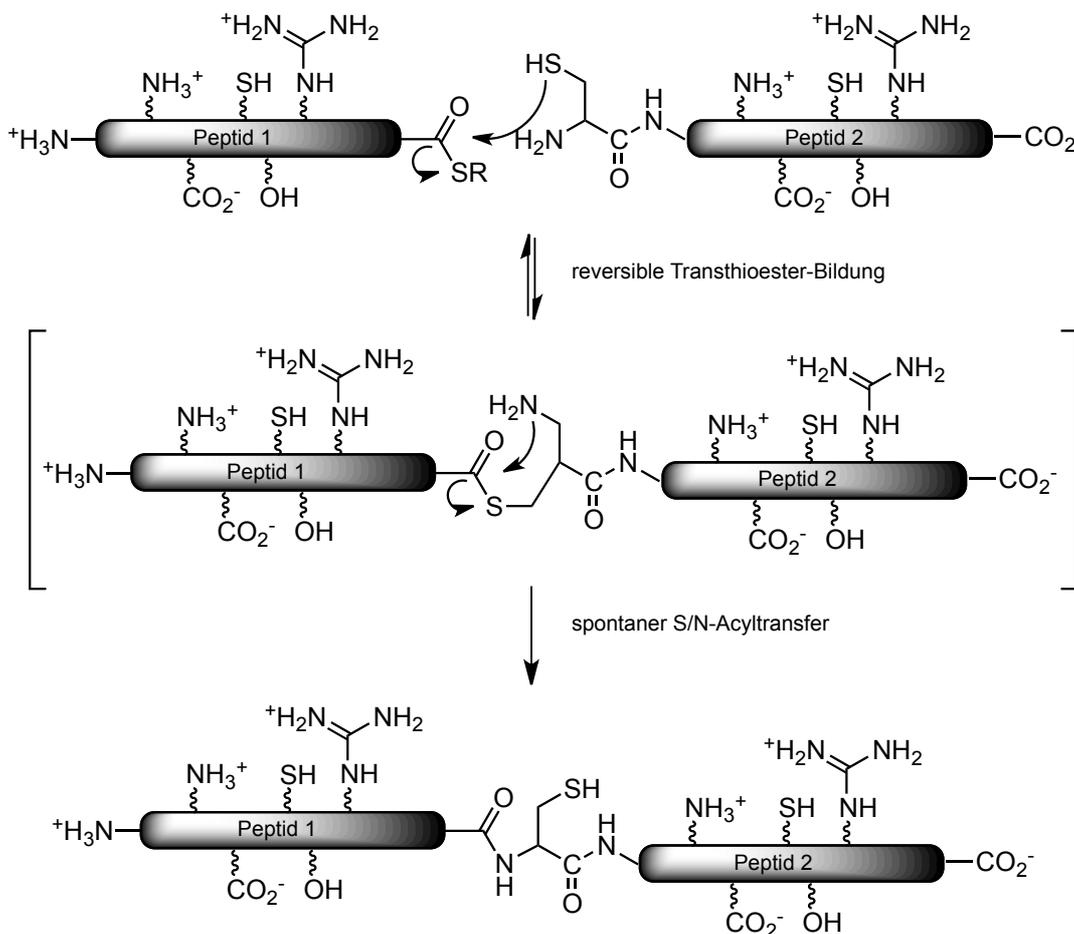
Schema 3.2: Biosynthese von Pyrrolysin durch die Enzyme PylB, PylC und PylD.

Es handelt sich dabei um ein orthogonales pyrrolysyl-tRNA_{CUA}/pyrrolysyl-tRNA Synthetase (PylT/PylRS) Paar,^[9] welches für die Einbringung dieser besonderen Aminosäure in die ribosomale Translation verantwortlich ist. PylRS erkennt dabei spezifisch die Aminosäure Pyrrolysin und aktiviert diese, wie alle natürlichen tRNA Synthetasen,^[92] durch Adenylierung mit Hilfe von ATP. In einem zweiten Schritt überträgt sie das aktivierte Pyrrolysyl-Adenylat auf das 3'-CCA Ende von PylT. Diese wiederum ist mit ihrem Anticodon in der Lage, an interne *Amber*-Codons in der mRNA zu binden und die Termination der Translation zu supprimieren.

3.2 EINBAU UNNATÜRLICHER AMINOSÄUREN IN PROTEINE

Posttranslationale Modifizierung (PTM) von Proteinen spielen in biologischen Prozessen eine wichtige Rolle.^[93-95] Hierzu werden definierte Aminosäuren im bereits synthetisierten Protein kovalent modifiziert, was zur Generierung einer gewünschten Funktion des Makromoleküls führt. So führt etwa die Phosphorylierung von Proteinen an freien Hydroxy-Gruppen an den Aminosäuren Serin, Threonin und Tyrosin zu Konformationsänderungen.^[96-99] Diese Konformationsänderung wird oft in molekularen Signalkaskaden verwendet, um eine Feinregulierung der Aktivität beteiligter Proteine zu realisieren. Die mehrfache Ubiquitinierung eines Proteins an Lysinen hingegen markiert das Protein als „Abfall“ und katalysiert den Transport zum Proteasom.^[100-102] Eine weitere, essentielle PTM in höheren Organismen ist die kovalente Anlagerungen von zum Teil komplexen Zuckerstrukturen an Asparagin-, Serin- oder Threonin-Resten. Diese sogenannte Glykosylierung ist ein wichtiger Bestandteil in Strukturproteinen, verleiht membrangebundenen Signalproteinen ihre Rezeptoreigenschaft, erhöht die Diversität und Interaktion von Antikörpern und ist essentiell für die Aktivität einiger Hormone.^[103-107] Die Natur kennt eine Vielzahl weiterer PTMs, mit der sie durch Modifizierung einzelner Aminosäuren neue Proteinfunktionen erschafft. Das Forschungsgebiet des *Protein Engineerings* beschäftigt sich unter anderem mit der Nachahmung dieser natürlichen Möglichkeiten, um ebenfalls durch gezielte Modifizierung einzelner Proteinreste gänzlich neue Proteineigenschaften zu generieren.^[1, 108-117] Rein chemische Ansätze, wie Reaktionen an natürlichen Aminosäure-Resten, sind jedoch auf wenige reaktive Reste limitiert und häufig nicht sehr effizient. Letzteres führt häufig auch zu inhomogenen Produkten. Zu diesen Seitenketten spezifischen Reaktionen gehört zum Beispiel die Reaktion von primären Aminen (Lysine) mit N-Hydroxysuccimidestern oder Isothiocyanat-Derivaten^[118-119] oder die Maleimidkupplung freier Cystein-Reste.^[120] Des Weiteren wurden Carboxygruppen (Glutamat, Aspartat und der C-Terminus) mit Carbodiimiden funktionalisiert.^[121-122] Um die Limitierung dieser Methode zu umgehen, wird der Einbau unnatürlicher Aminosäuren (UAAs) in Proteine angestrebt. Dieser hat sich in den letzten Jahren zu einem spannenden und vielversprechenden Forschungsgebiet entwickelt. Ziel der Bemühungen ist es, neue und einzigartige funktionelle Gruppen in Proteine einzuführen, um diese selektiv und effizient in bioorthogonalen Reaktionen zu

adressieren. Zunächst wurde versucht, unnatürlichen Aminosäuren durch rein chemische Ansätze in das Makromolekül einzubringen. Hierzu wurde die klassische Festphasen-Synthese von Peptiden eingesetzt^[123-126] - eine Methode, die schnell an ihre Grenzen stößt. Während Proteine zum Teil aus sehr vielen Aminosäuren aufgebaut sind und daher eine beträchtliche Größe erreichen können, ist die Festphasensynthese limitiert auf Polypeptide mit weniger als 100 Aminosäuren. Der Aufwand ist dabei trotz automatisierter Geräte beträchtlich, verbraucht viel Material und bedarf aufgrund von Nebenprodukten anschließend der chromatographischen Reinigung des gewünschten Peptids. Es wurde versucht, die Limitierung in der Größe des synthetischen Peptids, welches die unnatürliche Aminosäure enthält, durch semisynthetische Ansätze zu beheben. Hierzu wurde das Produkt der Peptid-Festphasensynthese gereinigt und über *native* oder *expressed chemical ligation* mit ribosomal hergestellten Protein-Einheiten oder ebenfalls synthetischen Peptiden zu dem gewünschten Protein verknüpft (**Schema 3.3**).^[127-131] Diese semisynthetischen Methoden haben sich als sehr effiziente Strategien bewährt.^[132-138]



Schema 3.3: Reaktionsablauf der *native chemical ligation*.

Eines der wichtigen Ziele dieser Methodenentwicklung ist es jedoch, Proteine mit geringem Aufwand auf biochemischen Wege mit unnatürlichen Aminosäure-Resten herzustellen. Daher konzentrierten sich immer mehr Forschungsgruppen darauf, durch Manipulation des Translationsapparates eine Modifikation in das Protein einzubringen. Hierzu müssen Wege gefunden werden, tRNAs mit der unnatürlichen Aminosäure zu beladen und dem Ribosom als Substrat zur Verfügung zu stellen. *Hecht* und *Chamberlin* gelang dies in *in vitro* Translationssystemen, indem eine tRNA chemisch aminoacyliert wurde.^[139-140] Die Gruppe von *Barciszewski* erreichte die Aminoacylierung unter Hochdruck-Bedingungen,^[141] während *Suga* spezielle *cis*- und *trans*-Ribozyme entwickelte, welche die tRNA katalytisch bzw. autokatalytisch beladen.^[142] Ein kritischer Punkt hierbei stellt die Wahl der tRNA und insbesondere des Anticodons dar. Hierzu wurden entweder bestehende *sense*-Codons unter Ausschluss der dazugehörigen Aminoacyl-tRNA im Translationssystem verwendet oder *nonsense*-Codons unter Konkurrenz mit *release* Faktoren eingesetzt.^[143-147] Eine elegante Alternative stellten die Gruppen von *Hohsaka* und *Sisido* vor,^[148-150] indem sie durch Neugestaltung der Anticodon Region der tRNA vier- und fünf-Basen Anticodons generierten (**Abbildung 3.4**). Diese können an ein speziell dafür vorgesehenes vier- bzw. fünf-Basen Codon in der mRNA binden und durch sogenannten *frameshift* die unnatürliche Aminosäure ohne Konkurrenz mit natürlichen Aminosäuren oder *release* Faktoren in die wachsende Polypeptid-Kette einführen.

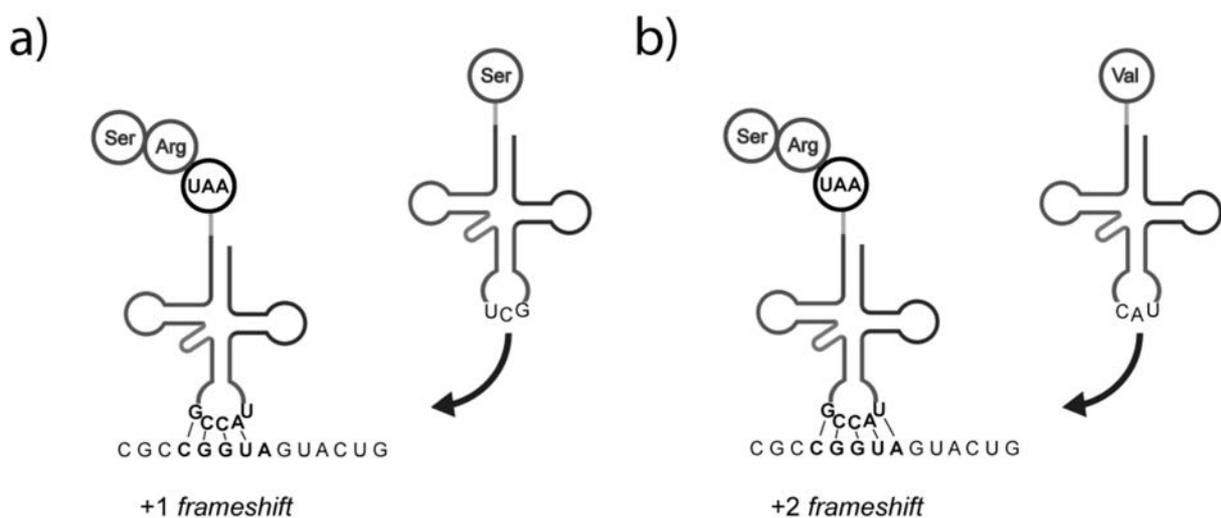


Abbildung 3.4: Kodierung unnatürlicher Aminosäuren durch a) vier- und b) fünf-Basen Codons.

Unter den zur Verfügung stehenden Methoden zum Einbau unnatürlicher Aminosäuren in Proteine ist ohne Zweifel der Durchbruch mit dem *in vivo* Einbau genetisch codierter UAAs gelungen. Hierzu wurden orthogonale tRNA/Aminoacyl-tRNA Synthetase (tRNA/AaRS) Paare speziell für die unnatürliche Aminosäure der Wahl zum Teil evolviert, die auf molekularbiologischem Wege in den Zielorganismus eingebracht wurden.^[1, 114] Die manipulierte Zelle ist so in der Lage, die neue tRNA und AaRS selbst herzustellen und selektiv die exogen angebotene Aminosäure in die Translation einzubringen. Besonders häufig wird dabei die *Amber*-Suppressionsmethode verwendet.^[151-153] Das Zielprotein wird dafür ebenfalls mittels molekularbiologischer Methoden in den Organismus eingeführt, wobei das entsprechende Gen an der gewünschten Position ein *Amber*-Codon besitzt. Auf diese Weise produziert die Zelle sowohl die AaRS, die korrespondierende tRNA_{CUA} als auch ein mRNA-Transkript mit internem *Amber*-Codon, welches in Anwesenheit der unnatürlichen Aminosäure in das modifizierte Protein translatiert wird (**Abbildung 3.5**). Diese Aminosäure konkurriert dabei für gewöhnlich mit RF1, so dass bei nicht ausreichenden Mengen beladener tRNA_{CUA} die Translations-Termination an der *Amber*-Position stattfindet.^[154-156] Diese Technologie geht daher häufig mit sehr hohem Verbrauch der unnatürlichen Aminosäure einher, da diese für eine effiziente Translations-Termination der Zelle in hohen Konzentrationen zur Verfügung gestellt werden muss.

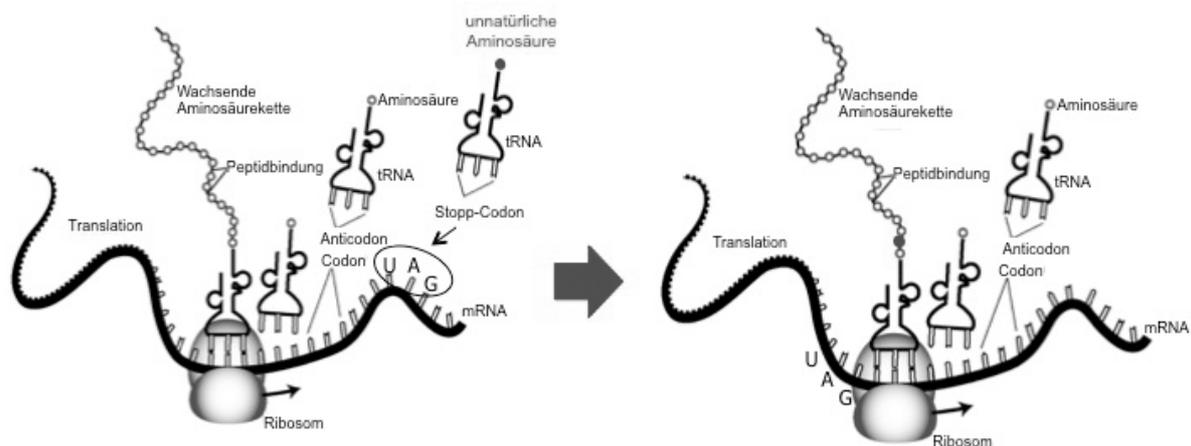


Abbildung 3.5: Einbau unnatürlicher Aminosäuren durch die *Amber*-Suppressionstechnologie.

Auf diese Weise ist es der Gruppe von *Peter G. Schultz* gelungen, mittels speziell evolvierter, orthogonaler Tyr-tRNA_{CUA}/Tyrosyl-tRNA Synthetase Paare eine Vielzahl unnatürlicher, meist aromatischer Aminosäuren in das Repertoire von *E. coli* und einiger eukaryotischer Zellen aufzunehmen.^[1, 114, 157] Diese Aminosäuren wurden anschließend in bioorthogonalen Reaktionen am Protein eingesetzt. Alternativ wenden *Yokoyama*^[6, 151] und *Chin*^[158-161] die *Amber*-Suppression unter Verwendung der Pyl-tRNA_{CUA}/Pyrrolysyl-tRNA Synthetase aus *Methanosarcina Mazei* in bakteriellen und eukaryotischen Zellkulturen an. PylRS akzeptiert keine endogenen Aminosäuren und ist zudem aufgrund eines flexiblen aktiven Zentrums in der Lage, eine Vielzahl von Pyrrolysin-Analoga zu erkennen.^[3, 5, 159] Da zudem Kristallstrukturen des aktiven Zentrums zur Verfügung stehen, könnte durch gerichtete Evolution der PylRS ihr Substratspektrum weiter ausgedehnt werden.^[6, 162]

3.3 BIOORTHOSONALE MODIFIKATION VON PROTEINEN

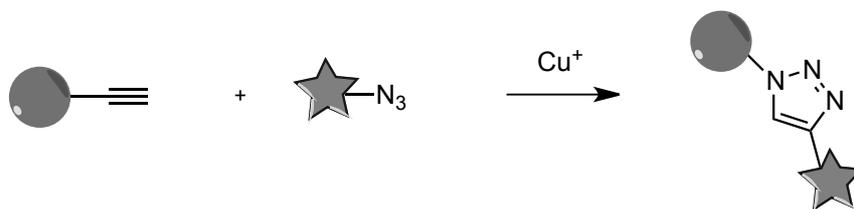
Es sind zwei Schritte notwendig, um die Anwendung bioorthogonaler Reaktionen an Proteinen durchführen zu können. Zum Einen bedarf es des Einbaus unnatürlicher Aminosäuren mit Hilfe synthetischer (Peptidsynthese), semisynthetischer (*native* bzw. *expressed chemical ligation*) oder biosynthetischer (*Amber*-Suppression) Methoden (siehe *Abschnitt 3.2*).

Diese neuartige Aminosäure muss sich in ihrer Reaktivität grundlegend von denen der natürlichen Aminosäuren unterscheiden, um so als Partner für eine bioorthogonale Modifizierung zur Verfügung zu stehen. Ziel ist es, durch Einbau neuer funktioneller Gruppen und bioorthogonaler Reaktionen eine Vielzahl biochemischer und zellulärer Fragestellungen über Struktur, Funktion und Dynamik von Proteinen zu untersuchen. So könnten Proteine mit Fluorophoren, Zuckerstrukturen, PEG-Ketten und vielen weiteren Liganden modifiziert werden.^[145, 163-166] Bei der Methodenentwicklung und der Strategie für die bioorthogonale Addressierung von UAAs in Proteinen muss jedoch eine Vielzahl an Kriterien beachtet werden, um erfolgreiche Studien durchführen zu können.^[113] Die Reaktion muss unter physiologischen Bedingungen bei neutralem pH, niedrigen Temperaturen und in wässriger Umgebung stattfinden können. Zudem muss die Reaktion effizient und schnell ablaufen und gegebenenfalls mit niedrigen Proteinkonzentrationen

(insbesondere in *in vivo* Reaktionen) erfolgen. Des Weiteren müssen Nebenreaktionen vermieden werden, sei es mit dem chemischen Liganden oder eventuellen Nebenprodukten. Trotz dieser Vorgaben stehen eine Vielzahl milder Reaktionen zur Verfügung, die bei Anwesenheit der entsprechenden funktionellen Gruppen im Protein deren bioorthogonale Modifizierung erlauben würden.

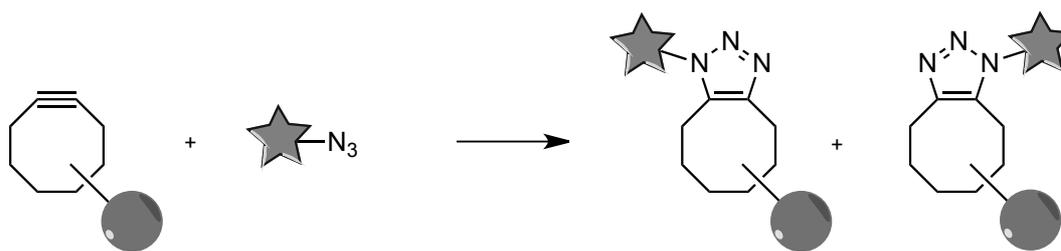
3.3.1 1,3-DIPOLARE CYCLOADDITIONEN

Die 1,3-dipolare Cycloaddition zwischen einem Azid und einem Alkin, bei der ein Tetrazol entsteht, wurde als erstes von *Huisgen* beschrieben. *Sharpless* und *Meldal* gelang es,^[167-168] diese Reaktion durch katalytische Mengen von Kupfer(I) sehr schnell durchzuführen (**Schema 3.4**). Aufgrund dieser schnellen Reaktionskinetik, der Durchführbarkeit in Wasser und der Vielzahl an möglichen Derivaten wurde diese Cu(I) katalysierte Click-Reaktion ausgiebig zur Modifizierung von Biomolekülen eingesetzt.^[169-174]



Schema 3.4: Kupfer(I) katalysierte 1,3-dipolare Cycloaddition.

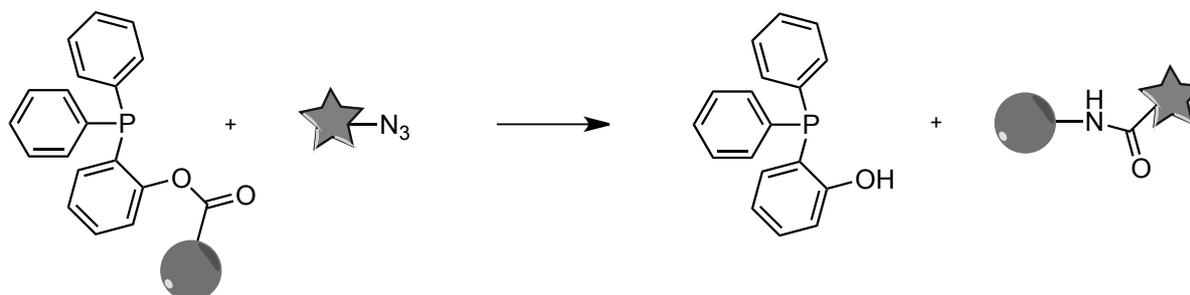
Die Verwendung von Cu(I) schränkt diese Methode ein. Cu(I) ist vermutlich durch dessen Einfluss auf die Zellteilung und den Metabolismus,^[175-176] sowie aufgrund der Komplex-Bildung mit Proteinstrukturen toxisch, was die Anwendung der Cu(I) katalysierten Alkin-Azid Click-Reaktion (CuAAC) in Zellen und an Proteinstrukturen einschränkt. Um diese Nachteile zu umgehen, wurden verschiedene kupferfreie Varianten dieser Click-Reaktion entwickelt. So konnten *Bertozzi* und Mitarbeiter zeigen, dass die Ringspannung in Cyclooctinen ausreicht, um die Reaktivität der Dreifachbindung auch ohne Metallkatalyse zu erhöhen (**Schema 3.5**).^[177-178] Ihnen gelang es, diese Reaktion trotz sehr langsamer Kinetik zur Modifizierung von Glykoproteinen sowohl *in vivo* als auch *in vitro* anzuwenden.^[179]



Schema 3.5: Kupfer-freie 1,3-dipolare Click-Reaktion am Cycloooktin.

3.3.2 STAUDINGER REAKTION UND STAUDINGER LIGATION

Eine weitere, sehr milde Funktionalisierung stellt die Staudinger Reaktion dar. Hierbei wird ein primäres Amin aus der Reaktion zwischen einem Azid und einem Phosphin generiert. Das Phosphoratom greift dabei den endständigen Stickstoff des Azids an, welches zur Bildung eines terminalen Phosphoazids führt. Dieses zerfällt in wässriger Lösung unter N_2 -Abspaltung zum Azaylid und hydrolysiert anschließend zum Amin-Endprodukt.^[180] In einer Abwandlung dieser Reaktion, der sogenannten Staudinger Ligation, verwendeten *Bertozzi et al.* Phosphin-Derivate mit benachbarten elektrophilen Carbonylgruppen (**Schema 3.6**).^[181] Diese stabilisieren das Ylid-Intermediat, welches nach Hydrolyse zu einem stabilen Amid reagiert, wodurch zwei Moleküle „ligiert“ werden können.



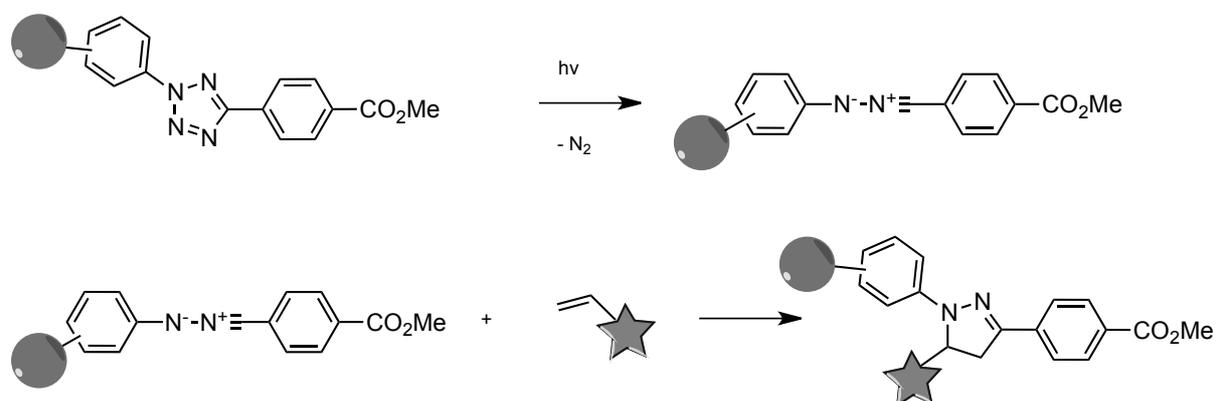
Schema 3.6: Staudinger Ligation.

Hierdurch wurde unter anderem gezeigt, dass durch Verwendung von entsprechender Phosphin-Derivate die Markierung Azid-funktionalisierter

Zelloberflächen mit Biotin möglich ist.^[181] Die Staudinger Ligation wird seither in einer Vielzahl von Anwendungen als bioorthogonale Reaktion verwendet.^[182-186]

3.3.3 PHOTOINDUZIERTER 1,3-DIPOLARE CYCLOADDITION

Lin und Mitarbeiter orientierten sich bei der Entwicklung bioorthogonaler Click-Reaktionen an der von *Huisgen* beschriebenen photoinduzierten 1,3-dipolaren Cycloaddition zwischen einem Diaryltetrazol und einem Alken-Dipolarophil. Hierbei erfolgt unter UV-Bestrahlung die Cycloreversion des Tetrazolderivats unter N_2 -Abspaltung. Der dadurch generierte 1,3-Nitrilimin-Dipol zyklisiert anschließend spontan mit der dipolarophilen Doppelbindung zum Pyrazolin (**Schema 3.7**).



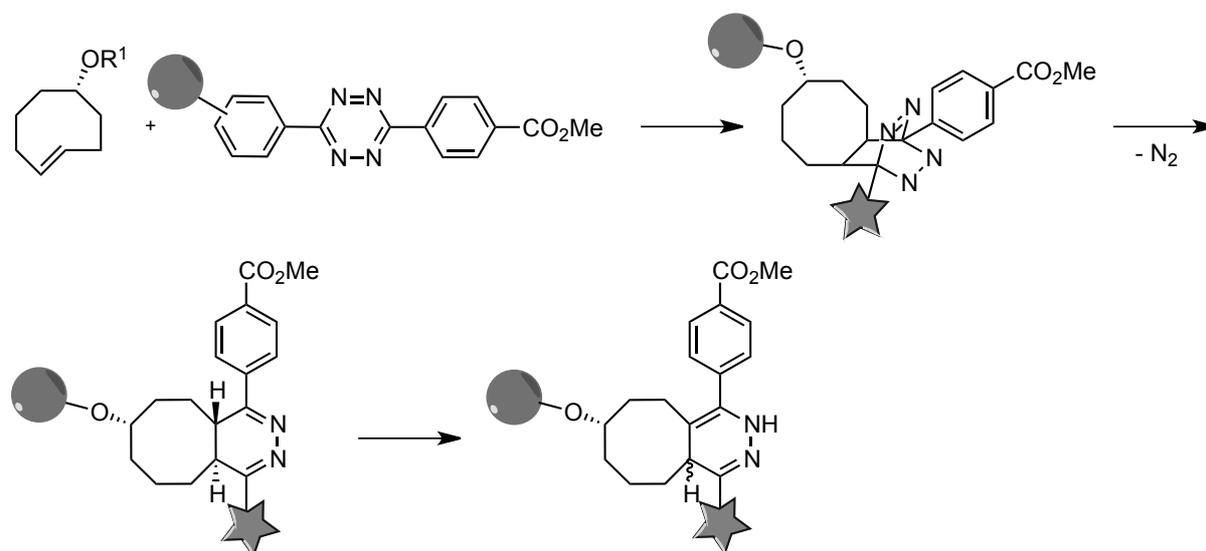
Schema 3.7: Photoinduzierte 1,3-dipolare Cycloaddition. Durch UV-Belichtung wird aus dem Diaryltetrazol unter Stickstoff-Abspaltung ein Nitrilimin generiert, welches eine reaktive Doppelbindung angreifen kann.

Es gelang den Forschern, diese Reaktion bei moderater UV-Bestrahlung mit hohen Ausbeuten durchzuführen.^[187] Unter anderem gelang ihnen die *in vivo* Markierung Alken-modifizierter Proteine in *E. coli*, welche sie aufgrund der Fluoreszenzeigenschaften des Pyrazolin-Rings detektieren konnten.^[188]

3.3.4 DIELS-ALDER REAKTION

Die Diels-Alder Reaktion ist ein klassisches Beispiel für die Verknüpfung zweier Moleküle in wässriger Umgebung unter sehr milden Bedingungen. Es verwundert daher kaum, dass diese Reaktion sehr früh Anwendung in der bioorthogonalen

Modifizierung von Biomolekülen fand. Unter anderem konnten Fox und Mitarbeiter in einer sehr schnell ablaufenden inversen hetero-Diels-Alder Reaktion zwischen Tetrazin (Dien) und *trans*-Cycloocten (Dienophil) die Zyklisierung zum Dihydropyrazin nachweisen (**Schema 3.8**).



Schema 3.8: Diels-Alder Reaktion. Im dargestellten Reaktionsschema reagiert *trans*-Cycloocten mit einem Tetrazin unter Stickstoffabspaltung und Isomerisierung zum Dihydropyrazin.

Diese Reaktion verwendeten sie, um ein *trans*-Cycloocten-modifiziertes Thioredoxin zu funktionalisieren.^[189] Hildebrand und Mitarbeiter hingegen konjugierten Antikörper mit Norbornen-Resten, welche sowohl biochemisch als auch zellulär in einer inversen hetero-Diels-Alder Reaktion mit einem Tetrazin-Derivat bioorthogonal modifiziert werden konnte.^[190]

3.4 AUFGABENSTELLUNG

Im Rahmen dieser Arbeit sollte der *in vivo*-Einbau unnatürlicher Aminosäuren in Proteine ermöglicht werden. Diese Aminosäuren sollten dabei synthetisch hergestellt werden und sich in ihrer Reaktivität grundlegend von denen natürlicher Aminosäuren unterscheiden, um bioorthogonale Modifikationen am Protein zu erlauben. Hierzu sollte das Pyrrolysin-System aus *Methanosarcina mazei*, bestehend aus dem orthogonalen pyl-tRNA_{CUA}/pyl-tRNA Synthetase Paar (PylT/PylRS), sowie einem

Zielprotein mit internem *Amber*-Codon molekularbiologisch in *E. coli* eingebracht werden. Die gentechnisch veränderten Zellen würden die angebotenen UAAs auf PylT beladen und diese der ribosomalen Proteinsynthese zugänglich machen. Hierdurch könnte durch *Amber*-Suppression die Aminosäure am internen Stopp-Codon im Zielprotein eingebaut werden. Dieses Ziel sollte auf zwei unterschiedlichen Wegen erreicht werden: zum Einen sollte der Wildtyp-PylRS eine Bibliothek aus Pyrrolysin-Analoga angeboten und auf deren Einbau hin untersucht werden. Zum Anderen sollte durch gerichtete Evolution eine Bibliothek an PylRS-Varianten erzeugt werden, um auf diese Weise eine Mutante zu erhalten, die eine ausgesuchte unnatürliche Aminosäure akzeptiert und in das Zielprotein einbaut.

Nach erfolgreichem Einbau der reaktiven UAA in ein Protein der Wahl sollte diese bioorthogonal modifiziert werden. Die Reaktionen am Protein sollten dabei spezifisch und unter physiologischen Bedingungen ablaufen. Hierdurch würde die ortsspezifische Modifizierung des Proteins mit unterschiedlichen Liganden gewährleistet werden. Das Protein sollte im nativen Zustand vorliegen. Auf diese Weise könnten zum Beispiel Fluorophore für FRET-Messungen eingeführt, Alternativen zur Glykoprotein-Synthese durch Einbau von Zuckermodifikationen etabliert oder neue Methoden zur PEGylierung von Proteinen erhalten werden.

3.5 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

3.5.1 KLONIERUNG DER CO-EXPRESSIONSPLASMIDE

3.5.1.1 pTRP-Duet1: Mm pylST und pTRP-Duet1: Mm pylS3T

Die *Methanosarcina mazei pylT* wurde aus zwei synthetischen DNA-Einzelsträngen (*Metabion*) hergestellt. Hierzu wurden die beiden komplementären DNA-Einzelstränge *fw-pylT*: 5'-GGC CGC GGA AAC CTG ATC ATG TAG ATC GAA TGG ACT CTA AAT CCG TTC AGC CGG GTT AGA TTC CCG GGG TTT CCG CCA C-3' und *rv-pylT*: 5'-TTA AGT GGC GGA AAC CCC GGG AAT CTA ACC CGG CTG AAC GGA TTT AGA GTC CAT TCG ATC TAC ATG ATC AGG TTT CCG C-3' (*pylT*-Abschnitt ist unterstrichen) in einer Konzentration von 50 µM zusammengegeben und hybridisiert. Der resultierende Doppelstrang wurde über die Schnittstellen NotI und

AfIII in die erste *multiple cloning site* des Vektors pET-Duet1 (Novagen) ligiert. Für die Kodierung von drei *pylT*-Kopien (*pyl3T*) wurde ein synthetisches Konstrukt (*Metabion*) mit der Sequenz 5'-GGC CGC GGA AAC CTG ATC ATG TAG ATC GAA TGG ACT CTA AAT CCG TTC AGC CGG GTT AGA TTC CCG GGG TTT CCG CCA TAC ATG TTA TGG AAA CCT GAT CAT GTA GAT CGA ATG GAC TCT AAA TCC GTT CAG CCG GGT TAG ATT CCC GGG GTT TCC GCC ATA CAT GTT ATG GAA ACC TGA TCA TGT AGA TCG AAT GGA CTC TAA ATC CGT TCA GCC GGG TTA GAT TCC CGG GGT TTC CGC CAC-3' (*pylT*-Abschnitte sind unterstrichen) ebenfalls aus zwei DNA-Einzelsträngen generiert und in den Vektor pET-Duet1 über die Schnittstellen NotI und AfIII inseriert.

In einer PCR-Reaktion wurde das Gen *pylS* aus genomischer DNA von *M. mazei* (DSM 3647) mit den Primern *fw-pylS*: 5'-GGA TCC CAT GGA TAA AAA ACC ACT AAA CAC TC-3' und *rv-pylS*: 5'-GCG GCC GCT TAC AGG TTG GTA GAA ATC CCG-3' amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde zunächst in den pCR[®]4Blunt TOPO[®] Vektor (Invitrogen) ligiert und sequenziert. Anschließend wurde das Gen über die Schnittstellen BamHI und NotI in die erste *multiple cloning site* des Vektors pET-Duet1:Mm *pylT* (bzw. *pyl3T*) eingebracht. Der hieraus resultierende Vektor pET-Duet1:Mm *pylST* (bzw. *pylS3T*) ermöglichte die Expression einer N-terminal His₆-fusionierten pyrrolysyl-tRNA Synthetase und der korrespondierenden pyrrolysyl-tRNA unter der Kontrolle des ersten T7-Promoters. Für die konstitutive Expression von *PyIS* und *PyIT* wurde dieser T7-Promoter durch einen Tryptophan-Promoter aus *E. coli* (GenBank: K01792.1) ersetzt. Hierzu wurde der ursprüngliche T7 Promoter-1 mit den Restriktionsenzymen ClaI und XbaI herausgeschnitten und durch die synthetische *E. coli* pTRP-Region 5'- ATC GAT CTT ACT CCC CAT CCC CCT GTT GAC AAT TAA TCA TCG AAC TAG TTA ACT AGTA CGC AGG GGC ATC TAG A-3' (*Metabion*) ersetzt.

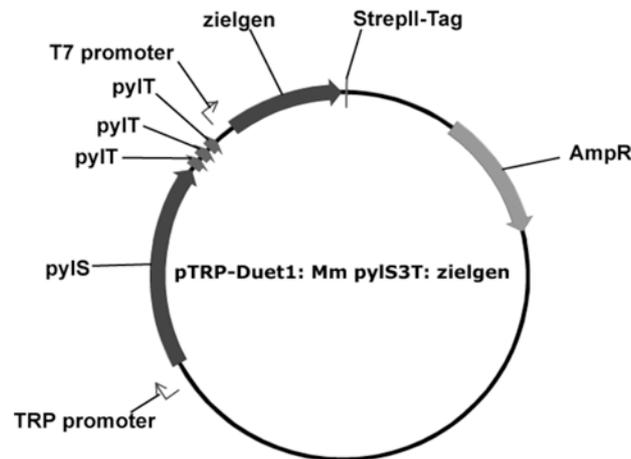


Abbildung 3.6: Vektor-Karte von pTRP-Duet1: Mm pylS3T: zielgen.

Der resultierende Vektor wurde pTRP-Duet1:Mm pylST (bzw. pylS3T) genannt. Dieser besaß eine noch ungenutzte zweite *multiple cloning site*, welche die Expression eines weiteren Proteins unter der Regulation eines T7 Promoters ermöglichte (siehe **Abbildung 3.6**). Diese Eigenschaft wurde genutzt, um das mit einer unnatürlichen Aminosäure zu modifizierende Zielprotein herzustellen. Die Gene, welche an einer ausgesuchten Position ein *Amber*-Stoppcodon (TAG) besaßen, wurden standardmäßig via pCR4[®]-Blunt TOPO[®]-Klonierung und über die Restriktionsschnittstellen NdeI und KpnI inseriert. Zuvor wurde bei der PCR-Amplifizierung des Zielgens durch Wahl entsprechender *rv*-Primer die Sequenz zur Kodierung eines StreptII-Tags eingebracht. Die resultierenden Genprodukte sollten daher bei Anwesenheit der unnatürlichen Aminosäure während der Expression die entsprechende Aminosäure an der gewünschten Position enthalten und über einen C-terminalen StreptII-Tag verfügen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde dieses Expressionssystem für mehrere Zielproteine angewendet.

3.5.1.2 pTRP-Duet1: Mm pylST: mutⁿ-yfp und pTRP-Duet1: Mm pylS3T: mutⁿ-yfp

Die Wahl von mut-YFP als Zielprotein für den Einbau unnatürlicher Aminosäuren diente anfänglich dem einfachen *Screening* nach geeigneten Aminosäuren für die wt-PylRS. Dieses *Screening* erfolgte durch Detektion der YFP-Fluoreszenz, welche bei erfolgreichem Einbau der Aminosäure und somit Expression von Vollängen-YFP produziert wurde. Später in dieser Arbeit wurde mut-YFP auch genutzt, um die pyrrolysyl-tRNA Synthetase für den verbesserten Einbau von Hydroxylamin- und

Norbornen-Aminosäuren zu evolvieren. Das nicht mutierte *eyfp* (*Clontech*) Gen im Expressionsvektor pDEST007 wurde von *Dr. Markus Müller* zur Verfügung gestellt. Der Vektor wurde sowohl zur Expression von nicht modifiziertem eYFP mit N-terminalem Strep-TagII als auch zur ortsgerichteten Mutagenese zur *Amber-Suppression* verwendet.

Für die Generierung der YFP-Mutanten wurde das Gen *eyfp* aus dem Expressionsvektor pDEST-007:eyfp mit den Primern *fw-eyfp*: 5'-CAT ATG ATG GTG AGC AAG GGC G-3' und *rv-eyfp*: 5'-GGT ACC TTA TCC GGA TTT TTC GAA TTG AGG ATG ACT CCA TGC GCT AGC CAT CTT AAG GAT AGA TCT CTT GTA CAG-3' amplifiziert. Hierbei kodiert der Primer *rv-eyfp* zusätzlich für den StrepII-Tag, welcher beim Genprodukt zu einem C-terminalen StrepII-Tag führte. Nach TOPO[®]-Klonierung in den Vektor pCR4[®]-Blunt und Sequenzierung diente dieses Konstrukt als Templat für die ortsgerichtete Mutagenese zu *mut¹-*, *mut²-*, *mut³-* und *mut⁴-yfp* mit Hilfe des QuikChange[®] Site-Directed Mutagenesis Kits (*Stratagene*). Folgende Primer und Template wurden hierbei eingesetzt:

Tabelle 3.1: Übersicht der *mismatch*-Primer zur Generierung der *Amber*-Codons in *mut¹*, *mut²*, *mut³* und *mut⁴-yfp*.

Mutante	Position	<i>fw</i> - und <i>rv</i> -Primer	pCR4 [®] -Blunt-Templat
<i>mut¹yfp</i>	K114	5'-GCG CCG AGG TGT <u>AGT</u> TCG AGG GCG ACA CCC-3' 5'-GGG TGT CGC CCT CGA <u>ACT</u> <u>ACA</u> CCT CGG CGC-3'	<i>eyfp</i>
<i>mut²-yfp</i>	K27 K114	5'-CGT AAA CGG CCA CTA <u>GTT</u> CAG CGT GTC CG-3' 5'-CGG ACA CGC TGA <u>ACT</u> <u>AGT</u> GGC CGT CTA CG-3'	<i>mut¹yfp</i>
<i>mut⁴-yfp</i>	K27 K114 L132 L138	5'-GCA TCG ACT TCT <u>AGG</u> AGG ACG GCA ACA TCT <u>AGG</u> GGC ACA AGC TGG-3' 5'-CCA GCT TGT GCC <u>CCT</u> AGA TGT TGC CGT CCT <u>CCT</u> <u>AGA</u> AGT CGA TGC-3'	<i>mut²yfp</i>

Bei der Mutation zur Generierung von *mut⁴-yfp* mittels der eingesetzten Primer wurde durch Sequenzierung der Mutageneseprodukte neben der gewünschten vierfach Mutante auch eine dreifach Mutante nachgewiesen, die im weiteren Verlauf dieser Arbeit ebenfalls verwendet wurde (*mut³-yfp* bzw. 3 mut-YFP mit UAAs an den Positionen 27, 114 und 133).

Die hieraus resultierenden mutierten Gene wurden jeweils in die zweite *multiple cloning site* des Vektors pTRP-Duet1:Mm pylST (bzw. pylS3T) über die Schnittstellen NdeI und KpnI eingebracht, so dass deren Transkription vom T7-Promoter kontrolliert wurde.

Der Vektor pTRP-Duet1:Mm pylST:mut¹yfp wurde sowohl zur Expression der Alloc- und Alkin-modifizierten Varianten von YFP-Lys114Amber als auch zur iterativen Saturierungsmutagenese (ISM) der PylRS verwendet. Hierzu wurde das Plasmid in BL21(DE3)-*E. coli* Zellen (*In vitro*) transformiert.

3.5.1.3 pTRP-Duet1: Mm pylS3T: mut-polη

Der Vektor pExp007-polη^[191] wurde als Templat zur PCR-Amplifizierung der Aminosäuren 1-578 der *S. cerevisiae* Polymerase η verwendet. Hierzu kamen die PCR-Primer *fw-polη* 5'-CAT ATG TCA AAA TTT ACT TGG AAG G-3' und *rv-polη* 5'-GGT ACC TTA TTT TTC GAA TTG AGG ATG ACT CCA TTG TAA ATC TAT AAT ATC GAA ATT AG-3' zum Einsatz, wobei *rv-polη* zudem einen C-terminalen StrepII-tag generierte. Nach TOPO[®]-Klonierung in den Vektor pCR4[®]-Blunt und Sequenzierung diente dieses Plasmid als Templat für die QuikChange[®] ortsgerechte Mutagenese mit den Primern *fw-q144amber-polη* 5'-GGA AGC ACT AAA AAA ATG TAG TTA GCT CAT ACC GAT CCA TAC AGC C-3' und *rv-q144amber-polη* 5'-GGC TGT ATG GAT CGG TAT GAG CTA ACT ACA TTT TTT TAG TGC TTC C-3'. Nach Verifizierung des gewünschten Gens durch Sequenzierung wurde dieses über die Schnittstellen NdeI und KpnI in den Vektor pTRP-Duet1: Mm pylS3T inseriert.

3.5.1.4 pTRP-Duet1: Mm pylS3T: mut-I19_f(ab)

Der Genabschnitt des *humanen* L19 F(ab)-Fragmentes mit zwei *Amber*-Codons und C-terminalem His₆- und c-Myc-Tag wurde von *Genart* bezogen. Die Aminosäuresequenz ist im Anhang dargestellt. Zusammenfassend besteht dieser Proteinkomplex aus einer leichten Kette mit einer sekretorischen OmpA-Sequenz am N-Terminus und einer Val111*Amber* Substitution. Die schwere Kette besitzt eine sekretorische PhoA-Sequenz am N-Terminus, eine Ala114*Amber* Substitution sowie C-terminale Affinitätstags (His₆- und c-Myc-Tag). Die kodierenden Genabschnitte wurden - durch eine ribosomale Bindestelle getrennt - über die Schnittstellen NdeI

und KpnI hinter den T7-Promoter 2 in den Vektor pTRP-Duet1: Mm pylS3T eingebracht. Die beiden sekretorischen Sequenzen OmpA und PhoA wurden verwendet, um die Proteinketten unmittelbar nach ihrer *in vivo* Translation in *E. coli* in die oxidierende Umgebung des Periplasmas zu transportieren. Nur hier konnte sich aus den einzelnen Ketten unter Disulfidbrückenbildung das funktionsfähige Heterodimer bilden.

3.5.1.5 pACYC-pGLN:norS3T

Das aus der ISM erhaltene Plasmid pTRP-Duet1:norS3T:mut¹yfp (siehe *Abschnitt 3.5.9*), welches das Gen für die optimierte NorRS kodierte, wurde mit den Restriktionsenzymen ApaI und NotI verdaut, um das für die NorRS kodierende Gen herauszuschneiden. Das ca. 2.2 kb große DNA-Fragment wurde in die erste *multiple cloning site* des mit den gleichen Restriktionsenzymen verdauten Vektors pACYC-Duet1 (*Novagen*) ligiert. Anschließend wurde der T7-Promoter 1 dieses Vektors mit folgender Promoter-Region und *Shine Dalgarno* Sequenz (*GeneArt*, Regensburg) über die Restriktionsschnittstellen ClaI und NcoI ersetzt: 5'-TCA TCA ATC ATC CCC ATA ATC CTT GTT AGA TTA TCA ATT TTA AAA AAC TAA CAG TTG TCA GCC TGT CCC GCT TAT AAT ATC ATA CGC CGT TAT ACG TTG TTT ACG CTT TGA GGA AGC C-3'. Bei diesem Promoter handelte es sich um pGLN, welcher in *E. coli* die Expression der GlnRS konstitutiv reguliert. Der hieraus resultierende Vektor pACYC-pGln:norS wurde anschließend mit den Enzymen NotI und PacI verdaut, um die zweite *multiple cloning site* inklusive des T7-Promoter 2 durch ein synthetisches PylT-Operon (*GeneArt*) zu ersetzen. Dieses Operon bestand aus drei Kopien der *pylT*, welche durch die *E. coli* Promoter und Terminator-Regionen der Lys-tRNA (*proK* und *terK*) flankiert waren. Die Sequenz des eingesetzten PylT-Operons ist wie folgt: 5'-GCG GCC TGC TGA CTT TCT CGC CGA TCA AAA GG CAT TTT GCT ATT **AAG GGA TTG ACG AGG GCG TAT CTG CGC AGT AAG ATG CGC CCC** GCA TTG GAA ACC TGA TCA TGT AGA TCG AAT GGA CTC TAA ATC CGT TCA GCC GGG TTA GAT TCC CGG GGT TTC CGC CAT ACA TGT TAT GGA AAC CTG ATC ATG TAG ATC GAA TGG ACT CTA AAT CCG TTC AGC CGG GTT AGA TTC CCG GGG TTT CCG CCA TAC ATG TTA TGG AAA CCT GAT CAT GTA GAT CGA ATG GAC TCT AAA TCC GTT CAG CCG GGT TAG ATT CCC GGG GTT TCC GCC AAA TTC GAA AAG CCT GCT CAA CGA GCA GGC TTT TTT GCC TTA AG-3'

(*pyIT*-Abschnitte sind unterstrichen, *proK* und *terK* sind fett hervorgehoben). Das hieraus resultierende Plasmid wurde als pACYC-pGLN:norS3T bezeichnet.

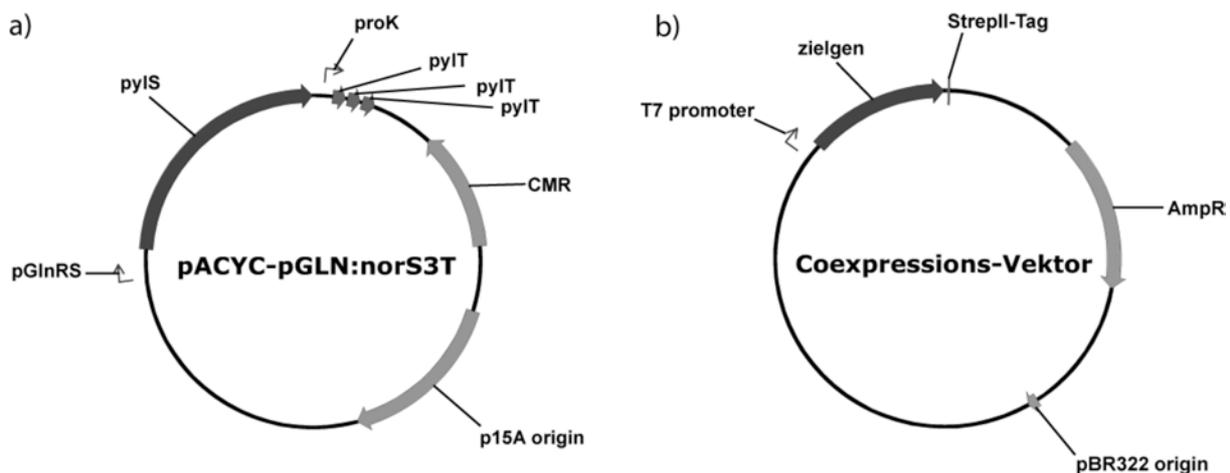


Abbildung 3.7: Vektorkarten von pACYC-pGLN: norS3T und eines Coexpressionsplasmids für das Zielgen.

Die Vorteile gegenüber des zuvor verwendeten Coexpressionsplasmids pTRP-Duet1:Mm *pyIST* waren vielfältig. Zum Einen handelte es sich bei dem verwendeten Plasmid pACYC-Duet1 um ein *low copy* Plasmid. Dieses führt, wie in der Literatur bekannt, in Kombination mit dem sehr starken konstitutiven Promoters pGLN^[153, 192-193] für gleichbleibend hohe - aber nicht zu hohe und somit eventuell nachteilige - Konzentrationen der AaRS. Das ebenfalls sehr starke und literaturbekannte Lys-tRNA Operon^[153] sollte zudem hohe tRNA-Konzentrationen in der Zelle bereitstellen, noch bevor die induktive Genexpression des Zielproteins stattfand. Zum Anderen ermöglichte die Chloramphenicol-Resistenz und der *ori* des Plasmids die Co-Transformation mit einer großen Anzahl an kommerziell erhältlichen Expressionsplasmiden. Diese besitzen für gewöhnlich eine Ampicillin-Resistenzkassette und einen kompatiblen *ori*. Somit konnte das Zielprotein durch Wahl des zweiten Plasmids einfach ausgetauscht und in Kombination mit den für das jeweilige Protein bereits optimierten Expressionsplasmiden eingesetzt werden (**Abbildung 3.7**).

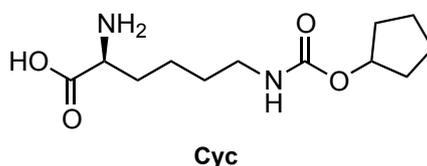
3.5.1.6 pPSG-IBA33:hpolk

Das Gen für eine verkürzte Version (Aminosäuren 19-526) der *humanen* Polymerase κ (*hPolk*) wurde von *Dr. Stephanie Schorr* und *Christian Deiml* in den

Vektor pPSG-IBA33 eingebracht und für die Expression optimiert. Hierzu wurde der Genabschnitt mit den Primern *fw-polk*: 5'-AGC GGC TCT TCA ATG GGC CTG AAC GAT AAT AAA GCA GGA ATG GAA GGA T-3' und *rv-polk*: 5'-AGC GGC TCT TCT CCC TTG TTG GTG TTT CCT GTC CTC TTC-3' über PCR amplifiziert. Anschließend wurde das ca. 1.5 kb lange PCR-Produkt in einer zweistufigen Stargate[®]-Klonierung über den Vektor pENTRY-IBA10 (*IBA*) in den Vektor pPSG-IBA33 (*IBA*) transferiert. Dieser Vektor ermöglichte die T7-kontrollierte Expression eines C-terminal His₆-Fusionsproteins. Mittels der QuikChange[®]-Methode zur ortsgerichteten Mutagenese und den Primern *fw-q163amber-polk* 5'-GCT AAG AGG CTG TGC CCA TAG CTT ATA ATA GTG CCC CCC-3' und *rv-q163amber-polk* 5'-GGG GGG CAC TAT TAT AAG CTA TGG GCA CAG CCT CTTA GC-3' wurde anschließend ein *Amber*-Codon an der Position 163 (Gln) eingebracht.

3.5.2 SCREENING FÜR GEEIGNETE PYLRS-SUBSTRATE

Um zu testen, ob eine ausgesuchte unnatürliche Aminosäure von der pyrrolsytRNA Synthetase akzeptiert wird, wurden BL21(DE3) Zellen mit dem Plasmid pET-Duet1: Mm *pylST*: *mut-yfp* in Anwesenheit der unnatürlichen Aminosäure kultiviert und mit IPTG zur Expression der Proteine PylRS und *mut-YFP* sowie der tRNA *PylT* angeregt. Im Falle des erfolgreichen Einbaus der unnatürlichen Aminosäure in YFP würde die *in vivo* Detektion von YFP möglich sein. Bei ausbleibendem Einbau der Aminosäure in der durch das *Amber*-Codon vorgegebenen Position würde kein Fluoreszenzsignal durch die Zellen produziert werden. Zunächst wurde getestet, ob dieses *Screening*-System sich dazu eignet, den erfolgreichen Einbau einer Aminosäure nachzuweisen.



Schema 3.9: Struktur von N-ε-Cyclopentylloxycarbonyl-L-lysin (Cyc).

Hierzu wurde in einer Positivkontrolle den Zellen eine unnatürliche Aminosäure angeboten, welche als geeignetes PylRS-Substrat bekannt war. Dabei handelte es sich um das kommerziell erhältliche N-ε-Cyclopentylloxycarbonyl-L-lysin (Cyc,

Schema 3.9).^[5] In einer Negativkontrolle wurde den Zellen keine unnatürliche Aminosäure angeboten. Dieses sollte zum Einen ausschließen, dass die Zellen eine endogene Aminosäure an die *Amber*-Position in YFP einbauen und zum Anderen, dass das verkürzte YFP eine (Rest-)Fluoreszenz besitzt. Hierzu wurden die Zellen in einer 5 mL-Übernachtskultur in LB-Medium mit 100 µg/mL Carbenicillin bei 37 °C und 200 rpm kultiviert. Am folgenden Tag wurden 100 µL dieser Kultur abzentrifugiert und in 1 mL frischem LB-Medium (mit 100 µg/mL Carbenicillin und 1 µM IPTG) resuspendiert. Die Positivkontrolle wurde zusätzlich mit 1 mM Cyc versetzt. Nachdem die durch IPTG induzierte Protein- und tRNA-Expression für 3 h bei 37 °C und 200 rpm stattgefunden hatte, wurden 15 µL der Kultur auf einen Objektträger überführt und an einem *TCS SPE* spectral confocal microscope (*Leica*) mit inversem Aufbau und einem HCX FL APO 63x/140-0.60 Öl-Objektiv analysiert. Die Zellen wurden hierbei mit einer Wellenlänge von 488 nm angeregt. Die Fluoreszenz-Unterschiede der beiden Kulturen zeigten in der Tat, dass sich dieser Versuchsaufbau dazu eignet, zwischen erfolgreichem und nicht erfolgreichem Einbau einer unnatürlichen Aminosäure mittels des Pyrrolysin-Systems zu unterscheiden.

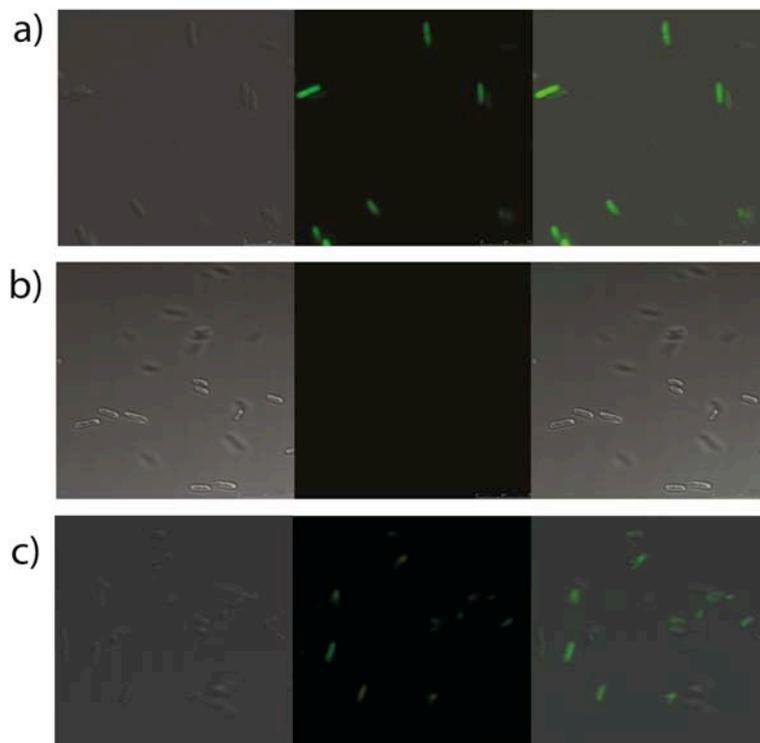
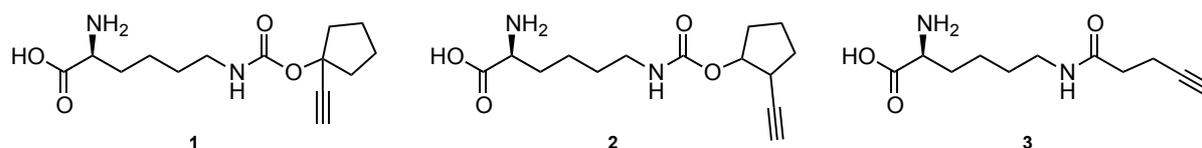


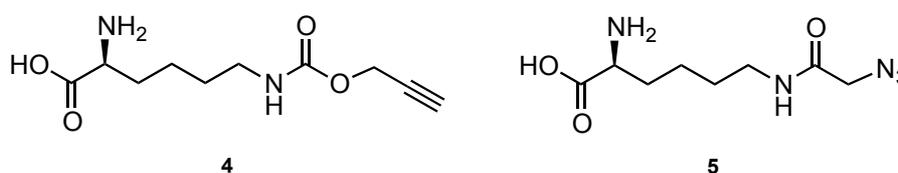
Abbildung 3.8: Fluoreszenzmikroskopische Analyse. a) eYFP produzierende BL21(DE3)-Zellen; b) 1 mut-YFP ohne UAA; c) 1 mut-YFP mit Cyc (links: Durchlicht; mitte: Fluoreszenz; rechts: Überlagerung).

Wie in **Abbildung 3.8** dargestellt, produzierten die Zellen der Negativkontrolle kein detektierbares Fluoreszenzsignal. Ein solches Signal konnte jedoch deutlich in den Zellen mit Cyc nachgewiesen werden. Da diese *Screening*-Methode zudem mit äußerst geringem Material- und Zeitaufwand einherging und aufgrund der einfachen Durchführung ideale Voraussetzungen für reproduzierbare Resultate bot, wurde es als *Screening*-System in dieser Arbeit beibehalten um neue Substrate für die pyrrolsyt-tRNA-Synthetase zu identifizieren. Diese unnatürlichen Aminosäuren, welche von *Veronika Ehmke* und *Dr. Milan Vrabel* synthetisiert worden waren, wurden so gewählt, dass sie sich für die Cu(I)-katalysierte Cycloaddition eigneten. Daher stellten diese Lysin-Derivate entweder endständige Alkin- oder Azid-Gruppen zur Verfügung. Anfänglich wurden die Derivate **1**, **2** und **3** im oben beschriebenen *Screening*-System getestet (**Schema 3.10**). Keines dieser Derivate zeigte jedoch eine detektierbare YFP-Fluoreszenz, was darauf schließen ließ, dass sie nicht durch die PylRS erkannt und auf die PylT geladen wurden. Somit war auch der Einbau in die wachsende Peptidkette an der vorgesehenen Position während der ribosomalen Proteinbiosynthese nicht möglich.



Schema 3.10: Strukturen der ersten drei Pyl-Derivate, welche im Rahmen dieser Arbeit auf cotranslationalen Einbau getestet wurden.

Es bestand die Möglichkeit, dass der Einbau aufgrund zu geringer Konzentrationen in der Zelle verhindert wurde, da zum Beispiel die Zellen die angebotene Aminosäure nicht oder nur schlecht aufnehmen konnten. Daher wurde versucht, den Konzentrationsgradienten zwischen dem Cytoplasma und dem umgebenden Medium zu erhöhen, um den Transport in die Zelle zu erleichtern. Hierzu wurde die Aminosäurekonzentration im Expressionsmedium von 1 mM auf 5 mM erhöht. Durch Fluoreszenzmikroskopie konnte auch bei diesen Bedingungen kein Einbau der bereitgestellten unnatürlichen Aminosäure nachgewiesen werden.



Schema 3.11: Strukturen der Pyl-Derivate 4 und 5.

Es wurden zwei weitere Pyl-Derivate (**4** und **5**) synthetisiert und auf den *in vivo* Einbau in *E. coli* mit Hilfe des Pyrrolysin-Systems getestet (**Schema 3.11**). Während die Fluoreszenz-Mikroskopie auch für das Pyl-Derivat **5** keinen Nachweis für den Einbau in YFP_{Lys114Amber} lieferte, konnte dieser für die Aminosäure **4** erzielt werden. Sowohl bei einer Konzentration von 1 mM als auch 5 mM konnte die YFP-spezifische Fluoreszenz bei 527 nm detektiert werden (**Abbildung 3.9**).

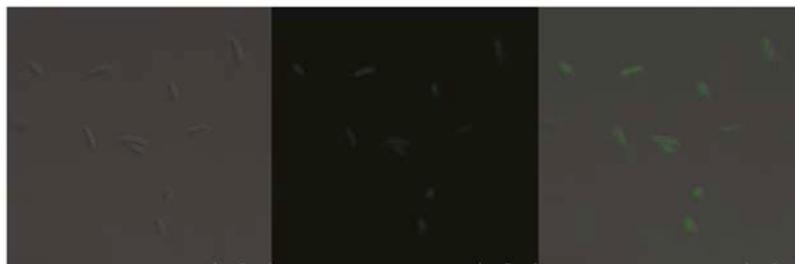


Abbildung 3.9: Fluoreszenzmikroskopische Analyse. Analyse der 1 mut-YFP Produktion in Anwesenheit von 1 mM **4** (links: Durchlicht; mitte: Fluoreszenz; rechts: Überlagerung).

Die Aminosäure **4**, welche über eine endständige Alkylgruppe verfügt, unterscheidet sich hierbei in der Carbamat-Gruppe von den getesteten Pyl-Derivaten **3** und **5**. Der Sauerstoff der Carbamat-Funktion ist eine elektronenreiche Position im Aminosäurerest, die bei Betrachtung der in der Literatur beschriebenen, erfolgreich eingebauten Pyrrolysin-Analoga essentiell für die Erkennung durch PylRS zu sein scheint.^[3, 5-6, 8] Die elektronenreiche Einheit fehlte in den getesteten Aminosäuren **3** und **5**. Vermutlich bindet diese auf die gleiche Weise an das Enzym wie der Stickstoff des Pyrrol-Rings des natürlichen Substrats Pyrrolysin. Mit diesem positiven *Screening*-Ergebnis würde es möglich sein, ein Protein mit der unnatürlichen Aminosäure **4** herzustellen, die anschließend eine ortsspezifischen Cu(I)-katalysierte Cycloaddition erlaubte. Die Derivate **1** und **2** wurden nicht akzeptiert, obwohl sie über die für die Substraterkennung wichtige Carbamant-Funktion verfügten. Vermutlich war die Position des Alkin-Rests am Cyclopentan-Ring falsch für die Erkennung durch PylRS.

3.5.3 AUFREINIGUNG VON YFP_{Lys114Alkin}

Um nachzuweisen, dass sich Alkin-Lysin **4** nicht nur für den Einbau in Proteine sondern auch zur selektiven Modifizierung im Proteinkontext eignet, wurde dieses Derivat in größerem Maßstab zur Proteinproduktion eingesetzt. Als Zielprotein wurde YFP gewählt, da es für die heterologe Expression in *E. coli* in relativ großen Mengen geeignet ist und Protokolle zur YFP-Expression zur Verfügung standen. Zudem ist YFP ein thermostabiles Protein. Es lässt sich nach der Herstellung für längere Zeit lagern und ist aufgrund seiner Stabilität ein geeignetes Modell für die Ausarbeitung der durchzuführenden Click-Reaktionen. Diese wurden, wie schon bei bioorthogonalen Modifizierungen mit Alkin-haltiger DNA gezeigt, bei Raumtemperatur durchgeführt. Bei weniger thermostabilen Proteinen könnte dies zur Denaturierung führen, da die Click-Reaktion unter Umständen über mehrere Stunden erfolgen muss. Lange Reaktionszeiten können auf die komplexe Proteinstruktur zurückgeführt werden, welche die Zugänglichkeit der Aminosäure für den Reaktionspartner erschwert. Dadurch wird die Reaktion langsamer ablaufen. In den für DNA-Modifizierung üblichen Click-Bedingungen hingegen lief die Reaktion meist schneller ab, da in DNA eingebrachte Funktionalitäten für gewöhnlich weniger sterisch behindert sind. Ein weiterer Vorteil von YFP für die Durchführung dieser Experimente bestand in dessen Fluoreszenz- und Absorptionsverhalten. Die Fluoreszenz ermöglichte noch während der Expression in *E. coli* die Überprüfung auf die gewünschte Proteinproduktion mittels einfacher Fluoreszenzmikroskopie. Die Absorptionsmaxima bei 488 und 514 nm wiederum erlaubten eine spezifische Detektion der YFP-haltigen Fraktionen während der Aufreinigung am ÄKTA[®] Purifier. Zudem kann durch visuelle Überprüfung der Fluoreszenz nach der Reaktion festgestellt werden, ob das Protein durch die Derivatisierung denaturiert ist oder noch nativ vorliegt.

Zur Herstellung von YFP wurden, wie schon für das Substrat-Screening beschrieben, BL21(DE3)-Zellen mit dem Plasmid pTRP-Duet1:Mm pyIST:mut¹-yfp transformiert. Die Herstellung von YFP_{Lys114Alkin} (1 mut-YFP) erfolgte standardmäßig in 2 L-Schüttelkulturen in LB-Medium mit 100 µg/mL Carbenicillin. Es wurden zusätzlich 2 mM von **4** während der Wachstumsphase der Zellen hinzugefügt um eine möglichst effiziente Aufnahme der Aminosäure in das Cytoplasma zu gewährleisten. Da auch PylRS und PylT bereits in dieser Phase konstitutiv hergestellt wurden, sollte

zudem eine Beladung der tRNA mit **4** noch vor der Produktion des Zielproteins ermöglicht werden. Bei einer OD_{600nm} von 0.6 wurde die Produktion von YFP durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert und erfolgte für 3 h. Die Zellen wurden am Fluoreszenzmikroskop auf YFP-Fluoreszenz untersucht und bei bestehender Fluoreszenz zentrifugiert. Die Zellen wurden für die Proteinreinigung aufgeschlossen um das klare Lysat über StrepII-Affinitätschromatographie und anschließender Mono Q-Ionenaustauscher Chromatographie zu reinigen (**Abbildung 3.10**). Die YFP-haltigen Fraktionen wurden gesammelt und in YFP Puffer A (10 mM Tris-HCl pH 8, 2 mM EDTA) in einer Konzentration von ca. 1 mg/mL überführt. Die Proteinmenge wurde mittels des Bradford-Assays bestimmt und ergab eine Ausbeute von ca. 0.3 mg/L(Schüttelkultur).

3.5.4 BESTIMMUNG DER SUPPRESSIONS-EFFIZIENZ

Um die Suppressions-Effizienz des angewendeten Pyl-Systems in *E. coli* mit Alkin-Lysin **4** zu bestimmen wurde die Ausbeute von YFP_{Lys114Alkin} mit der Ausbeute des natürlichen Proteins verglichen. Hierzu wurde das Plasmid pDEST-007:eyfp in BL21(DE3) Zellen transformiert und diese Zellen in Abwesenheit einer unnatürlichen Aminosäure zur Proteinproduktion eingesetzt. Nach der Reinigung über StrepII-Affinitätschromatographie und Mono Q-Ionenaustauscher Chromatographie wurden ca. 3 mg/L(Schüttelkultur) an eYFP gewonnen (siehe **Abbildung 3.10**). Dieser Wert war niedriger als der in der Literatur angegebene Wert für die Gewinnung von eYFP aus *E. coli*. Hierfür können mehrere Faktoren verantwortlich sein, wie etwa die geringe Sauerstoffversorgung in den Kulturkolben. Das könnte durch Verringerung der Kulturvolumina oder durch Fermentation unter konstanter Sauerstoffzufuhr verbessert werden. Dadurch könnten höhere Zelldichten erreicht und somit mehr Protein hergestellt werden.

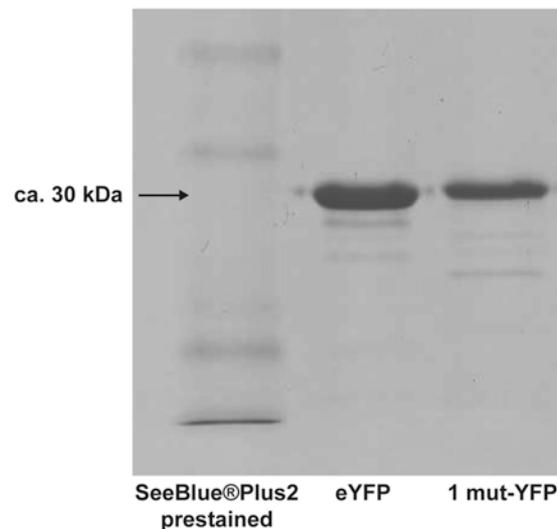


Abbildung 3.10: SDS-PAGE der rekombinanten Proteine eYFP sowie YFP_{Lys114Amber}. Die durch Coomassie-Färbung sichtbar gemachten Proteine wurden über StreptII-tag Affinitäts- sowie Mono Q Ionenaustauscherchromatographie gereinigt.

Vergleicht man die Ausbeuten der Proteine eYFP und YFP_{Lys114Amber}, welche unter ähnlichen Bedingungen erzielt wurden, so war eine Verringerung der Ausbeute um den Faktor 10 zu verzeichnen. Die Suppressions-Effizienz ist somit nicht optimal. Dies könnte eine Folge der geringeren Substrataffinität der PylRS zum Alkin-Analogon gegenüber Pyrrolysin sein. Fluoreszenz mikroskopische Untersuchungen mit Cyc und dem Alkin-Analogon zeigten bereits eine geringere Fluoreszenzintensität der YFP_{Lys114Alkin}- gegenüber der YFP_{Lys114Cyc}-produzierenden *E. coli*-Zellen (siehe **Abbildung 3.8c** und **Abbildung 3.9**). Wie in der Literatur bereits beschrieben,^[5] wird Cyc von der PylRS schlechter auf die korrespondierende tRNA geladen als das natürliche Substrat Pyrrolysin. Daher liegt die Annahme nahe, dass eine ineffiziente Beladung des Alkin-Lysin auf PylT zur geringen Suppressions-Effizienz führte. Ein weiterer Grund hierfür könnte auch die schlechte Aufnahme des Pyl-Analogons **4** in die Zellen sein, wodurch ebenfalls nicht genügend PylT-Moleküle durch die PylRS aktiviert wurden. Des Weiteren könnte die Konzentration dieser beiden Faktoren, PylT und PylRS, in den Zellen zur schlechten Suppressionsrate beigetragen haben. Diese Möglichkeit wurde in Betracht gezogen. Daher wurden im Laufe dieser Arbeit durch den Gebrauch eines veränderten Expressionssystems (siehe *Abschnitt 3.5.1.5* und *3.5.10*) höhere Konzentrationen von PylRS und PylT bereitgestellt.

3.5.5 MEHRFACH-EINBAU DES ALKIN-ANALOGONS IN PROTEINE

Nachdem der *in vivo*-Einbau des Alkin-Lysins mit Hilfe des Pyl-Systems erfolgreich war, sollten im nächsten Schritt mehrere Alkin-Funktionalitäten in ein Protein eingebracht werden. Hierzu wurden die Plasmide pTRP-Duet1:Mm pylST:mutⁿ-yfp (n: 2-4) jeweils in BL21(DE3)-Zellen transformiert. Die Proteine YFP_{Lys27Alkin-Lys114Alkin} (2 mut-YFP), YFP_{Lys27Alkin-Lys114Alkin-Lys132Alkin} (3 mut-YFP) sowie YFP_{Lys27Alkin-Lys114Alkin-Lys132Alkin-Leu138Alkin} (4 mut-YFP) wurden wie die Einfach-Mutante exprimiert und gereinigt. Nach der zweistufigen Reinigung wurde die Ausbeute der einzelnen Mutanten über Bradford-Assay bestimmt und mit den Ausbeuten für eYFP und 1 mut-YFP verglichen:

Tabelle 3.2: Proteinausbeuten von eYFP sowie dessen Ein- und Mehrfachmutanten.

YFP-Variante	Ausbeute in mg/L
eYFP	3.5
1 mut-YFP	0.3
2 mut-YFP	0.1
3 mut-YFP	0.03
4 mut-YFP	-

Diese Werte zeigten neben der bereits beschriebenen Reduktion der Ausbeute von 1 mut-YFP im Vergleich zu eYFP eine weitere Reduktion für jede weitere Amber-Suppression. Während für 1 mut-YFP noch 0.3 mg/L Protein gewonnen werden konnten, reduzierte sich dies bei einer weiteren kodierten Alkin-Aminosäure in 2 mut-YFP um den Faktor 3 auf 0.1 mg/L. Dieser Effekt wurde auch bei der Einführung einer dritten Alkin-Aminosäure in 3 mut-YFP beobachtet. Die Ausbeute verringerte sich hierbei um den selben Faktor auf ca. 0.03 mg/mL. Eine YFP-Mutante mit vier genetisch kodierten Alkin-Lysinen konnte nicht in den Mengen hergestellt werden, die für eine Aufreinigung nötig gewesen wären.

Die hier erzielten Ausbeuten zeigten deutlich, dass die Suppressions-Effizienz einen limitierenden Einfluss auf die Proteinmenge besitzt. Je häufiger das Stopp-Codon überlesen werden muss, desto geringer sind die Ausbeuten des vollständigen Proteins. Dies liegt vor Allem an der Art der Terminations-Suppression: die Bindung

von PylT an das Codon UAG steht in Konkurrenz zur Bindung des *release* Faktors 1 (RF1).^[154-156] Dieser erkennt das *Amber*-Codon während der ribosomalen Proteinbiosynthese und katalysiert den Abbruch der Translation. In *E. coli* wird dieses Codon selten zur Translations-Termination verwendet.^[194] Daher sollte die *Amber*-Suppression zu wenigen Kreuzreaktionen mit anderen Genen, an dessen Ende sich das *Amber*-Codon befindet, führen. Dies gilt jedoch nicht zwingend für die Konzentrationen und Aktivität von RF1 in der Zelle. Da RF1 auch für die Erkennung des *Ochre*-Codons UAA verantwortlich ist, würde die benötigte und vorhandene RF1-Konzentration in der Zelle ausreichen, um die Suppressions-Effizienz durch Verdrängung von PylT deutlich herabzusetzen. Um nachzuweisen, dass die Anzahl der Stopp-Codons für die verringerten Ausbeuten verantwortlich waren, wurde eine Westernblot-Analyse durchgeführt (siehe **Abbildung 3.11**). Hierzu wurden die Proteine eYFP, 1 mut-, 2 mut-, 3 mut- und 4 mut-YFP unter Standardbedingungen exprimiert. Als Kontrolle wurden zudem Expressionen in Anwesenheit von Cyc sowie in Abwesenheit von unnatürlichen Aminosäuren durchgeführt. Nach erfolgter Expression wurden je 30 µL der Zellen durch Aufkochen in SDS-Auftragspuffer aufgeschlossen und die Proteinkonzentration in der löslichen Fraktion durch *Amidoblack* Färbung bestimmt. Je ca. 7 µg Gesamtproteinmenge wurden über SDS-PAGE getrennt und für eine Western-Blot Analyse verwendet. Hierzu wurde ein sequenzspezifischer polyklonaler anti-GFP Antikörper (in Hasen hergestellt) verwendet, da eYFP eine Mutante des *enhanced Green fluorescent protein* (eGFP_{Thr203Tyr}) ist. Diese Proteine sind daher fast sequenzidentisch. Da der verwendete polyklonale Antikörper mehrere Sequenzabschnitte erkannte, konnten zudem auch Abbruchfragmente des Proteins nachgewiesen werden. Nach der sekundären Immunreaktion mit einem anti-*Rabbit* HRP-Konjugat (*Sigma Aldrich*) wurden die YFP-Varianten auf der Membran über Chemilumineszenz visualisiert.

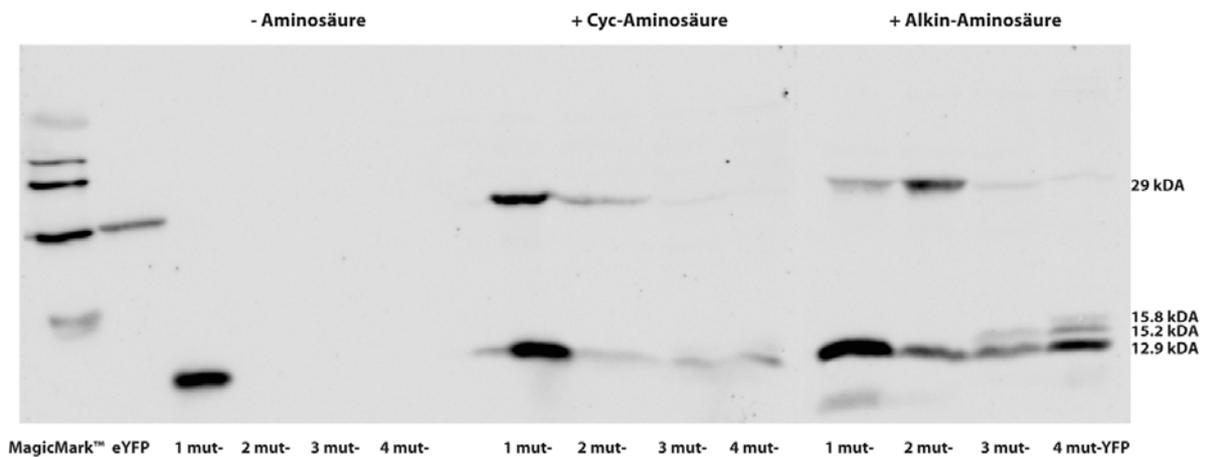


Abbildung 3.11: Analyse der Suppressionseffizienz. Western-Blot von eYFP sowie der Proteine 1 mut-, 2 mut-, 3 mut- und 4 mut-YFP in Abwesenheit einer UAA, in Anwesenheit von 5 mM Cyc bzw. 4.

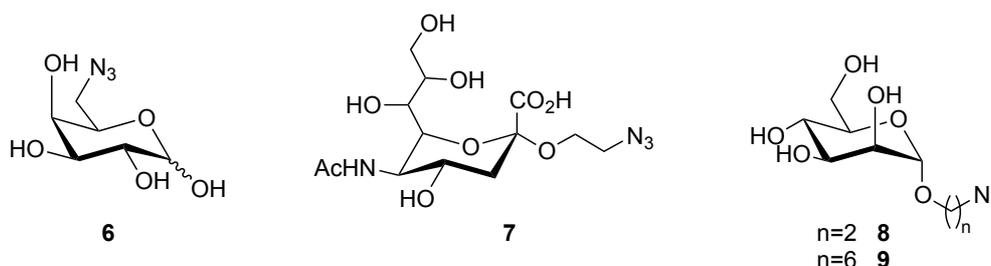
Anhand der Western-Blot Analyse konnten die Abbruch-Fragmente an der zweiten, dritten und vierten Amber kodierten Position eindeutig bestimmt werden. Die erste *Amber* kodierte Position 27, welches durch Translations-Termination bei den Konstrukten 2 mut-, 3 mut- und 4 mut-YFP zu einem ca. 2.9 kDa schweren Peptid führte, konnte mit dieser Analyse aufgrund der zu geringen Größe nicht detektiert werden. Bei Betrachtung der Ergebnisse für die Expression in Abwesenheit einer unnatürlichen Aminosäure konnte daher nur das Abbruchfragment an Position 114 in 1 mut-YFP mit einem Molekulargewicht von ca. 12.9 kDa identifiziert werden. In den anderen Konstrukten endete die Translation des Proteins am ersten *Amber*-Codon und war nicht auf dem Western-Blot zu erkennen. In Anwesenheit von Cyc während der Expression konnte das Vollängen-YFP gebildet werden. Der Anteil am vollständigen Protein nahm jedoch mit der Anzahl der *Amber*-Codons ab. Im Falle des Alkin-Lysins 4 war ein ähnliches Ergebnis zu beobachten, jedoch sah man hier zusätzlich die einzelnen Abbruchfragmente, wie sie aus der Position der *Amber*-Codons zu erwarten waren. Aus dieser Analyse ließ sich also schlussfolgern, dass mit steigender Anzahl an *Amber*-Codons die Konkurrenz-Ereignisse mit RF1 zunahm und daher vermehrt unvollständig translatierte Proteine gebildet wurden. Man kann diese kompetitive Reaktion daher als Grund für die reduzierte Suppressions-Effizienz ansehen.

Dieses Ergebnis wurde gestützt durch die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der unterschiedlichen Expressionskulturen in Anwesenheit der Alkin-Aminosäure. Je

öfter das *Amber*-Stoppcodon zur Einführung der unnatürlichen Aminosäure präsent war, desto schwächer war die beobachtete *in vivo* YFP-Fluoreszenz der Zellen. Im Falle der vierfach-Mutante konnte keine Fluoreszenz mehr detektiert werden.

3.5.6 FUNKTIONALISIERUNG VON ALKIN-LYSIN IM PROTEIN

Um zu zeigen, dass die genetische Kodierung von Alkinen in Proteine eine wertvolle Methode zur ortsspezifischen Funktionalisierung von Proteinen darstellt, wurden YFP-Proteine mit bis zu drei Alkin-Aminosäuren hergestellt und über die Cu(I)-katalysierte Click-Reaktion glykosyliert. Ziel war es, diese Methode als einfache Alternative zur meist nicht steuerbaren, natürlichen Glykosylierung von Proteinen zu etablieren. Hierzu wurden von *Dr. Milan Vrabec* und *Peter Thumbs* die entsprechenden Zuckerazide synthetisiert.



Schema 3.12: Strukturen der Zuckerazide. Diese wurden für die Cu(I) katalysierte Click-Reaktion an YFP verwendet.

Es handelte sich dabei um das Galactose-Azid **6**, das biologisch relevante N-Acetylneuraminsäure-Derivat **7** sowie die Mannose-Azide **8** und **9**, wie sie in **Schema 3.12** dargestellt sind. Für die Click-Reaktion wurden 500 eq des jeweiligen Zuckerazids mit dem Protein (1 mut-, 2 mut- bzw. 3 mut-YFP) in YFP-Puffer gemischt. Anschließend wurde eine frisch angesetzte Lösung aus CuSO₄ (100 eq), L-(+)-Natriumascorbat (100 eq) sowie TBTA-Ligand (200 eq) hinzugegeben. Bei dieser Reaktion wird die aktive Cu(I)-Spezies *in situ* aus Cu(II)SO₄ und L-(+)-Natriumascorbat als Reduktionsmittel hergestellt. Um auszuschließen, dass unter diesen Bedingungen unspezifische Reaktionen am Protein stattfinden, wurden die Click-Reaktionen zudem an eYFP durchgeführt. Die Reaktionslösung wurde über Nacht bei RT inkubiert und ohne weitere Aufreinigungsschritte über SDS-PAGE

getrennt. **Abbildung 3.12** zeigt die Trennung der Click-Reaktionen mit 3 mut-YFP über SDS-PAGE. Die Gele für 2 mut- und 3 mut-YFP waren vergleichbar).

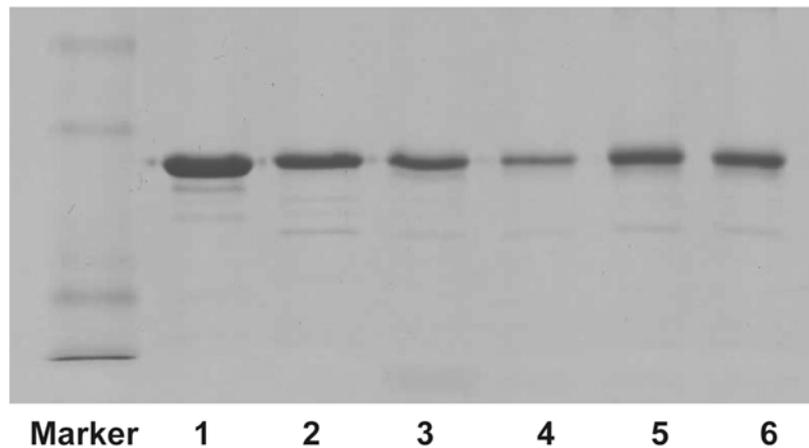


Abbildung 3.12: Click-Reaktionen an 1 mut-YFP. Spur 1) eYFP; 2) 1 mut-YFP; 3) 1 mut-YFP mit **6**; 4) 1 mut-YFP mit **7**; 5) 1 mut-YFP mit **8**; 6) 1 mut-YFP mit **9**; 7) 1 mut-YFP mit **9**.

Hierbei zeigte sich, dass durch die gewählten Reaktionsbedingungen das Protein nicht denaturiert wird. In diesem Fall wären die mit Coomassie angefärbten Proteinbanden deutlich schwächer als die ebenfalls auf dem Gel aufgetragene Kontrolle des nicht-derivatisierten Proteins. Die Proteinbanden besaßen jedoch eine ähnliche Intensität wie die gleiche Menge des nicht modifizierten Proteins. Für den Nachweis der erfolgreichen Derivatisierung von 1 mut- bzw. 3 mut-YFP mit den Zuckeraziden **6-9** wurden die Proteinbanden aus dem Gel ausgeschnitten und (chymo)tryptisch verdaut. Die Peptide wurden anschließend über HPLC-MS/MS analysiert.

```

M V S K G E E L F T G V V P I L V E L D G D V N G H K * F S V S G E G E G D A T Y G K L T L K F I C T T G K L P
V P W P T L V T T F G Y G L Q C F A R Y P D H M K Q H D F F K S A M P E G Y V Q E R T I F F K D D G N Y K T
R A E V K * F E G D T L V N R I E L K G I D F K * E D G N I L G H K L E Y N Y N S H N V Y I M A D K Q K N G I K V
N F K I R H N I E D G S V Q L A D H Y Q Q N T P I G D G P V L L P D N H Y L S Y Q S A L S K D P N E K R D H M
V L L E F V T A A G I T L G M D E L Y K R S I L K M A S A W S H P Q F E K S G
    
```

Abbildung 3.13: YFP-Sequenz mit Positionen der Amber-codierten Alkin-Lysinen (K*). Die für die Peptid-MS/MS chymotryptisch erzeugten Fragmente sind unterstrichen, die tryptisch erzeugten Fragmente sind fett dargestellt.

Abbildung 3.13 zeigt die Peptidfragmente, die durch den Verdau von 3 mut-YFP mit Trypsin bzw. Chymotrypsin resultierten. Während der Verdau mit Trypsin die

Detektion der Modifikationen an Position 114 sowie 132 ermöglichte, war für die Detektion der Modifikationen an Position 27 ein Verdau mit Chymotrypsin erforderlich. Die auf diese Weise erzeugten Fragmente konnten aufgrund ihrer Molekulargewichte über HPLC-MS/MS an einem Orbitrap-Massenspektrometer nachgewiesen werden. Des Weiteren konnten, wie in **Abbildung 3.14** gezeigt, durch MS-Sequenzierung dieses Peptids die kritischen B- und Y-Ionen gefunden werden. Die Ergebnisse der nano-HPLC MS/MS Analyse für die Positionen 27 und 132 waren vergleichbar und bewiesen den korrekten Einbau der Alkin-Aminosäure (siehe **Abbildungen 8.1** und **8.2, Anhang**). Zudem konnten auch die Click-Produkte mit den Aziden **6-9** durch die MS/MS-Sequenzierung nachgewiesen werden. Sie sind repräsentativ durch das MS/MS Spektrum des Click-Produkts an Position 114 mit **8** in **Abbildung 8.3 (Anhang)** dargestellt.

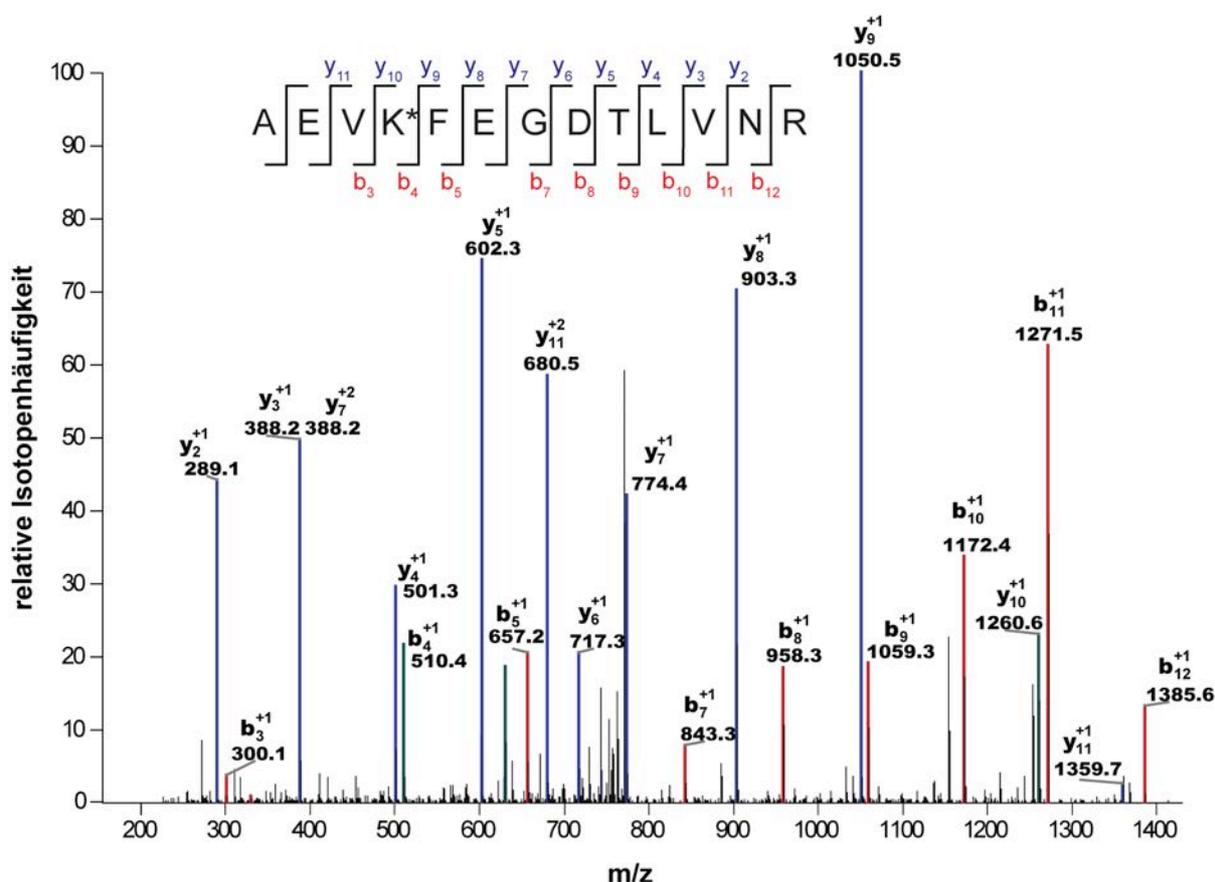


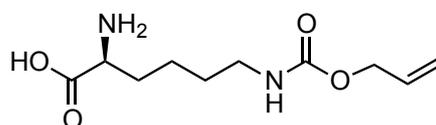
Abbildung 3.14: MS/MS Spektrum des Peptids AEVK*FEGDTLVNR (K* = Position des Alkin-Lysins).

Die gewonnenen Daten wurden mit Hilfe eines Suchalgorithmus innerhalb der Xcalibur bioworks Software (*Thermo Finnigan*) mit den theoretisch ermittelten Molekulargewichten der glykosylierten Peptide verglichen. Die totale Sequenzabdeckung der Daten lag meist bei sehr guten 70 bis 80%.

In **Tabelle 8.1** (*Anhang*) sind die wichtigsten, experimentell gefundenen Peptidfragmente von 1 mut- bzw. 3 mut-YFP aufgelistet, welche die Alkin-Aminosäure bzw. deren Glykosylierungsprodukt besitzen. Über die HPLC-MS/MS Analyse konnte folglich eindeutig bewiesen werden, dass die nicht-kanonische Alkin-Aminosäure an den korrekten Positionen in der Sequenz in das Protein eingebaut wurde und über die Cu(I) katalysierte Click-Reaktion glykosyliert werden konnte.

3.5.7 EINBAU EINES ALLOC-DERIVATS VON PYRROLYSIN ZUR KUPFERFREIEN CLICK-REAKTION

Das in der Literatur beschriebene Alloc-Lysin^[5] (siehe **Schema 3.13**), welches über eine reaktive Alkenfunktion verfügt, sollte aufgrund seiner Eigenschaft als PyIRS-Substrat als *Amber*-kodierte unnatürliche Aminosäure in Proteine eingeführt werden.



Alloc-Lys(OH)

Schema 3.13: Struktur des kommerziell erhältlichen Alloc-Lysins. Die Aminosäure verfügt über eine reaktive Doppelbindung, welche in einer kupferfreien Click-Reaktion mit Nitriloxiden untersucht werden sollte.

Ziel war die kupferfreie Katalyse mit Nitriloxiden, wie sie bereits an DNA gezeigt wurde.^[195] Zunächst wurde über YFP-Fluoreszenzmikroskopie und Western-Blot Analyse die Akzeptanz dieser Aminosäure in dem oben beschriebenen *E. coli*-System getestet.

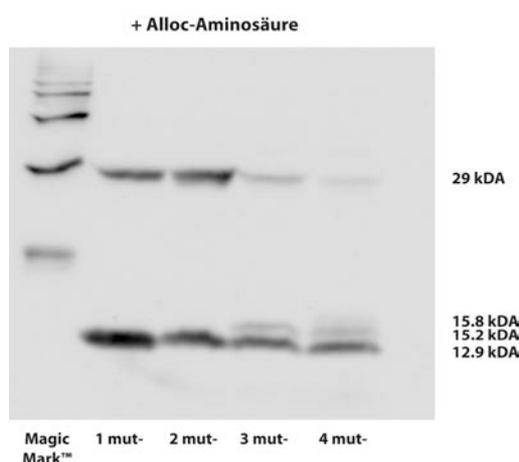
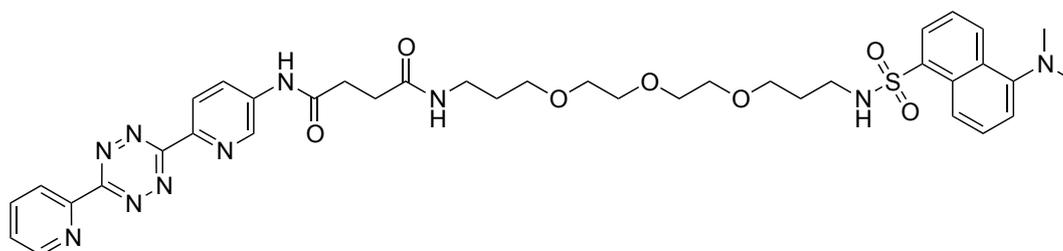


Abbildung 3.15: Analyse der Suppressionseffizienz mit Alloc-Lysin. Western-Blot der Proteine 1 mut-, 2 mut-, 3 mut- und 4 mut-YFP in Anwesenheit von 5 mM Alloc-Lysin.

Wie die in **Abbildung 3.15** dargestellte Western-Blot Analyse zeigt, war auch der Einbau des Alloc-Lysins in 1 mut-, 2 mut- und 3 mut-YFP erfolgreich. Ebenso wie die genetische Kodierung des Alkin-Lysins **4**, war bei der Einführung mehrerer Alloc-Derivate eine Abnahme des vollständig translatierten YFP zu beobachten. Bei steigender Anzahl an *Amber*-Codons nahm die Intensität der Bande für das Vollängenprotein ab (ca. 29 kDa), während eine gleichzeitige Zunahme an Abbruchfragmenten zu verzeichnen war.



Schema 3.14: Dansyl-Derivat **10**. Dieses reagiert mit N-Chlorosuccinimid *in situ* zu einem Nitriloxid^[195], welches in einer 1,3-dipolaren Cycloadditions Reaktion eingesetzt werden sollte.

Das erfolgreich in das Protein eingebrachte Alloc-Derivat sollte im Anschluss über eine kupferfreie Click-Reaktion selektiv mit Nitriloxiden modifiziert werden. Hierzu wurde ein entsprechendes Dansyl-Derivat **10** von *Stefan Prill* bereitgestellt (**Schema 3.14**). Nitriloxide sind sehr reaktive Moleküle die allgemein mit Nucleophilen reagieren, so dass die Möglichkeit von Nebenreaktionen mit entsprechenden Gruppen im Protein bestand, zum Beispiel mit primären Aminogruppen in den Lysinen. Um dies zu untersuchen wurden zunächst Modifizierungsreaktionen mit

natürlichen Proteinen durchgeführt. Hierzu wurden 10, 20, 50 und 100 eq des Dansyl-Nitriloxides zu eYFP in YFP-Puffer zugegeben und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

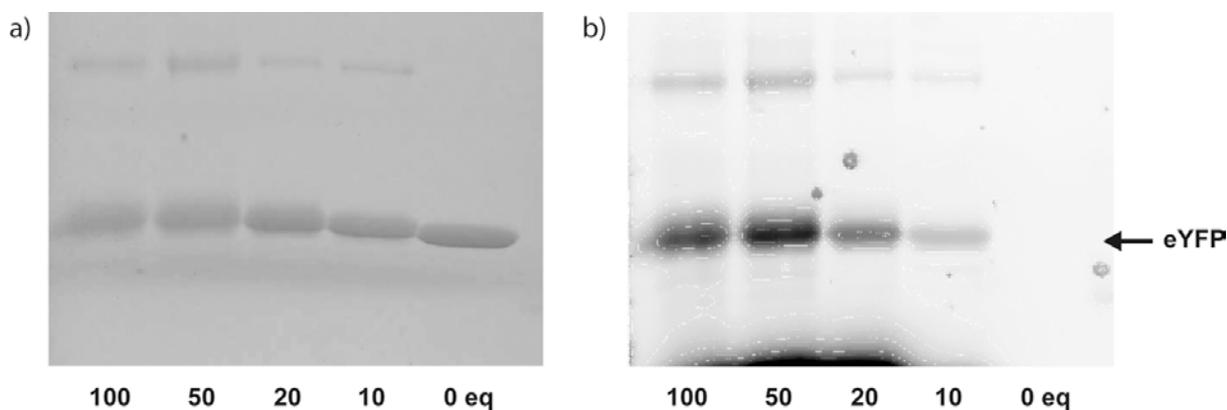


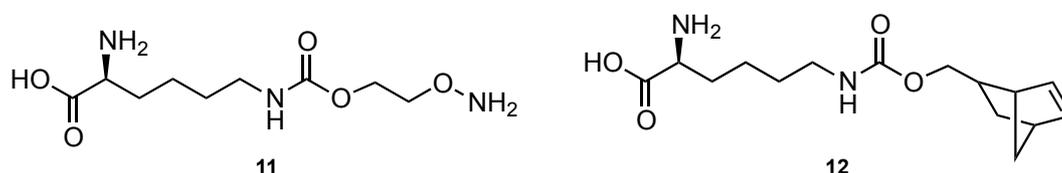
Abbildung 3.16: a) Coomassie-Färbung und b) Fluoreszenz-Aufnahme der Nitriloxid-Reaktion. Das Nitriloxid **10** wurde auf seine Reaktivität mit natürlichen Aminosäure-Resten getestet. Hierzu wurde es in 10-100 fachem Überschuss zu eYFP hinzugegeben. Auch bei der geringsten Konzentration von 10 eq konnte eine nicht-selektive Reaktion mit dem Protein detektiert werden (fluoreszierende Banden in b).

Die Reaktionslösungen wurden ohne weitere Aufreinigung über SDS-PAGE getrennt und an einer Gelapparatur auf Fluoreszenz getestet (λ_{ex} 337 nm; λ_{em} 492 nm). Wie in **Abbildung 3.16** gezeigt ist, fand bei jeder der eingesetzten Nitriloxid-Mengen eine unspezifische Reaktion mit den natürlichen Aminosäureresten im Protein statt. Aufgrund dieses unspezifischen Verhaltens wurde die Kupfer-freie Click-Reaktion zwischen dem *Amber*-kodierten Alloc-Derivat und Nitriloxiden nicht weiter verfolgt.

3.5.8 GENETISCHE KODIERUNG VON NORBORNEN- UND HYDROXYLAMIN-AMINOSÄUREN ZUR DURCHFÜHRUNG KUPFER-FREIER CLICK-REAKTIONEN

Da sich Nitriloxide aufgrund ihrer hohen Reaktivität mit nukleophilen Proteinresten nicht zur kupferfreien Clickreaktion von Proteinen eignen, wurde der genetische Einbau anderer reaktiver Funktionen zur Durchführung bioorthogonaler Reaktionen an Proteinen erforscht. Hierzu wurde der Einbau von Hydroxylamin-Aminosäuren sowie Norbornen-Aminosäuren getestet. Die Einführung einer Hydroxylamin-Aminosäure würde eine besonders nukleophile Aminofunktion im Protein bereitstellen, welche bei der Reaktion mit Aldehyden stabile Oxime bilden kann. Im Gegensatz hierzu wären Enamine, welche bei der Reaktion mit den natürlichen

Aminogruppen der Lysine oder mit dem N-Terminus entstehen könnten, unter physiologischen Bedingungen nicht stabil. Norbornene hingegen haben eine sehr reaktive Doppelbindung. Sie ermöglichen neben der dipolaren Cycloaddition mit den bereits getesteten Nitriloxiden eine Vielzahl anderer Reaktionen. So war es der Gruppe von *Lin* gelungen, Norbornene über Maleimid-Kupplung in Proteine einzubringen und in einer photoinduzierten dipolaren Cycloaddition mit Tetrazinen selektiv zu modifizieren.^[188] Norbornene sind zudem geeignete Reaktionspartner für Tetrazine in inversen hetero-Diels-Alder-Reaktionen. Diese ließen sich ohne Katalyse unter physiologischen (wässrigen) Bedingungen durchführen. Des Weiteren sollte untersucht werden, ob sich Nitrilimine aus Tetrazol-Verbindungen, analog zur Generierung von Nitriloxiden mit N-Chlorosuccinimid (NCS), herstellen ließen.^[195] Das hierdurch entstehende Hydrazonoyl-Chlorid könnte dann zur selektiven Funktionalisierung von Norbornenen in einer dipolaren Cycloaddition am Protein verwendet werden. Aufgrund der besonderen Reaktivität von Norbornenen ist deren Einführung in Proteine von großem Interesse. In dieser Arbeit sollte dies jedoch nicht mehr auf synthetischem Wege über die wenig ortsspezifische Maleimid-Kupplung erfolgen, sondern zum ersten Mal über ein orthogonales tRNA/AaRS-Paar während der Proteinbiosynthese.



Schema 3.15: Strukturen des Hydroxylamin-Lysins **11** und des Norbornen-Lysins **12**.

Zunächst wurde getestet, ob die PylRS aus *M. mazei* das Hydroxylamin-Lysin (HA-Lysin) **11** bzw. das Norbornen-Lysin (Norb-Lysin) **12** als Substrate akzeptierte (**Schema 3.15**). Hierzu wurden BL21(DE3) *E. coli*-Zellen mit dem Plasmid pTRP-Duet:MmpylS3T:mut¹-yfp transformiert und zur Co-Expression in Anwesenheit von 5 mM **11** bzw. **12** verwendet. Anschließend wurde über YFP-Fluoreszenzmikroskopie der Einbau in das Zielprotein überprüft. Wie die Fluoreszenz mikroskopischen Aufnahmen zeigten (**Abbildung 3.17**), konnte nur ein schwaches Fluoreszenz-Signal für die in Anwesenheit von **11** durchgeführte Expression detektiert werden. Dies wird

sicher durch eine schlechte Substrataffinität der PyIRS zu **11** und somit einen ineffizienten Einbau von **11** in YFP verursacht worden sein.



Abbildung 3.17: Fluoreszenzmikroskopische Analyse. Analyse der 1 mut-YFP Produktion in Anwesenheit von **11** (links: Durchlicht; mitte: Fluoreszenz; rechts: Überlagerung). In Anwesenheit von **12** konnte keine YFP-Produktion detektiert werden.

Die 1 mut-YFP-Expression in Anwesenheit von **12** war nicht erfolgreich, da keine Fluoreszenz detektiert werden konnte. Diese Aminosäure wurde entweder nicht in die Zelle aufgenommen oder nicht von der eingesetzten Aminoacyl-tRNA Synthetase akzeptiert. Norb-Lysin **12** verfügt zwar über die für die Substraterkennung kritische Carbamat-Funktion, doch besitzt **12** den großen, hydrophoben Norbornen-Rest, was die Aminosäure merklich von den akzeptierten Derivaten **4** und **11** unterscheidet. Um zu beweisen, dass aufgrund ungünstiger Wechselwirkungen zwischen dem Norbornenrest und PyIRS kein Einbau von **12** stattfand, wurde eine in der Literatur beschriebene PyIRS_{Tyr306Ala-Tyr348Phe}-Mutante generiert.^[6]

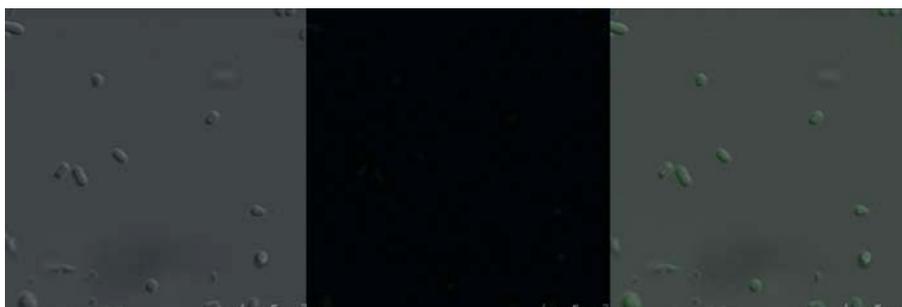


Abbildung 3.18: Fluoreszenzmikroskopische Analyse. Analyse der 1 mut-YFP Produktion in Anwesenheit von **12** mit Hilfe der Mutante PyIRS-Tyr306Ala-Tyr348Phe (links: Durchlicht; mitte: Fluoreszenz; rechts: Überlagerung).

Diese Mutante besitzt eine größere Affinität zu Pyl-Derivaten mit großen hydrophoben Resten als das Wildtyp-Protein. Hierzu wurden die entsprechenden Reste in zwei Schritten über die QuikChange[®] Methode ausgetauscht. Die

Mutagenese-PCR erfolgte hierbei auf dem Plasmid pTRP-Duet:MmpylS3T:mut¹-yfp, welches nach erfolgreicher Mutagenese (pTRP-Duet:mut-pylS3T:mut¹-yfp) unmittelbar im YFP Expressions-Screening eingesetzt werden konnte. Die Fluoreszenz mikroskopische Untersuchung mit der PylRS_{Tyr306Ala-Tyr348Phe}-Mutante ergab, dass die Zellen bei Zugabe von 5 mM ein schwaches Fluoreszenzsignal und somit geringe Mengen Norb-Lysin enthaltendes YFP produzierten (**Abbildung 3.18**).

3.5.9 ITERATIVE SATURIERUNGSMUTAGENESE VON *M. MAZEI* PYLRS ZUR GENERIERUNG NEUER SUBSTRATSPEZIFITÄT

Es konnte gezeigt werden, dass HA-Lysin **11** durch die *M. mazei* PylRS moderat akzeptiert und somit in den Translationsmechanismus eingebracht werden konnte. Des Weiteren ließ sich durch Punktmutationen in diesem Enzym eine neue Substratspezifität erzeugen, welche zur genetischen Kodierung der chemisch attraktiven Norbornen-Aminosäure **12** führte. Im nächsten Schritt wurde nun versucht, die Affinität der pyrrolysyl-tRNA Synthetase sowohl für **11** als auch für **12** durch gerichtete Evolution des aktiven Zentrums zu erhöhen. Eine Mutanten-Bibliothek der PylRS sollte daher erzeugt und mit Hilfe des YFP Expressions-Screenings, ausgeführt in 96 well-Platten, auf Einbau der unnatürlichen Aminosäuren getestet werden. Als Methode zur Generierung der Bibliothek wurde die Iterative Saturierungsmutagenese (ISM, siehe *Abschnitt 5.14.3*) gewählt.

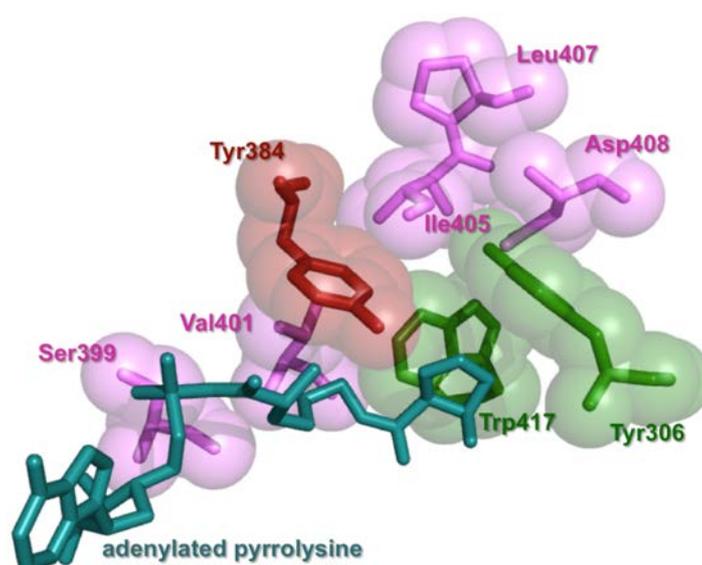


Abbildung 3.19: Aktives Zentrum der PylRS aus *M. mazei* im Komplex mit adenyliertem Pyrrolysin (PDB 2Q27H). Der Ausschnitt zeigt die für die ISM ausgesuchten Reste in rot, pink und grün (Asp408 und Ser399 ausgenommen).

Basierend auf der Co-Kristallstruktur der *M. mazei* PylRS mit adenyliertem Pyrrolysin (PDB 2Q27H),^[8] wurden fünf Reste im aktivem Zentrum des Proteins für die ISM ausgesucht, die bei der Substratbindung beteiligt sind (**Abbildung 3.19**). Tyr384 spielt eine besonders wichtige Rolle für die Substrataffinität, da es im natürlichen Substrat den Pyrrol-Rest erkennt und durch Substitution erreicht werden kann, dass ganz neue Lysin-Derivate erkannt werden. Zudem wurden für die nächsten Saturierungsschritte Tyr306 und Trp417 sowie Val401 und Ile405 ausgesucht. Insgesamt sollten sowohl für HA-Lysin **11** sowie für Norb-Lysin **12** diese fünf Reste in drei Zyklen saturiert werden. Die Saturierung der PylRS erfolgte auf dem Plasmid pTRP-Duet:MmpylS3T:mut¹yfp mittels NNK-degenerierter Primer und der QuikChange[®] bzw. MegaPrimer-Methode (siehe *Abschnitt 5.14.3*). Entsprechend der Anzahl der randomisierten Positionen wurden unterschiedlich große Bibliotheken im YFP Expressions-Screening getestet. Diese Arbeit wurde in den Laboren von *Prof. Dr. Manfred T. Reetz* am Max-Planck-Institut für Kohlenforschung (Mülheim a. d. Ruhr) durchgeführt.

Tabelle 3.3: Größe der getesteten Mutanten-Bibliotheken.

Zyklus	Position	NNK-Kombinationsmöglichkeiten	getestete Bibliothek
1	Tyr384	$4 \cdot 4 \cdot 2 = 32$	ca. 100 (1 x 96)
2	Tyr306/Trp417	$32 \cdot 32 = 1024$	ca. 1200 (12 x 96)
3	Val401/Ile405	$32 \cdot 32 = 1024$	1200-1400 (14 x 96)

3.5.9.1 NNK-Saturierung von Tyr384

Die Saturierung der Position Tyr384 erfolgte über die QuikChange[®] ortsgerechtere Mutagenese unter Verwendung NNK-degenerierter Primer. Der Erhalt des PCR-Produktes wurde über Agarosegelelektrophorese nachgewiesen. Die PCR-Reaktion wurde mit DpnI verdaut, über das QiaQuick PCR purification kit (*Qiagen*) gereinigt und in elektrokompente BL21(DE3)GOLD transformiert. Die gewünschte NNK-Degenerierung wurde durch Sequenzierung eines Plasmid-Gemisches mehrerer Kolonien bestätigt. Es wurden ca. 10^3 Kolonien pro Transformationsreaktion erhalten, welche somit die Mindestgröße der Bibliothek bei einer randomisierten Position ($4 \cdot 4 \cdot 2 = 32$) sicherstellte. Um alle Aminosäuren abzudecken wurde eine dreimal

größere Bibliothek auf Einbau der Aminosäure **11** bzw. **12** über das YFP Expressions-Screening getestet. Hierzu wurde eine 96-well Platte mit 93 Kolonien der Bibliothek und drei Kontroll-Kulturen (Zellen in A12-C12 produzierten Wildtyp-PylRS) inokuliert und über Nacht kultiviert. Für die YFP-Expression in Anwesenheit von HA- bzw. Norb-Lysin wurden jeweils 100 µL der Übernachtskulturen auf je eine 96-well Platte mit 2 mM **11** bzw. **12** kopiert. In der Negativ-Kontrolle A12 wurde weder eine unnatürliche Aminosäure noch IPTG hinzugegeben. In einer weiteren Kontrolle (B12) wurde keine unnatürliche Aminosäure, jedoch 1 mM IPTG hinzugefügt. In der Positiv-Kontrolle C12 wurde die Wildtyp-PylRS Kultur in Anwesenheit von 5 mM des Alkin-Lysins **4** getestet. Nach der YFP-Expression wurden die Zellen gewaschen und für die Fluoreszenzmessung am GENios *plate reader* (TECAN) in schwarze 96-well Mikrotiterplatten überführt.

Tabelle 3.4: Ergebnisse des Expressions-Assays mit der PylRS Tyr384NNK Bibliothek in Anwesenheit von 2 mM HA-Lysin. Die Zellen A12-C12 produzierten wt-PylRS. A12: - IPTG / - UAA; B12: + IPTG, - UAA; C12: + IPTG, + 5 mM Alkin-Lysin.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	66	21	31	21	16	26	38	32	41	23	28	54
B	126	41	56	193	56	33	35	202	54	182	37	36
C	27	41	39	29	55	23	78	34	44	36	26	3,809
D	54	24	56	256	53	233	67	239	50	230	54	58
E	40	43	21	22	21	35	40	52	49	55	33	45
F	27	53	146	30	136	220	34	45	52	34	88	78
G	40	34	23	25	98	21	106	54	26	36	80	34
H	28	10	24	73	58	49	51	30	52	53	55	16

Tabelle 3.5 Ergebnisse des Expressions-Assays mit der PylRS Tyr384NNK Bibliothek in Anwesenheit von 2 mM Norb-Lysin. Die Zellen A12-C12 produzierten wt-PylRS. A12: - IPTG / - UAA; B12: + IPTG, - UAA; C12: + IPTG, + 5 mM Alkin-Lysin.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	58	26	38	22	21	26	37	34	44	23	28	47
B	102	39	56	118	48	30	40	97	56	102	39	40
C	26	39	38	29	127	27	62	39	41	42	28	4,109
D	83	11	57	84	19	100	74	122	58	138	64	64
E	37	46	29	29	26	37	41	122	132	59	38	49
F	34	48	98	33	74	113	38	59	68	38	203	78
G	33	37	26	26	66	25	78	129	23	38	66	33
H	34	50	35	76	66	51	53	33	60	45	48	18

Die Ergebnisse der YFP-Expression durch die Tyr384NNK-Bibliothek in Anwesenheit von **11** bzw. **12** sind in **Tabelle 3.4** und **3.5** dargestellt. Die Zellen, welche keine

Aminosäure an die *Amber*-Position in 1 mut-YFP einbauen konnten, produzierten nur verkürztes Protein, welches nicht fluoresziert (Intensitäten von ca. 10 -40 a.u.). Wie erwartet, traf dies auf die Expressionskulturen in A12 und B12 zu, denen keine unnatürliche Aminosäure angeboten wurde. Da die Wildtyp-PylRS keine endogenen Aminosäuren akzeptiert, wurde in diesen Zellen kein Vollängen-YFP produziert. Die Positiv-Kontrolle in C12 fluoreszierte aufgrund des effizienten Einbaus von **4** in YFP sehr stark. Die Zugabe von **11** bzw. **12** führte bei ca. 80% der getesteten PylRS-Mutanten nicht zur Produktion von Vollängen-YFP. Die Emissionsintensität entsprach hier den der Negativkulturen und lag zwischen 10-50 a.u. (z. B. D2, E3 und B7 in **Tabelle 3.4**). In ca. 10% der Kolonien wurde eine PylRS-Mutante exprimiert, die eine geringe Affinität zu der angebotenen Aminosäure **11** bzw. **12** besaß. So betrug die Fluoreszenzintensität in den Kulturen H4 und F12 (**Tabelle 3.5**) ca. 80 a.u. Für beide unnatürlichen Aminosäuren konnten acht *Hits* ermittelt werden. Diese Mutanten produzierten aufgrund einer entsprechenden Substrataffinität zur angebotenen Aminosäure das Vollängen-YFP und somit ein Fluoreszenzsignal von über 100 a.u. Damit konnten sie von weniger effizienten PylRS-Mutanten unterschieden werden.

	1147		1199	384	399
a) Consensus	GTCTATGGGGATACCCTTGATGTAATGCACGGAGACCTGGAACCTTTCCTCTGC				
wt pylS	GTCTATGGGGATACCCTTGATGTAATGCACGGAGACCTGGAACCTTTCCTCTGC			Tyr	Ser
384NNK D08	GTCTATGGGGATACCCTTGATGTAATGCACGGAGACCTGGAACCTTTCCTCTGC			Tyr	Ser
384NNK D04	GTCTATGGGGATACCCTTGATGTAATGCACGGAGACCTGGAACCTTTCCTCTGC			Tyr	Ser
384NNK B08	GTCTATGGGGATACCCTTGATGTAATGCACGGAGACCTGGAACCTTTCCTCTGC			Tyr	Ser
384NNK D10	GTCTATGGGGATACCCTTGATGTAATGCACGGAGACCTGGAACCTTTCCTCTGC			Tyr	Ser
384NNK B10	GTCTATGGGGATACCCTTGATGTAATGCACGGAGACCTGGAACCTTTCCTTTCGC			Tyr	Phe
384NNK B04	GTCTATGGGGATACCCTTGATGTAATGCACGGAGACCTGGAACCTTTCCTCTGC			Tyr	Ser
384NNK F03	GTCTATGGGGATACCCTTGATGTAATGCACGGAGACCTGGAACCTTTCCTCTGC			Tyr	Ser
384NNK F06	GTCTATGGGGATACCCTTGATGTAATGCACGGAGACCTGGAACCTTTCCTTTCGC			Tyr	Phe
					+
	1147		1199	384	
b) Consensus	GTCTTTGGGGATACCCTTGATGTAATGCACGGAGACCTGGAACCTTTCCTCTGC				
wt pylS	GTCTATGGGGATACCCTTGATGTAATGCACGGAGACCTGGAACCTTTCCTCTGC			Tyr	
384NNK B04	GTCTATGGGGATACCCTTGATGTAATGCACGGAGACCTGGAACCTTTCCTCTGC			Tyr	
384NNK C05	GTCTTTGGGGATACCCTTGATGTAATGCACGGAGACCTGGAACCTTTCCTCTGC			Phe	
384NNK D08	GTCTATGGGGATACCCTTGATGTAATGCACGGAGACCTGGAACCTTTCCTCTGC			Tyr	
384NNK E08	GTCTTTGGGGATACCCTTGATGTAATGCACGGAGACCTGGAACCTTTCCTCTGC			Phe	
384NNK G08	GTCTTTGGGGATACCCTTGATGTAATGCACGGAGACCTGGAACCTTTCCTCTGC			Phe	
384NNK E09	GTCTTTGGGGATACCCTTGATGTAATGCACGGAGACCTGGAACCTTTCCTCTGC			Phe	
384NNK D10	GTCTATGGGGATACCCTTGATGTAATGCACGGAGACCTGGAACCTTTCCTCTGC			Tyr	
384NNK F11	GTCTTTGGGGATACCCTTGATGTAATGCACGGAGACCTGGAACCTTTCCTCTGC			Phe	
					+

Abbildung 3.20: Vergleich der wt-Sequenz und der Sequenzergebnisse der PylRS Tyr384NNK Hits für a) HA-Lysin und b) Norb-Lysin. Die saturierte Position 384 sowie die Position 399 sind grau hinterlegt. Die resultierenden Aminosäuren an diesen Positionen sind rechts aufgeführt (fett).

Die Sequenzierung der besten PylRS-Mutanten, welche die Norbornen- bzw. Hydroxylamin-Aminosäure besonders effizient einbauten, zeigten jeweils eine klare Präferenz für einen bestimmten Aminosäure-Rest an der Position 384 (**Abbildung 3.20**). Der Einbau der Norbornen-Aminosäure wurde in fünf von acht *Hits* (63%) durch die bereits bekannte und hier unabhängig reproduzierte Tyr384Phe-Mutante verbessert (**Abbildung 3.20 b**).^[6] In den übrigen *Hits* war keine Mutation des Tyr384 vorhanden. Die Ergebnisse der Sequenzierung der *Hits* für HA-Lysin sind in **Abbildung 3.20 a** dargestellt und identifizierten die Wildtyp-Aminosäure an Position 384 als bevorzugten Rest für den Einbau von **11** in Proteine. Aufgrund der Homogenität der Sequenzergebnisse, welche eine klare Präferenz für bestimmte Aminosäuren an Position 384 bewies, handelte es sich bei den detektierten Fluoreszenzsignalen demnach nicht um Artefakte. Somit war das hier angewendete YFP Expressions-*Screening* eine geeignete Methode für die gerichtete Evolution der PylRS.

Obwohl das YFP Expressions-*Screening* für HA-Lysin keine favorisierte Tyr384-Substitution ergab, handelte es sich bei den sequenzierten *Hits* teilweise um Mutanten. Die Sequenzierung führte zur Identifizierung der spontanen Mutation Ser399Phe. Diese Mutation im aktiven Zentrum des Enzyms wurde auch in späteren Saturierungszyklen (siehe *Abschnitt 3.5.9.2 und 3.5.9.3*) spontan generiert, war aber in den sequenzierten Templat-Plasmiden nicht vorhanden. Da die Substitution von Serin 399 zu Phenylalanin jedoch nicht zu einer erhöhten Substrataffinität zu den unnatürlichen Aminosäuren führte, wurden für die weitere Iterative Saturierungsmutagenese stets eine PylRS_{Ser399}-Variante als Templat verwendet.

Die *Hits* für HA-Lysin produzierten im Durchschnitt ein höheres Fluoreszenzsignal als solche für Norb-Lysin. Das höchste Fluoreszenzsignal wurde von der Wildtyp-PylRS unter Zugabe der Alkin-Aminosäure (C12) erzeugt. Vergleicht man die Fluoreszenzintensitäten unter Beachtung der Sequenzergebnisse, stellt sich eine große Abweichung der Fluoreszenzintensität bei gleicher Sequenz heraus. Die *Hits* F11 und G08 besaßen die gleiche Sequenz, zeigten jedoch in Anwesenheit von **12** unterschiedlich starke Fluoreszenz. Vermutlich wurde dies durch unterschiedliche Zelldichten in den einzelnen Kulturen verursacht. Die Positiv-Kontrolle in C12 war sehr dicht gewachsen, da sie im Gegensatz zu den anderen Kulturen nicht mit einer einzelnen Kolonie, sondern mit einer Glycerinkultur inokuliert worden war. Die

Ungenauigkeit der Messmethode könnte daher durch Ermittlung der Zelldichten und durch deren Einbeziehung in die Auswertung der Fluoreszenzintensitäten minimiert werden. Um jedoch das *Screening* für neue PylRS-Varianten so schnell und einfach wie möglich zu gestalten, wurden Unterschiede in den Zelldichten nicht näher quantifiziert. Stattdessen wurden die Grenzen für einen *Hit* mit einer größeren Abweichung definiert. In diesem ersten ISM-Zyklus wurden für Norb-Lysin alle Klone mit einer Fluoreszenzintensität >100 a.u. ausgewertet, während Intensitäten >200 a.u. als *Hit*-Kriterium für HA-Lysin definiert wurden. Auf diese Weise wurden jeweils genügend Klone sequenziert, um einen eventuell bevorzugten Rest an Position 384 der PylRS zu ermitteln.

3.5.9.2 NNK-Saturierung von Tyr306 und Trp417

Die Aminosäuren 306 und 417 der *M. mazei* PylRS wurden über die MegaPrimer-Methode in einer PCR-Reaktion saturiert. Hierzu wurde ein NNK-degenerierter *forward* Primer für die Position 306 in Kombination mit einem MNN-degenerierten *reverse* Primer für die Position 417 verwendet. Als Templat wurde für die Erstellung der zweiten Bibliothek für **11** das aus dem Klon D4 gereinigte Plasmid des ersten Saturierungszyklus eingesetzt. Das Plasmid, welches aus dem *Hit* F11 gewonnen wurde und eine Tyr384Phe-Mutante der PylRS kodierte, diente als Templat für die Erstellung der zweiten Bibliothek für **12**. Der Erfolg der MegaPrimer PCR wurde durch Agarosegelelektrophorese sichergestellt. Nach DpnI-Verdau der PCR-Reaktionen und anschließender Reinigung wurden diese separat in elektrokompetente BL21(DE3)GOLD-Zellen transformiert. Ein Plasmid-*Pool* aus vereinigten Einzelkolonien wurde zur Verifizierung der gewünschten NNK-Degenerität gereinigt und sequenziert. Demnach lag die gewünschte NNK-Degenerität für die Position 306 vor, an der Position 417 war jedoch eine Tendenz für eine NNT-Degenerität erkennbar. In der Theorie würde eine NNT-Degenerität an Position 417 eine Bibliothek der Größe $(4 \cdot 4 \cdot 2) \cdot (4 \cdot 4 \cdot 1) = 32 \cdot 16 = 512$ erforderlich machen, um alle möglichen Codon-Kombinationen abzudecken. Diese Kombinationen deckten aber nicht alle 20 Aminosäuren an der Position 417 ab. Eine Abweichung von der gewünschten Degenerität wird in der Regel durch unterschiedliche Kupplungseffizienzen der eingesetzten Phosphoramidit-Bausteine während der Primer-Synthese verursacht. So könnte eine bessere Kupplung des Thymidin- gegenüber dem konkurrierenden Guanidin-Phosphoramidit an der K-

Position des Primers ursächlich für die Präferenz von T sein. Als Konsequenz lag das *reverse* Primer-Gemisch in der MegaPrimer PCR nicht im gewünschten T:G-Verhältnis vor. Es handelte sich jedoch nicht um eine vollständige Verschiebung des T:G-Verhältnisses zugunsten von T. Daher wurde versucht, durch Testen einer größeren Bibliothek (*oversampling*) alle möglichen Aminosäuren an Position 417 abzudecken. Dies wurde durch eine sehr gute Transformationseffizienz ermöglicht, welche bei $>10^3$ Klonen pro Transformationsreaktion lag und damit höher als die benötigten $32 \cdot 32 = 1024$ Klone. Es wurden für die unnatürlichen Aminosäuren **11** und **12** jeweils zwölf 96-*well* Platten wie oben beschrieben inokuliert und im YFP Expressions-*Screening* eingesetzt. Die Ergebnisse des zweiten ISM-Zyklus sind im *Anhang* in **Tabelle 8.2** und **Tabelle 8.3** dargestellt. Wie schon im ersten Zyklus beobachtet, akzeptierte die Mehrheit der getesteten PyIRS-Mutanten nicht die angebotene unnatürliche Aminosäure. Die entsprechenden Zellen produzierten daher keine Fluoreszenz (0-50 a.u.). In ca. 5% der Zellen konnte eine niedrige Fluoreszenzintensität detektiert werden (80-100 a.u.), während 8% der Klone keine Verbesserung der Substraterkennung im Vergleich zum Ausgangsklon hatten. Im Durchschnitt konnte ein *Hit* pro 96-*well* Platte identifiziert werden, deren YFP-Fluoreszenzintensitäten bei 300 bis 1000 a.u. lagen (blau hinterlegte Felder). Die Plasmide wurden aus den Kulturen mit einer Fluoreszenzintensität >400 isoliert und sequenziert. Wie schon für die Sequenzergebnisse der Tyr384NNK-Saturierung wurden auch in diesen *Hits* bevorzugte Reste für einen verbesserten Einbau von **11** bzw. **12** ermittelt (**Abbildung 3.21**).

	906	927.....1241	1262	306	417
a) Consensus	TCCAAACCTTGC	GAACCTACCTG.....	ATAAACCC	TGGATAGGGGCAGG	
wt-pylS	TCCAAACCTTTACA	AACTACCTG.....	ATAAACCC	TGGATAGGGGCAGG	Tyr Trp
HI A5	TCCAAACCTTGC	TAACTACCTG.....	ATAAACCC	TGGATAGGGGCAGG	Ala Trp
HII C7	TCCAAACCTTGC	TAACTACCTG.....	ATAAACCC	TGGATAGGGGCAGG	Ala Trp
HII F9	TCCAAACCTTGC	GAACTACCTG.....	ATAAACCC	TGGATAGGGGCAGG	Ala Trp
HIII E10	TCCAAACCTTTACA	AACTACCTG.....	ATAAACCC	TGGATAGGGGCAGG	Tyr Trp
HXII H2	TCCAAACCTTTACA	AACTACCTG.....	ATAAACCC	TGGATAGGGGCAGG	Tyr Trp
HV C3	TCCAAACCTTGC	GAACTACCTG.....	ATAAACCC	TGGATAGGGGCAGG	Ala Trp
HVI B5	TCCAAACCTTTGT	AACCTACCTG.....	ATAAACCC	TGGATAGGGGCAGG	Cys Trp
HVII H2	TCCAAACCTTGC	GAACTACCTG.....	ATAAACCC	TGGATAGGGGCAGG	Ala Trp
HIX D2	TCCAAACCTTTACA	AACTACCTG.....	ATAAACCC	TGGATAGGGGCAGG	Tyr Trp
HIX F6	TCCAAACCTTGC	GAACTACCTG.....	ATAAACCC	TGGATAGGGGCAGG	Ala Trp
HX C2	TCCAAACCTTTACA	AACTACCTG.....	ATAAACCC	TGGATAGGGGCAGG	Tyr Trp
HX D11	TCCAAACCTTGC	GAACTACCTG.....	ATAAACCC	TGGATAGGGGCAGG	Ala Trp
HX G11	TCCAAACCTTGC	TAACTACCTG.....	ATAAACCC	TGGATAGGGGCAGG	Ala Trp
HXI G3	TCCAAACCTTTACA	AACTACCTG.....	ATAAACCC	TGGATAGGGGCAGG	Tyr Trp
HXII H2	TCCAAACCTTGC	GAACTACCTG.....	ATAAACCC	TGGATAGGGGCAGG	Ala Trp
	+++				
b) Consensus	TCCAAACCTTGG	GAACTACCTG.....	ATAAACCC	TGGATAGGGGCAGG	
wt-pylS	TCCAAACCTTTACA	AACTACCTG.....	ATAAACCC	TGGATAGGGGCAGG	Tyr Trp
NI G1	TCCAAACCTTGG	GAACTACCTG.....	ATAAACCC	TGGATAGGGGCAGG	Gly Trp
NI A10	TCCAAACCTTGG	GAACTACCTG.....	ATAAACCC	TGGATAGGGGCAGG	Gly Trp
NII B8	TCCAAACCTTGG	GAACTACCTG.....	ATAAACCC	TGGATAGGGGCAGG	Gly Trp
NIII H8	TCCAAACCTTGG	TAACTACCTG.....	ATAAACCC	TGGATAGGGGCAGG	Gly Trp
NV H7	TCCAAACCTTGG	GAACTACCTG.....	ATAAACCC	TGGATAGGGGCAGG	Gly Trp
NVI B4	TCCAAACCTTGG	GAACTACCTG.....	ATAAACCC	TGGATAGGGGCAGG	Gly Trp
NVI E2	TCCAAACCTTGG	GAACTACCTG.....	ATAAACCC	CAGATAGGGGCAGG	Gly Trp
NVII C2	TCCAAACCTTTGG	AACTACCTG.....	ATAAACCC	CAAGATAGGGGCAGG	Gly Trp
NIX C9	TCCAAACCTTGG	GAACTACCTG.....	ATAAACCC	TGGATAGGGGCAGG	Gly Trp
NXI C2	TCCAAACCTTGG	GAACTACCTG.....	ATAAACCC	TGGATAGGGGCAGG	Gly Trp
NXI G1	TCCAAACCTTGG	GAACTACCTG.....	ATAAACCC	TGGATAGGGGCAGG	Gly Trp
NXI E6	TCCAAACCTTGG	TAACTACCTG.....	ATAAACCC	TGGATAGGGGCAGG	Gly Trp
	+++		++		

Abbildung 3.21: Vergleich der wt-Sequenz und der Sequenzergebnisse der PylRS Tyr306NNK Trp417NNK Hits für a) HA-Lysin und b) Norb-Lysin. Die saturierten Positionen 306 und 417 sind grau hinterlegt. Die resultierenden Aminosäuren an diesen Positionen sind rechts aufgeführt (fett).

Die Aminosäure Trp417 in der PylRS wurde in keinen der *Hits* ausgetauscht, was auf eine bereits optimierte Besetzung im Wildtyp-Enzym für Lysin-Derivate schließen ließ. Hingegen wurde Tyr306 sowohl für **11** als auch für **12** bevorzugt durch einen kleinen, unpolaren Rest ausgetauscht. Für Norb-Lysin war stets die Substitution zu Glycin verantwortlich für den verbesserten Einbau, während der Einbau von HA-Lysin zu 60% durch eine Alanin-Substitution begünstigt wurde. Eine Tyr306Cys-Substitution konnte zwar ebenfalls nachgewiesen werden, die entsprechende Expressionskultur produzierte jedoch das schwächste Fluoreszenzsignal aus den sequenzierten *Hits*. Da sich die Aminosäure 306 am Zugang zum aktiven Zentrum

der PyIRS befindet, war vermutlich eine verbesserte Aufnahme der Aminosäuren in das Enzym Ursache für deren effizienteren Einbau in Proteine.

Aus diesem zweiten ISM-Zyklus konnten PyIRS-Varianten gewonnen werden, die einen verbesserten Einbau der unnatürlichen Aminosäuren in Proteine ermöglichten. Für die Erkennung von Norb-Lysin war diese eine PyIRS-Tyr384Phe-Tyr306Gly-Mutante (N-IX C9), wohingegen HA-Lysin am effizientesten durch PyIRS-Tyr306Ala (H-V C3) in die Translation eingebracht wurde.

3.5.9.3 NNK-Saturierung von Ile401 und Val405

Die NNK-Saturierung der Reste 401 und 405 zur Evolvierung einer AaRS für HA-Lysin wurde mit der QuikChange[®]-Methode durchgeführt. Die PCR erfolgte auf dem Plasmid H-V C3 des zweiten ISM-Zyklus unter Verwendung der NNK-degenerierten Primer für die Positionen 401 und 405. Da unterschiedliche QuikChange[®]-PCR Ansätze nicht das gewünschte PCR-Produkt für die dritte Norb-Lysin Bibliothek lieferten, wurde alternativ die MegaPrimer-Methode angewendet. Mittels des NNK-degenerierten *forward* Primers für die Positionen 401/405 und dem Sequenzier-Primer *DuetDown1 rv* wurde diese auf dem Plasmid N-IX C9 durchgeführt und führte zum gewünschten PCR-Produkt. Nach DpnI-Verdau, Reinigung und Transformation in elektrokompente BL21(DE3)GOLD wurde die Transformationseffizienz mit 10^3 Klonen pro Transformationsreaktion bestimmt. Nach Bestätigung der NNK-Degenerität für die Positionen 401 und 405, wurde das YFP Expressions-Screening in zwölf 96-well Platten zunächst für die Hydroxylamin-Aminosäure durchgeführt (siehe **Tabelle 8.4, Anhang**). Da durch Ungenauigkeit des automatisierten Kolonien Sammlers nicht alle Flüssigkulturen angeimpft wurden, konnten aus einigen *wells* keine Daten gewonnen werden. Um für Norb-Lysin eine höhere Toleranz für derartige Verluste zu gewährleisten, wurde die Größe der Bibliothek von zwölf auf 14 96-well Platten erhöht. Die Genauigkeit des automatisierten Kolonien Sammlers war in dieser Bibliothek sehr gut, so dass fast alle Flüssigkulturen angeimpft wurden. Zusätzlich zu den Klonen der beiden Bibliotheken wurden auch positive und negative Kontrollen getestet. Diese befanden sich für die Aminosäure **11** in den Platten I und VII und für **12** in den Platten I und VIII. In diesen Platten produzierten die Kulturen A12 und B12 die Wildtyp-PyIRS, C12 und D12 die *Hits* aus der NNK-Saturierung von Tyr384, sowie E12-H12 die *Hits* aus der NNK-Saturierung von Tyr306 und Trp417. In

die Kulturen A12 und E12 wurde keine unnatürliche Aminosäure hinzugegeben, während B12 und F12 mit 5 mM Alkin-Aminosäure versetzt wurden. Alle anderen Kulturen in der Spalte 12 wurden in Anwesenheit von 2 mM **11** bzw. **12** kultiviert. Die Fluoreszenz der Kontroll-Kulturen in F12 zeigten, dass die PylRS-Mutanten ihre Spezifität für die Alkin-Aminosäure beibehalten hatten. Die Kontrollkulturen A12 und E12 besaßen keine Fluoreszenz. Somit waren die bisher generierten PylRS-Mutanten nicht in der Lage, endogene Aminosäuren zu akzeptieren und erfüllten somit ein Hauptkriterium zur Generierung neuer orthogonaler tRNA/AaRS-Paare. Die verbesserten Substrataffinitäten, erzeugt durch die ersten beiden ISM-Zyklen, wird durch Vergleich der Fluoreszenzintensitäten von C12 und D12 mit G12 und H12 deutlich. Die Hits des ersten ISM-Zyklus produzierten YFP-Signale mit Intensitäten von 100-200 a.u., während dieses in den Hits des zweiten Zyklus dreimal höher vorlag. Ziel war es, in der nun vorliegenden Bibliothek optimierte Reste für die Positionen 401 und 405 zu identifizieren, die eine noch bessere Substrataffinität für **11** bzw. **12** lieferten. Es konnten in beiden Bibliotheken höhere Fluoreszenzsignale detektiert werden (siehe **Tabelle 8.5, Anhang**), jedoch war die Zunahme der Signale nicht so hoch wie in den ersten beiden Zyklen. Dies könnte eine Eigenschaft der PylRS-Reste sein, welche jeweils optimiert wurden. In den ersten beiden Zyklen wurden die Reste saturiert, welche die Aufnahmeeffizienz (Rest 306) und Substratspezifität (Rest 384) sehr stark beeinflussten. Die Reste 401 und 405 veränderten folglich die Aktivität der PylRS in geringerem Maße oder waren für die globale Aktivität dieses Enzyms bereits natürlich optimiert.

	1190	1242	401	405
a) Consensus	TTTCCTCTGCAGTAGTCGGACCCATACCGCTTGACCGGGAATGGGGTATTGAT			
wt-pylS	TTTCCTCTGCAGTAGTCGGACCCATACCGCTTGACCGGGAATGGGGTATTGAT		Val	Ile
HI A3	TTTCCTCTGCAGTAGTCGGACCCATACCGCTTGACCGGGAATGGGGTATTGAT		Val	Ile
HI C7	TTTCCTCTGCAGTTGTCGGACCCAAGCCGCTTGACCGGGAATGGGGTATTGAT		Val	Lys
HI A8	TTTCCTTTGCAGTAGTCGGACCCATACCGCTTGACCGGGAATGGGGTATTGAT		Val	Ile
HI B11	TTTCCTCTGCAGTAGTCGGACCCATACCGCTTGACCGGGAATGGGGTATTGAT		Val	Ile
HIII B7	TTTCCTCTGCAGTAGTCGGACCCATACCGCTTGACCGGGAATGGGGTATTGAT		Val	Ile
HV F3	TTTCCTCTGCAGTAGTCGGACCCATACCGCTTGACCGGGAATGGGGTATTGAT		Val	Ile
HVI H4	TTTCCTCTGCAGTTGTCGGACCCAAGCCGCTTGACCGGGAATGGGGTATTGAT		Val	Lys
HIX F6	TTTCCTCTGCAGTTGTCGGACCCAAGCCGCTTGACCGGGAATGGGGTATTGAT		Val	Lys
HIX H6	TTTCCTTTGCAGTGGTCGGACCCATACCGCTTGACCGGGAATGGGGTATTGAT		Val	Lys
HXI D10	TTTCCTCTGCAGTAGTCGGACCCATACCGCTTGACCGGGAATGGGGTATTGAT		Val	Ile
	+ + +++			
b) Consensus	1190	1242	401	405
wt-pylS	TTTCCTCTGCAGTAGTCGGACCCATACCGCTTGACCGGGAATGGGGTATTGAT		Val	Ile
NIII D4	TTTCCTCTGCAGTGGTCGGACCCCGTCCGCTTGACCGGGAATGGGGTATTGAT		Val	Arg
NIII H11	TTTCCTCTGCAGTTGTCGGACCCGTCCGCTTGACCGGGAATGGGGTATTGAT		Val	Leu
NIII E12	TTTCCTCTGCAGTGGTCGGACCCGTCCGCTTGACCGGGAATGGGGTATTGAT		Val	Leu
NVIII D8	TTTCCTCTGCAGTTGTCGGACCCCGCCGCTTGACCGGGAATGGGGTATTGAT		Val	Arg
NVIII E8	TTTCCTCTGCAGTTGTCGGACCCAGCCGCTTGACCGGGAATGGGGTATTGAT		Val	Arg
NVIII C9	TTTCCTCTGCAGTAGTCGGACCCGTCCGCTTGACCGGGAATGGGGTATTGAT		Val	Cys
NIX B1	TTTCCTCTGCAGTGGTCGGACCCGTCCGCTTGACCGGGAATGGGGTATTGAT		Val	Trp
NIX E3	TTTCCTCTGCAGTGGTCGGACCCGTCCGCTTGACCGGGAATGGGGTATTGAT		Val	Leu
NIX C5	TTTCCTCTGCAGTTGTCGGACCCGTCCGCTTGACCGGGAATGGGGTATTGAT		Val	Trp
NIX E5	TTTCCTCTGCAGTGGTCGGACCCGTCCGCTTGACCGGGAATGGGGTATTGAT		Val	Trp
NIX D8	TTTCCTCTGCAGTAGTCGGACCCATACCGCTTGACCGGGAATGGGGTATTGAT		Val	Ile
NIX G9	TTTCCTCTGCAGTGGTCGGACCCAAGCCGCTTGACCGGGAATGGGGTATTGAT		Val	Lys
NIX C11	TTTCCTCTGCAGTAGTCGGACCCATACCGCTTGACCGGGAATGGGGTATTGAT		Val	Ile
NX B4	TTTCCTCTGCAGTAGTCGGACCCGTCCGCTTGACCGGGAATGGGGTATTGAT		Val	Leu
	+ +++			

Abbildung 3.22: Vergleich der wt-Sequenz und der Sequenzergebnisse der PyIRS Tyr306NNK Trp417NNK Hits für a) HA-Lysin und b) Norb-Lysin. Die saturierten Positionen 306 und 417 sind grau hinterlegt. Die resultierenden Aminosäuren an diesen Positionen sind rechts aufgeführt (fett).

Die Klone mit den höchsten Fluoreszenzintensitäten wurden sequenziert (**Abbildung 3.22**). Während diese keine Substitution an der Position 401 besaßen, konnte für HA-Lysin eine begünstigende Ile401Lys-Substitution detektiert werden. Die Mutation konnte in 60% der sequenzierten Klone nachgewiesen werden, während die übrigen *Hits* weiterhin Isoleucin an Position 401 besaßen. Aus den Sequenzergebnissen von 14 identifizierten *Hits* der Norb-Lysin Bibliothek war keine eindeutige Präferenz für die Position 401 erkennbar. Jedoch besaßen die Klone, welche die höchste Fluoreszenzintensitäten hatten, häufig eine Substitution hin zu den basischen Aminosäuren Lysin oder Arginin. Da die Arginin-Substitution öfter vertreten war, wurde diese Mutation für die weiterführenden Studien des Pyrrolysin-Systems in Kombination mit Norbornenen verwendet.

Nach drei Zyklen Iterativer Saturierungsmutagenese der PylRS konnte für den Einbau von Norb-Lysin **12** die PylRS-Tyr384Phe-Tyr306Gly-Ile401Arg-Mutante generiert werden. Die Aminosäure **12** wurde wie beschrieben nicht durch die Wildtyp-Variante des Proteins erkannt.

Die gewonnene Mutante PylRS-Tyr306Ala-Ile401Lys hingegen besaß eine um den Faktor vier höhere Affinität zum HA-Lysin **11** im Vergleich zum Wildtyp-Protein. Damit wurden zusammenfassend zwei PylRS-Enzyme erzeugt, die jeweils **12** bzw. **11** effizient erkannten.

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit galt das besondere Interesse der Kodierung von Norbornenen in Proteine und deren bioorthogonale Modifizierung. Dies lag insbesondere an der durch den Arbeitskreis *Carell* entwickelten Methoden zur bioorthogonalen Modifizierung von Norbornenen in DNA-Molekülen und sollte nun auf die wichtige Biomolekül-Klasse der Proteine übertragen werden.

3.5.10 EINBAU VON NORB-LYSIN IN DIE *HUMANE* POLYMERASE κ

Nachdem der Einbau von Norb-Lysin in Proteine durch gerichtete Evolution der pyrrolysyl-tRNA Synthetase aus *M. mazei* ermöglicht worden war, sollte dessen bioorthogonale Funktionalisierung in Proteinen erforscht werden. Hierzu wurde eine verkürzte Version der *humanen* Polymerase κ (*hPolk*) gewählt, welche das aktive Zentrum mit den Aminosäuren 19-526 umfasst. Polymerase κ ist ein Mitglied der Y-Familie der Polymerasen und als solche für das Überlesen von DNA-Schäden, wie 8-oxoG oder Cyclobutanpyrimidin-Dimere, verantwortlich.^[196-200] Eine Vielzahl an Forschungsgruppen beschäftigt sich mit ihrer biochemischen sowie strukturellen Charakterisierung.^[196-200] Ziel dieser Arbeit war es, an einem sensitiven, humanen Protein den Beweis zu erbringen, dass Kupfer-freie Click-Reaktionen an Norbornenen unter physiologischen und nicht-denaturierenden Bedingungen möglich sind. Bei der Wahl der Reaktionsbedingungen wurde daher auf einen physiologischen pH-Wert, niedrige Temperaturen und kurze Reaktionszeiten geachtet. Diese sollten den Erhalt der Proteinstruktur und Enzymaktivität gewährleisten. Durch Primerverlängerungs-Studien sollte im Anschluss die Enzymaktivität untersucht werden.

hPolk wurde von *Dr. Stephanie Schorr* und *Christian Deiml* standardmäßig mit einer Ausbeute von ca. 50 mg/L Expressionskultur rekombinant hergestellt. Hierzu wurde das Plasmid pPSG-IBA33:*hpolk* in BL21(DE3)-Zellen transformiert und in Autoinduktionsmedium (siehe *Abschnitt 5.9*) heterolog exprimiert. Die Aufreinigung erfolgte zunächst über eine Ni-NTA-Affinitätschromatographie, da das rekombinante Protein über einen C-terminalen His₆-Tag verfügt. Ein zweiter Reinigungsschritt erfolgte mittels einer Heparin-Ionenaustauscher Chromatographie, wobei die verwendeten *Heparin-Puffer A* und *B* (pH 7.4) kein DTT enthielten. Die Reinheit des Proteins wurde über SDS-PAGE bestimmt und bei Bedarf durch eine Gelfiltrationschromatographie in *Heparin-Puffer A* pH 7.4 (ohne DTT) weiter erhöht. Für den Einbau der unnatürlichen Aminosäure Norb-Lysin wurde das entsprechende Plasmid pPSG-IBA33:*hpolk*_{Gln163Amber} mit dem für das Norb-Lysin System kodierende Plasmid pACYC-pGLN:norS3T in BL21(DE3)-Zellen co-transformiert und unter den gleichen Bedingungen wie das Wildtyp-Protein, jedoch in Anwesenheit von 2 mM Norb-Lys, hergestellt (**Abbildung 3.23**). Die Protein-Ausbeute durch die *Amber*-Suppression nach der dreistufigen Reinigung betrug ca. 2 mg/L Expressionskultur und war somit um einen Faktor von 25 geringer als die des Wildtyp-Proteins. Die gereinigten Proteinmengen waren jedoch für die durchzuführenden Untersuchungen zur bioorthogonalen Modifizierung ausreichend.

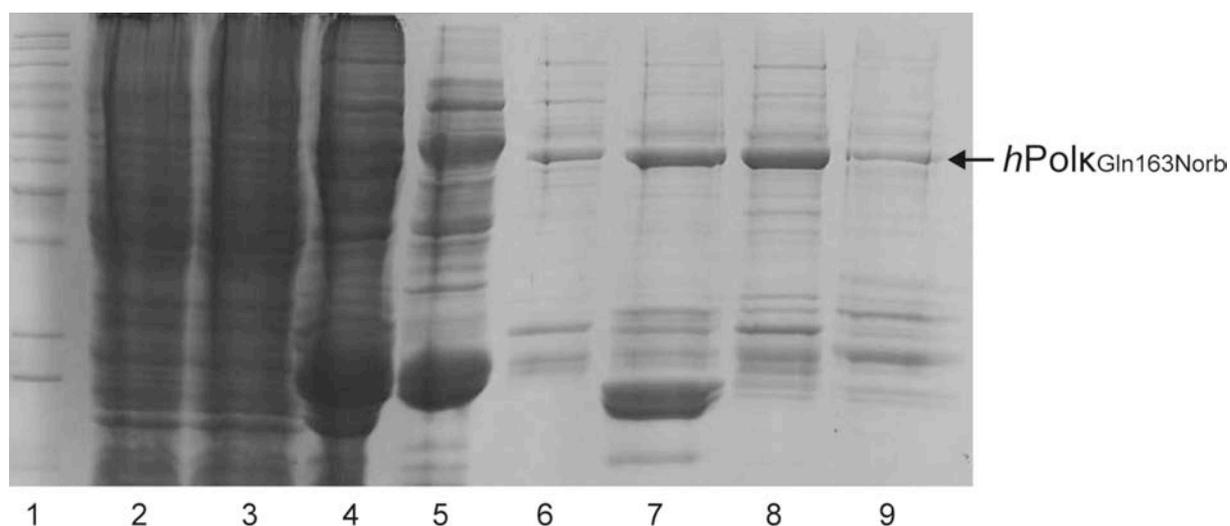
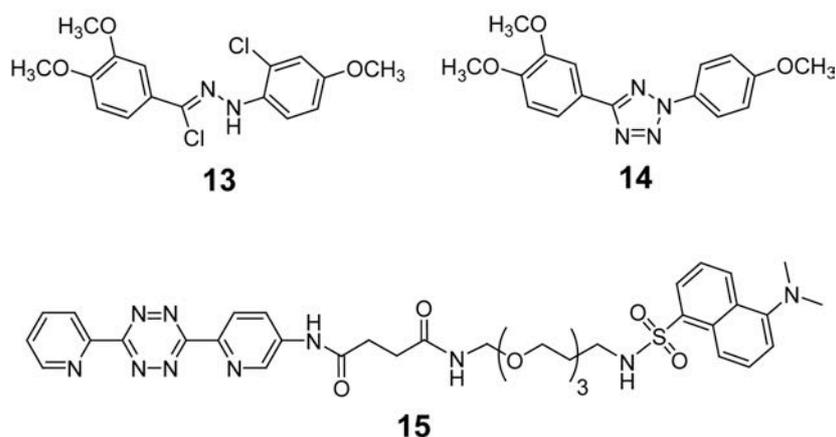


Abbildung 3.23: SDS-PAGE zur Aufreinigung von *hPolk*_{Gln163Norb}. Spur 1: PageRuler Unstained Protein Ladder (*Fermentas*); 2: Zellysät; 3: Durchfluss der Ni-NTA Chromatographie; 4: Eluat der Ni-NTA Chromatographie; 5: Durchfluss der Heparin Chromatographie; 6-9: eluierte Fraktionen der Heparin Chromatographie.

3.5.11 BIOORTHOGONALE MODIFIZIERUNG VON GENETISCH KODIERTEN NORBORNELEN IN PROTEINEN

Die in $hPolK_{Gln163Norb}$ eingebrachte Norbornen-Funktionalität diente im Anschluss als Reaktionspartner für die selektive und ortsspezifische Modifizierung des Proteins unter physiologischen Bedingungen und unter Ausschluss von Kupfer(I).



Schema 3.16: Strukturen des Hydrazonoylchlorid-Derivats 13, des Tetrazol-Derivats 14 sowie des Tetrazin-Derivats 15. Die dargestellten Moleküle wurden für die Fluoreszenzmarkierung von Norbornenen in Proteine unter Kupfer-freien Reaktionsbedingungen verwendet.

Nitriloxide, welche mit Norbornenen in einer dipolaren Cycloaddition reagieren können, sind aufgrund ihrer unspezifischen Reaktivität mit natürlichen Proteinresten (siehe *Abschnitt 3.5.7*) nicht geeignet. Stattdessen wurden Nitrilimin-Derivate getestet. Diese reagieren ebenfalls in einer schnell ablaufenden 1,3-dipolaren Cycloaddition mit Norbornenen. Wir vermuteten aber, dass sie aufgrund ihrer schwächeren Elektrophilie die unerwünschte Reaktion mit primären Aminen nicht eingehen würden. Um dies zu untersuchen, synthetisierte *Dr. Milan Vrabel* das Hydrazonoylchlorid-Derivat **13**. In einer anderen Studie sollten Nitrilimine in einer photochemischen Reaktion aus Tetrazolen gewonnen^[188] und in der Click-Reaktion mit dem Norbornen-Rest eingesetzt werden. Bei dieser Reaktion sollte das Nitrilimin durch UV-Belichtung (302 nm) des Tetrazol-Derivats **14** unter Abspaltung von Stickstoff generiert werden. Die aus dem Hydrazonoylchlorid **13** und dem Tetrazol **14** generierten Nitrilimin-Derivate bildeten mit Norbornenen fluoreszierende Produkte, welche mit UV-Licht angeregt werden konnten. Dies sollte eine einfache Detektion der gewünschten Reaktionen ermöglichen. Eine dritte Möglichkeit um den genetisch kodierten Norbornen-Rest chemisch zu adressieren, bestand in der Reaktion mit

Tetrazinen in einer inversen hetero-Diels-Alder Reaktion. Das fluoreszierendes Tetrazin-Derivat **15** wurde von *Stefan Prill* synthetisiert und sollte ebenfalls einen leichten Nachweis der Reaktion über Fluoreszenzdetektion ermöglichen. Die Strukturen der Liganden **13-15** sind in **Schema 3.16** aufgeführt.

Die Modifizierungsreaktionen an $hPolk_{Gln163Norb}$ erfolgten in *Polk-Reaktionspuffer* (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 1 mM EDTA, 450 mM NaCl und 5 % Glycerin). Um unerwünschte Nebenreaktionen auszuschließen wurde $hPolk$, welches nicht über das *Amber*-kodierte Norb-Lysin verfügte, rekombinant hergestellt, gereinigt und ebenfalls in den Click-Reaktionen getestet. Hierzu wurden zu einer 100 μ M Proteinlösung je 100 eq der Verbindungen **13-15** hinzugegeben und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Für die photoinduzierte Click-Reaktion mit **14** wurde das Reaktionsgemisch zuvor für 10 min mit einer UV-Handlampe bestrahlt. Die Reaktionen wurden ohne weitere Aufreinigung über SDS-PAGE getrennt. Die Fluoreszenzaufnahmen der aufgetrennten Click-Reaktionen (siehe **Abbildung 3.24**) zeigten in keinen Fällen eine Reaktion mit dem natürlichen Protein $hPolk$ (Spuren 1, 3 und 5), während in allen Fällen die Reaktion mit $hPolk_{Gln163Norb}$ nachgewiesen werden konnte (Spuren 2, 4 und 6).

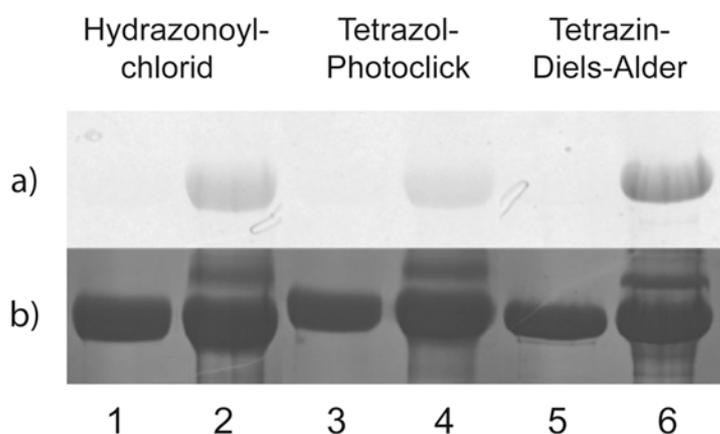


Abbildung 3.24: a) Fluoreszenzaufnahme und b) Coomassie-Färbung der aufgetrennten Click-Reaktionen an $hPolk$ (Spuren 1, 3 und 5) und $hPolk_{Gln163Norb}$ (Spuren 2, 5 und 6). Spuren 1 und 2: Clickprodukt + **13**; Spuren 3 und 4: Clickprodukt + **14**; Spuren 5 und 6: Clickprodukt + **15**.

Zur weiteren Analyse der Click-Reaktionen wurden die Proteinbanden im Gel tryptisch verdaut und über hochauflösende nano-HPLC MS/MS aufgetrennt. Diese Ergebnisse zeigten nicht nur den Einbau von Norb-Lysin im gewünschten Sequenzkontext (siehe **Abbildung 3.25**). Vielmehr konnte nachgewiesen werden,

dass die selektive Derivatisierung dieser Aminosäure sowohl durch die Nitrilimin-Derivate, als auch durch die inverse hetero-Diels-Alder Reaktion mit Tetrazinen möglich war. Für die Behandlung mit dem Hydrazonoylchlorid-Derivat **13** war die theoretische Masse $m/z_{\text{calc.}} = 2031.06$ für das Peptid $\text{LCPX}^1\text{LIIVPPNFDK}$ (mit X^1 als Produkt aus der Reaktion mit **13**) zu erwarten. Diese Masse stimmte sehr gut mit dem gefundenen Wert von $m/z_{\text{gefunden}} = 2031.10$ überein. Des Weiteren konnten, wie in **Abbildung 3.25** gezeigt, durch MS-Sequenzierung dieses Peptids die kritischen B- und Y-Ionen gefunden werden. Die Ergebnisse der nano-HPLC MS/MS Analyse für die Modifizierungsreaktionen **14** und **15** waren vergleichbar und bewiesen auch hier die ortsspezifische und selektive Adressierung der Norbornen-Aminosäure (siehe **Abbildungen 8.4 - 8.7, Anhang**).

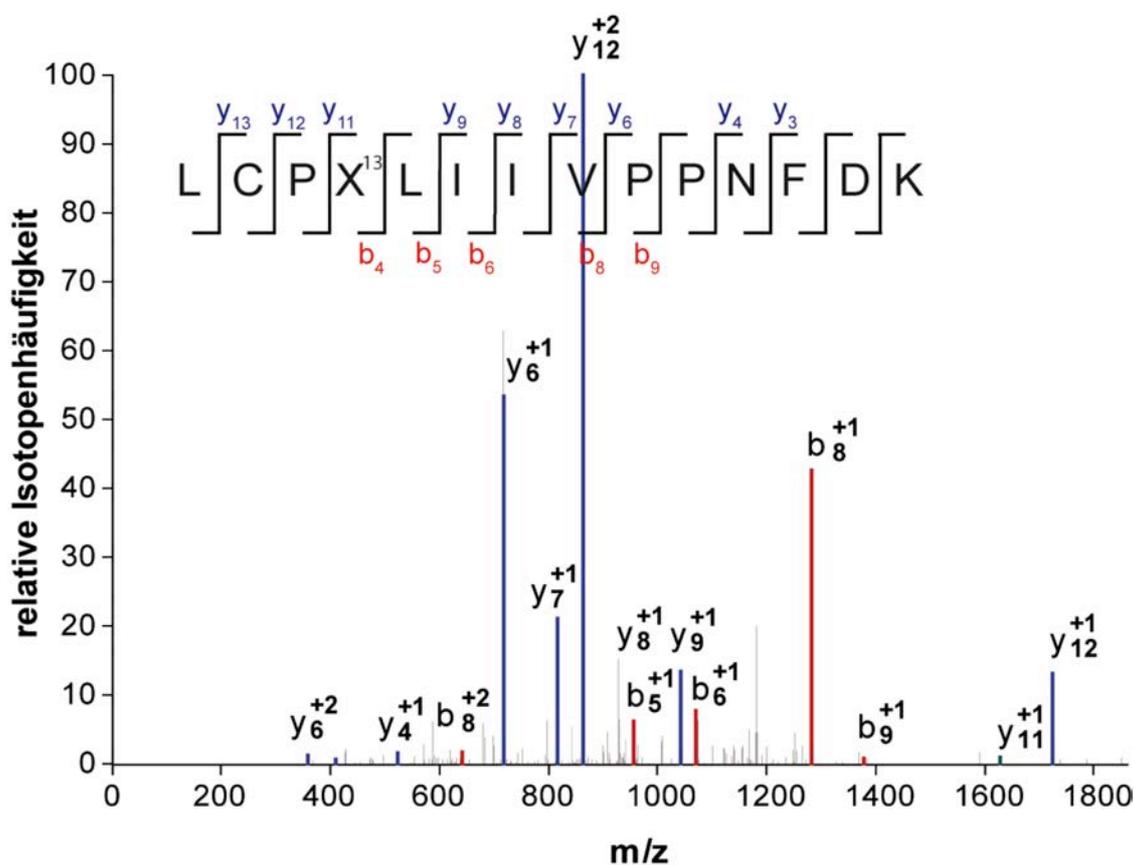


Abbildung 3.25: MS/MS Spektrum des Peptids LCPX¹LIIVPPNFDK. Dieses wurde durch tryptischen Verdau von $h\text{Polk}_{\text{Gln163Norb}}$ nach Click-Reaktion mit **13** generiert (X^{13} ist die Position des Hydrazonoylchlorid-modifizierten Norb-Lysins).

3.5.12 AKTIVITÄTSBESTIMMUNG DER CLICK-MODIFIZIERTEN *hPOLK*_{Gln163NorB}

Um zu beweisen, dass die Kupfer-freien Click-Reaktionen am Norbronrest die Proteinstruktur nicht angriffen und somit die Aktivität des Enzyms nicht beeinträchtigten, wurde die Aktivität der Polymerase in Primerverlängerungs-Studien bestimmt. Hierbei wurden die entsprechenden Click-Reaktionen mit **13**, **14** und **15** an *hPolk*_{Gln163NorB} durchgeführt und die resultierenden Click-Produkte anschließend in Primerverlängerungs-Reaktionen getestet. Diese wurden mit der Aktivität der unmodifizierten *hPolk*_{Gln163NorB} und der Wildtyp-Polymerase verglichen. Modifizierte und nicht-modifizierte *hPolk*_{Gln163NorB}-Varianten wurden in den Konzentrationen 1 μ M, 0.5 μ M und 0.1 μ M zur Reaktionslösung gegeben. Die Wildtyp-Polymerase, die voraussichtlich die maximale Aktivität besaß, wurde in der niedrigsten Konzentration von 0.1 μ M in der Reaktion eingesetzt. Die Reaktionslösung bestand aus einem 30-mer DNA-Templat, einem Fluoreszenz markierten 13-mer Primer sowie allen dNTPs. Die Primerverlängerungs-Reaktion wurde nach 30 min bei 37 °C durch Zugabe von Urea-Auftragspuffer gestoppt und über ein 20%-iges denaturierendes Polyacrylamidgel getrennt.

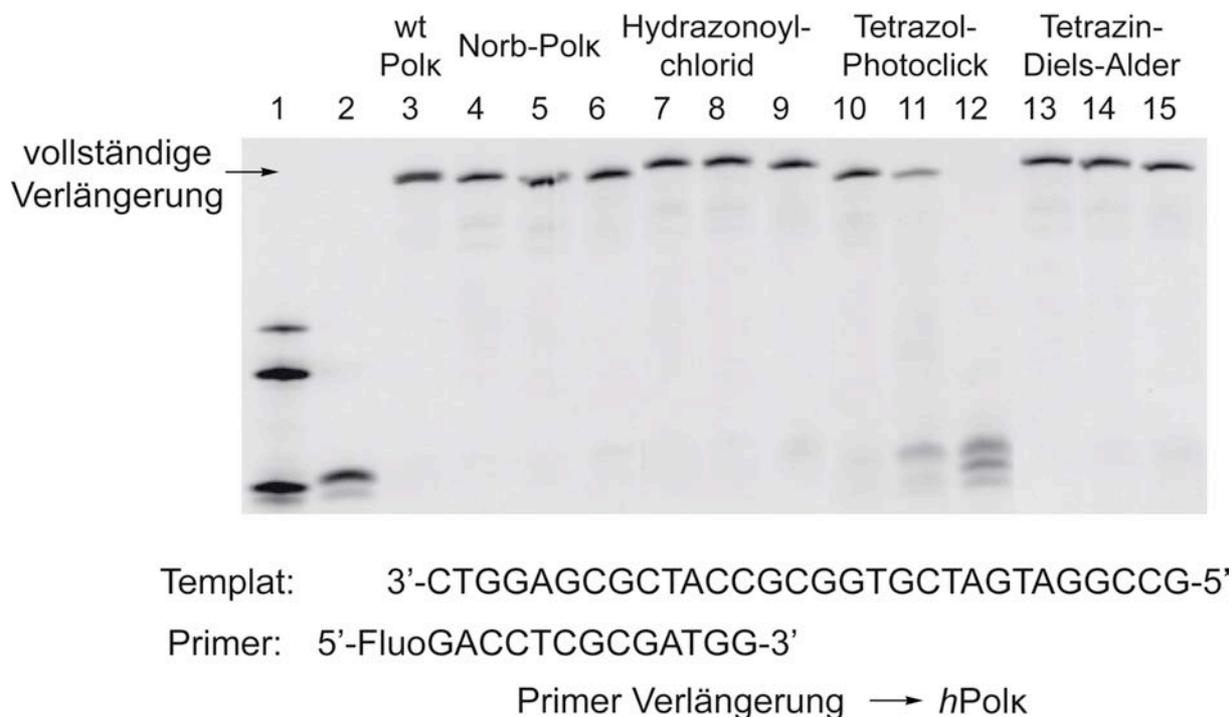


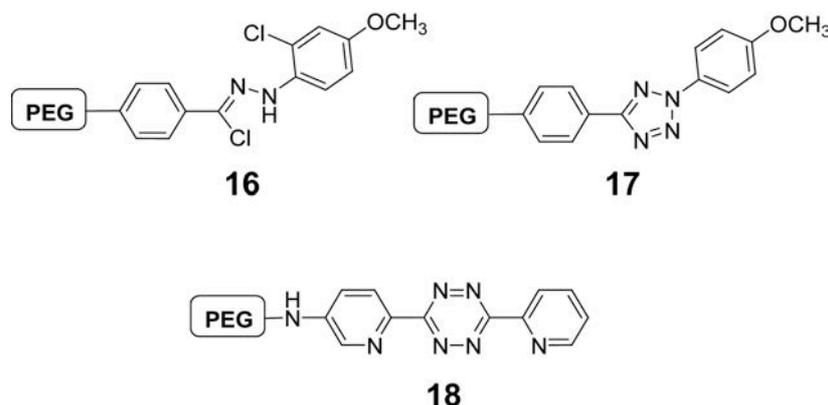
Abbildung 3.26: Denaturierende PAGE der Primerverlängerungs-Produkte mit *hPolk* und *hPolk*_{Gln163NorB}. Spur 1: Marker; 2: Primer; 3: Produkt von 0.1 μ M *hPolk*; 4-6: Produkte von 1, 0.5 und 0.1 μ M *hPolk*_{Gln163NorB} + **13**; 7-9: Produkte von 1, 0.5 und 0.1 μ M *hPolk*_{Gln163NorB} + **14**; 10-12: Produkte von 1, 0.5 und 0.1 μ M *hPolk*_{Gln163NorB} + **15**.

Die erfolgreiche Verlängerung des Fluoreszenz markierten Primers wurde anhand der Fluoreszenz der Gelbanden am LAS3000 *image reader* (FujiFilm) detektiert (**Abbildung 3.26**). Hieraus ist zu entnehmen, dass alle getesteten Polymerase-Varianten aktiv waren. Die mit der Konzentration von 0.1 μM eingesetzte Wildtyp-*hPolk* zeigte wie erwartet die maximale Enzymaktivität, während fast alle anderen Proteine eine vergleichbare Aktivität besaßen (zum Beispiel Spuren 3, 6, 9 und 15). Nur die photoinduzierte Click-Reaktion mit **14** führte zur Abnahme der Polymerase-Aktivität (Spuren 10-12). Dies könnte durch die Behandlung des Proteins mit UV-Licht (302 nm) verursacht worden sein, welche zur teilweisen Denaturierung der Polymerase führen könnte.^[201] Der Erhalt der Enzymaktivität war insbesondere für die Modifizierung des Proteins mit Hydrazonoylchlorid-generierten Nitriliminen von großer Bedeutung (Spuren 7-9). Diese neue Methode war damit nicht nur sehr einfach, schnell und effizient durchzuführen, sondern erwies sich mit den milden Reaktionsbedingungen (pH 7.4) als äußerst schonende Alternative zu Kupfer(I)-katalysierten Click-Reaktionen. Die hier dargestellten Ergebnisse könnten aufgrund der sehr empfindlichen Natur des getesteten Proteins auf eine Vielzahl anderer Proteine übertragen werden. Somit konnte durch gerichtete Evolution des Pyrrolysin-Systems der Einbau von Norbornenen in Proteine ermöglicht werden. Durch Anwendung mehrerer Modifizierungsreaktionen, unter anderem unter Verwendung von Nitriliminen, wurde eine sichere und schonende Methode zur bioorthogonalen Modifizierung von Proteinen etabliert. Um die Aussagekraft dieser Ergebnisse zu erhöhen, ist es jedoch notwendig, die Effizienz der Modifizierungsreaktionen zu bestimmen. Hierzu bedarf es noch der Quantifizierung des Click-Produkts. Dies könnte entweder über Bestimmung der veränderten Gesamtproteinmasse nach der Modifizierung oder über Quantifizierung der Fluoreszenzintensität des Click-Produkts erfolgen.

3.5.13 BIOORTHOGONALE PEGYLIERUNG VON NORB-LYSIN IN PROTEINEN

Ein sehr wichtiger Anwendungsbereich für die bioorthogonale Modifizierung von Proteinen ist die PEGylierung. Die Einführung von PEG-Ketten auf Proteinoberflächen ist besonders bei therapeutischen Proteinen erwünscht. Diese Modifizierung erhöht nicht nur das Molekulargewicht der Proteine und somit die Halbwertszeit im Blut (*clearance*), sondern reduziert ungewollte Immunreaktionen

durch Abschirmung antigener Strukturen auf der Proteinoberfläche. PEG-Ketten werden klassisch in nicht bioorthogonalen Reaktionen, wie zum Beispiel durch Maleimidkupplung, in Proteine eingebracht, was häufig zu heterogenen PEG-Protein-Gemischen führt. Die Einführung neuer reaktiver Gruppen in Proteine wird daher als Methode der Wahl gesehen, solche PEG-Ketten ortsspezifisch und quantitativ in Proteine einzubringen.



Schema 3.17: Strukturen der PEG-Derivate **16**, **17** und **18**.

Es sollte gezeigt werden, dass die hier etablierte Methode des Einbaus und der Funktionalisierung von Norbornen-Aminosäuren in Proteine sich für eine solche anwendungsbezogene Problemstellung eignete. Hierzu wurden PEGylierte Tetrazol-, Hydrazonoylchlorid- und Tetrazinderivate **16-18** von *Dr. Milan Vrabel* synthetisiert (**Schema 3.17**). Diese wurden, wie in *Abschnitt 5.15.4.3* beschrieben, zur Funktionalisierung von $hPolk_{Gln163Norb}$ unter Kupfer-freien Reaktionsbedingungen eingesetzt.

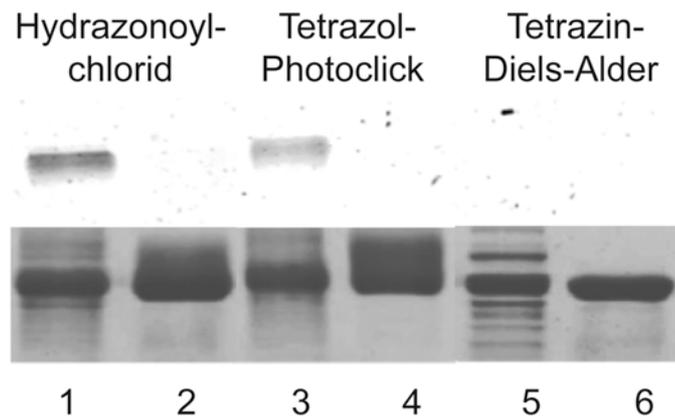


Abbildung 3.27: a) Fluoreszenzaufnahme und b) Coomassie-Färbung der PEGylierungs-Reaktionen an *hPolk* (Spuren 2, 5 und 6) und *hPolk*_{Gln163Norb} (Spuren 1, 3 und 5). Spuren 1 und 2: Click-Produkt + **16**; Spuren 3 und 4: Clickprodukt + **17**; Spuren 5 und 6: Clickprodukt + **18**.

Die SDS-PAGE Analyse zeigte auch hier die selektive Bildung der gewünschten Click-Produkte (**Abbildung 3.27**), welche bei der Umsetzung mit **16** und **17** fluoreszierten. In Abwesenheit der Norbornen-Aminosäure konnte keine Produktbildung beobachtet werden (Spuren 2 und 4), welches die Selektivität dieser Methode bestätigte. Hingegen fluoreszierten die mit **16** und **17** umgesetzten *hPolk*_{Gln163Norb}-Banden (Spuren 1 und 3), was auf die Bildung der fluoreszierenden Pyranzonyl-Verbindung schließen ließ. Eine Auswertung der mit Tetrazin umgesetzten Proteine war in diesem Fall nicht möglich (Spuren 5 und 6), da das eingesetzte Tetrazinderivat **18** nicht fluoreszierte. Zudem wäre die durch PEGylierung verursachte Massedifferenz von + 1 kDa auf dem verwendeten Gel nicht detektierbar. Die Aktivität der PEGylierten *hPolk*_{Gln163Norb}-Varianten wurden ebenfalls in Primerverlängerungs-Studien bestimmt und mit der unmodifizierten *hPolk*_{Gln163Norb} sowie der Wildtyp-Polymerase verglichen (siehe **Abbildung 3.28**).

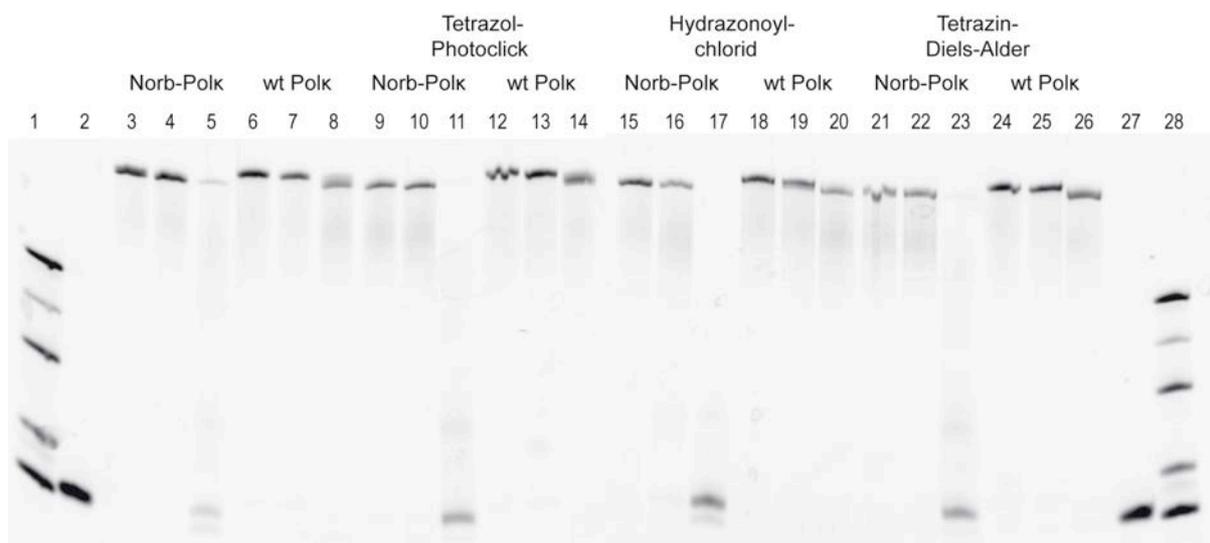


Abbildung 3.28: Denaturierende PAGE der Primer Verlängerungsprodukte mit *hPolk* und *hPolk*_{Gln163Norb} nach PEGylierung. Spur 1: Marker; 2: Primer; 3: Produkt von 0.1 μM *hPolk*; 4-6: Produkte von 1, 0.5 und 0.1 μM *hPolk*_{Gln163Norb} + **16**; 7-9: Produkte von 1, 0.5 und 0.1 μM *hPolk*_{Gln163Norb} + **17**; 10-12: Produkte von 1, 0.5 und 0.1 μM *hPolk*_{Gln163Norb} + **18**; 13-15: Produkte von 1, 0.5 und 0.1 μM *hPolk*_{Gln163Norb} + **19**; 16-18: Produkte von 1, 0.5 und 0.1 μM *hPolk*_{Gln163Norb} + **20**; 19-21: Produkte von 1, 0.5 und 0.1 μM *hPolk*_{Gln163Norb} + **21**; 22-24: Produkte von 1, 0.5 und 0.1 μM *hPolk*_{Gln163Norb} + **22**; 25-27: Produkte von 1, 0.5 und 0.1 μM *hPolk*_{Gln163Norb} + **23**.

Es zeigte sich, dass in allen Fällen die Aktivitäten der PEGylierten Proteine geringer als die der unmodifizierten und der Wildtyp-Polymerase waren. Dies könnte durch die Einführung der relativ großen PEG-Gruppen an die Position 163 der Polymerase hervorgerufen sein, welche sich in der Nähe des aktiven Zentrums befindet. Das Eindrehen der PEG-Kette in die Polymerase könnte eventuell den Zugang der Nukleosid-Triphosphate oder des dsDNA-Strangs erschweren und die Primerverlängerung behindern.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der Einbau unnatürlicher Aminosäuren unter Verwendung orthogonaler tRNA/AaRS-Paare möglich ist. Die Verwendung des hier dargestellten Pyrrolysin-Systems in *E. coli* erlaubt es, in Kombination mit der gerichteten Evolution der PylRS, eine große Bandbreite neuartiger Aminosäuren mit besonderer Reaktivität in Proteine einzubauen. Jedoch hat sich im Laufe dieser Arbeit gezeigt, dass die Suppressions-Effizienz oftmals nicht ausreicht, um große Mengen des gewünschten Proteins mit unnatürlicher Aminosäure herzustellen. Eine 10- bis 20-fache Abnahme der Ausbeute an cotranslational modifiziertem Protein gegenüber dessen Wildtyp-Variante schränkt demnach die Wahl des zu modifizierenden Proteins ein. Die bioorthogonalen Adressierung der unnatürlichen Aminosäuren in YFP_{Lys114Alkin} sowie *hPolk*_{Gln163Norb} mit Cu(I)-katalysierten bzw.

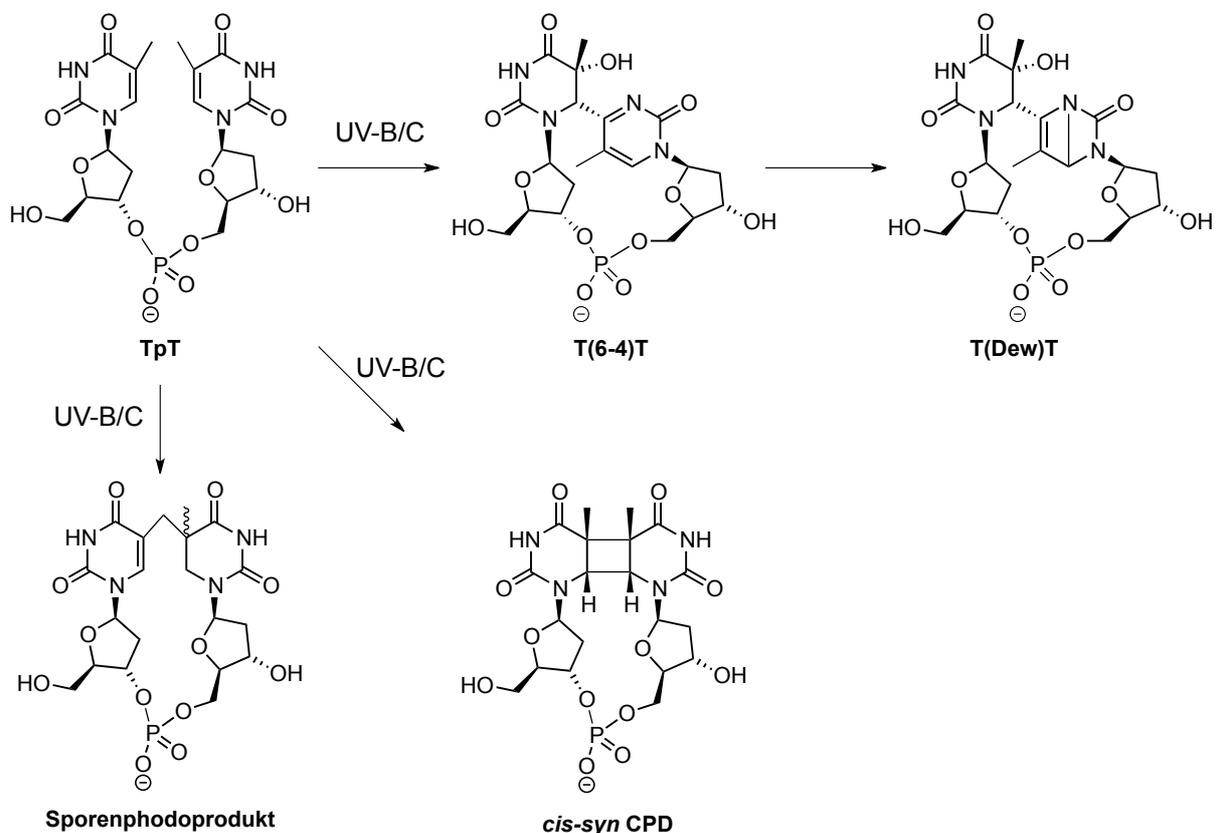
kupferfreien Click-Reaktionen eignet sich sehr gut für die gewünschte ortsspezifische Modifizierung des Proteins, ohne dieses zu denaturieren.

In Zukunft wäre eine weitere Optimierung des eingesetzten Pyrrolysin-Systems hinsichtlich der Proteinausbeuten nötig - zum Beispiel durch Verringerung der RF1-Konzentration im Expressionsstamm, der Entwicklung von reaktiven Aminosäuren mit guter Zellaufnahme oder durch molekularbiologische Ansätze zur verbesserten Proteinexpression. In Kombination mit den hier dargestellten Click-Reaktionen wäre das optimierte System eine sehr robuste Methode für die ortsgerichtete Modifizierung von Proteinen.

4 DEWAR-REPARATUR DURCH (6-4) PHOTOLYASEN

4.1 DNA-PHOTOSCHÄDEN

Sonnenenergie ist die treibende Kraft allen Lebens auf der Erde. Viele Organismen haben sich im Laufe der Evolution - jeder auf seine Weise - darauf spezialisiert, die in Form von Sonnenlicht eingebrachte Energie zu nutzen: poikilotherme Lebewesen zum Beispiel brauchen Sonnenwärme zur Aufrechterhaltung ihrer Körpertemperatur während in der Photosynthese Sonnenenergie chemisch gebunden wird.



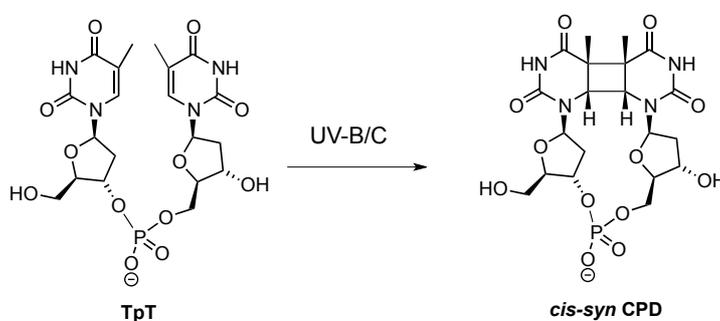
Schema 4.1: Hauptsächlich entstehende DNA-Photoschäden aus einer TpT-Sequenz.

Allerdings birgt der kurzwellige und energiereiche UV-Anteil auch Gefahren für Organismen, die der Sonne besonders ausgesetzt sind. Bedingt durch die Absorption der DNA- (und auch RNA-)Basen im fernen UV-Bereich (UV-B und UV-C), führt diese bei Pyrimidinen zu strukturellen Veränderungen in Form von Pyrimidindimeren (siehe **Schema 4.1**).^[202-203] Ähnlich wie die Produkte ionisierender

Strahlung, oxidativem Stress und toxischer Chemikalien (z.B. alkylierende Reagenzien) stellen diese sogenannten Photoprodukte DNA-Schäden dar, welche die genetische Integrität einer Zelle beeinträchtigen können.^[204-207]

4.1.1 BILDUNG UND EIGENSCHAFTEN VON DNA-PHOTOSCHÄDEN

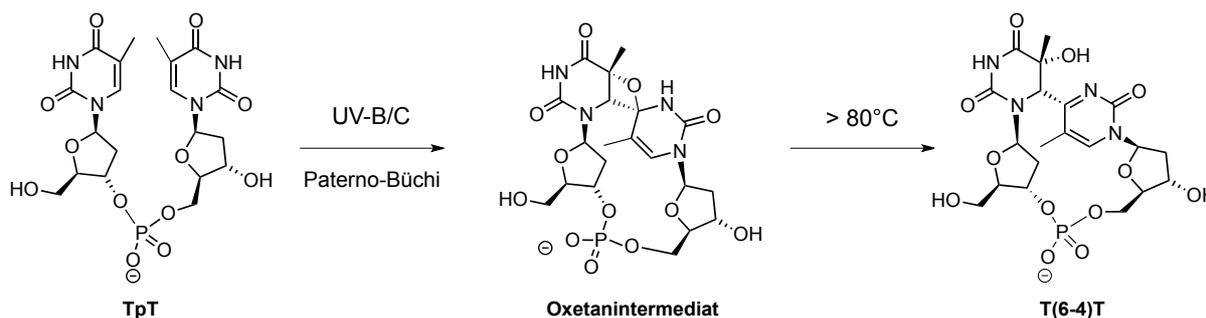
Während der UV-induzierten Dimerisierung benachbarter Pyrimidine können unterschiedliche Photoprodukte entstehen. Mit 70-80% stellen *cis-syn* Cyclobutanpyrimidindimere (CPD-Schäden) den Hauptanteil dar, während Pyrimidin(6-4)pyrimidon Photoprodukte [(6-4)-Photoprodukte] und ihre Dewar Valenz-Isomere einen Anteil von 20-30% an den Gesamtphotoschäden ausmachen.^[203, 208] Der CPD-Schaden entsteht durch Anregung benachbarter Pyrimidine in den ersten angeregten Singulettzustand, aus dem eine $[2\pi+2\pi]$ Cycloaddition erfolgt. Hierbei werden kovalente Bindungen zwischen den Doppelbindungen der Kohlenstoffe 5 und 6 (C5 und C6) der Pyrimidine gebildet (**Schema 4.2**).^[18, 209] Theoretisch können zwölf Isomere des CPD-Schadens entstehen. Allerdings wurden bisher nur drei Isomere in DNA nachgewiesen, deren häufigster Vertreter das *cis-syn* Isomer ist.^[210-211]



Schema 4.2: UV-induzierte Bildung des *cis-syn* CPD-Schadens.

Auch die $[2\pi+2\pi]$ Cycloaddition zum T(6-4)T-Photoprodukt [bzw. T(6-4)C-Photoprodukt] erfolgt aus einem angeregten Zustand der beteiligten Pyrimidine heraus. Hierbei reagiert die C4-Carbonylgruppe (Aminogruppe) des 3'-Thymins (Cytosins) mit der C5-C6-Doppelbindungen des 5'-Thymins. Das in dieser Paterno-Büchi-Reaktion entstehende Oxetan (Azetidin) ist bei Temperaturen über $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ instabil, so dass es zur Ringöffnung durch Aufhebung der Bindung zwischen C4 und dem Sauerstoff kommt (**Schema 4.3**). Somit findet bei der Bildung des (6-4)-

Photoprodukts ein Gruppentransfer vom C4 der 3'-Base zum C5 der 5'-Base statt.^[212-216] Während die weitere Bestrahlung des CPD-Schadens mit Wellenlängen aus dem fernen UV zur teilweisen Photoreversion des Dimers in die ursprünglichen Basen führt, ist eine solche Umkehrung in die intakten Basen im Falle des (6-4) Photoprodukts nicht möglich. Infolge dieser Photoreversion nimmt daher der Anteil des (6-4) Photoprodukts bei erhöhter UV-Strahlendosis auf bis zu 40% der Gesamtphotoschäden zu.^[217]



Schema 4.3: UV-induzierte Bildung des T(6-4)T Photoprodukts über ein Oxetanintermediat.

Des Weiteren unterscheiden sich diese beiden Schäden in ihrem Absorptionsverhalten. Aufgrund des Verlustes der Aromatizität weist der CPD-Schaden weder die für Nukleobasen typische Absorption bei 260 nm auf, noch absorbiert er bei höheren Wellenlängen (>300 nm). Das (6-4) Photoprodukt hingegen besitzt charakteristische Absorptionsbanden bei 310-360 nm, weshalb eine photometrische Diskriminierung des (6-4) Photoprodukts möglich ist. Durch weitere Absorption von UV-Strahlen >300 nm kann das (6-4) Photoprodukt in sein Dewar Valenz-Isomer überführt werden.^[18, 210, 218] Die Quantenausbeute dieser sogenannte Photoisomerisierung liegt bei ca. 5%.^[219-220] Die Umwandlung kann zwar durch Bestrahlung der Dewar-Schäden mit UV-B rückgängig gemacht werden, verläuft jedoch viel langsamer.^[221] Somit kann sich der Anteil der Dewar-Isomere gegenüber ihrer (6-4) Spezies erhöhen, weshalb auch diese Photoschäden biologisch relevant sind.^[222] Ein weiterer Vertreter der UV-induzierten DNA-Schäden, welches in bakteriellen Sporen identifiziert werden konnte, ist das sogenannte Sporenphotoprodukt.^[223-224] Die Bildung dieses DNA-Schadens wird durch hohe Konzentrationen an Dipikolinsäure, Ca^{2+} -Ionen und die Verpackung der stark dehydratisierten Sporen-DNA in *small acid soluble proteins* (SASPs) begünstigt.^[225]

4.1.2 REPARATUR VON DNA-PHOTOSCHÄDEN

Die effiziente Beseitigung dieser DNA-Schäden ist für das Überleben der Zelle von großer Wichtigkeit. Findet diese nicht statt, würden sowohl DNA- als auch RNA-Polymerasen in der Ausübung ihrer Funktionen beeinträchtigt oder gar gehindert werden. Wichtige Prozesse wie die Replikation oder Transkription würden somit in der betroffenen DNA-Region unvollständig oder nur fehlerhaft stattfinden. Das Ergebnis sind Mutationen, Beeinträchtigung des Zellwachstums und der Zelltod.^[226-228] Andererseits können UV-Schäden an der DNA durch Mutationen ein unkontrolliertes Wachstum der betroffenen Zelle hervorrufen. So ist die UV-Belastung beim Menschen maßgeblich an der Entstehung von Hautkrebs beteiligt.^[229]

Insbesondere Organismen, die der Sonne stark ausgesetzt sind, haben als Reaktion auf die Gefahren durch DNA-Photoschäden im Laufe der Evolution unterschiedliche Arten der Reparatur entwickelt. Man unterscheidet hierbei zwischen zwei Mechanismen.^[230] Zum Einen existieren Enzyme, die durch direkte Reversion den Schaden in die intakten Basen umwandeln können. In dem zweiten, weitaus komplexeren Weg, sind mehrere Faktoren beteiligt, strukturelle Veränderungen in der DNA zu erkennen, auszuschneiden und zu ersetzen (*excision repair*). Diese kann entweder über *base excision repair* (BER), *nucleotide excision repair* (NER) oder *mismatch repair* (MMR) erfolgen.^[231-233] BER, NER und MMR unterscheiden sich neben der Schadensspezifität auch im biochemischen Mechanismus der Schadenserkenkung und der Zusammensetzung und Komplexität der Reparaturenzyme.

(6-4)-Photoprodukte werden aufgrund der hohen strukturellen Deformation, welche sie in der DNA verursachen, relativ effizient über NER entfernt. CPD-Schäden hingegen stellen ein wesentlich schlechteres Substrat für diesen Reparaturweg dar.^[234] Durch Untersuchungen zur Bildung und Reparatur von Photoschäden in *E. coli* konnte jedoch nachgewiesen werden, dass CPD-Schäden spezifisch und mit einer hohen Reparatureffizienz unabhängig von der NER beseitigt werden.^[235-236] Ursache hierfür ist die CPD-Photolyase, ein photoreaktivierendes Enzym, welches spezifisch die Spaltung des CPD-Schadens in die ursprünglichen Pyrimidine katalysiert. Die Reversion erfolgt in einem Schritt. Daher handelt es sich um eine

„direkte“ Reparatur, während die NER als „indirekte“ Reparatur bezeichnet wird. Neben der Existenz der CPD-Photolyase in *E. coli* konnte diese auch in einer Reihe weiterer Organismen fast aller Lebensreiche identifiziert werden.^[19, 237-238] Aufgrund ihrer Sequenzhomologien erfolgte eine Einteilung in Klassen I (Bakterien, Pilze und Haloarchaea), Klasse II CPD-Photolyasen (Eukaryoten, Bakterien, pathogene sowie parasitäre Organismen) und Klasse III CPD-Photolyasen.^[18, 22, 230, 239] Letzere wurden von *Sancar* und Mitarbeitern in Bakterien gefunden und als nahe Verwandte von pflanzlichen Cryptochromen identifiziert.

Eine weitere Enzymaktivität wurde zunächst in *Drosophila melanogaster*^[240] und später auch in anderen Organismen^[241] beschrieben, die in der Lage ist, (6-4) Photoprodukte spezifisch zu reparieren. Diese ist, in Anlehnung an die ähnliche (CPD) Photolyase, als (6-4)-Photolyase bezeichnet worden.

4.1.3 (6-4)-PHOTOLYASE

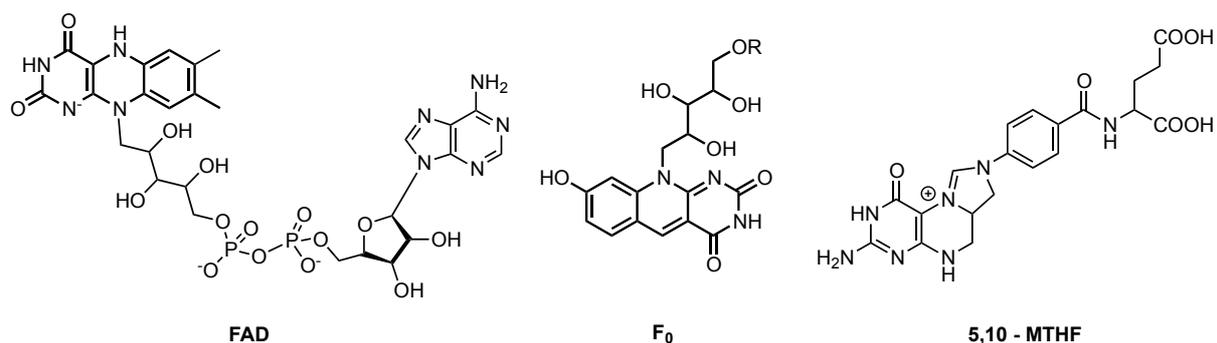
Wie schon für die CPD-Photolyase wurden auch im Fall der (6-4) Photolyase große Anstrengungen unternommen, dieses Enzym sowohl biochemisch als auch strukturell zu charakterisieren. Der Durchbruch gelang mit der Aufklärung der Kristallstruktur der (6-4) Photolyase aus *Drosophila melanogaster* in Komplex mit dem (6-4) Photoprodukt durch die Gruppen *Carell* und *Schlichting*.^[25] Diese und viele weitere Cokristallstrukturen der (6-4) Photolyase mit ihren natürlichen Substraten lieferten wichtige Erkenntnisse bezüglich Substraterkennung und Reparaturmechanismus.^[25-26, 28]

(6-4) Photolyasen sind weniger verbreitet als CPD-Photolyasen, da (6-4) Photoprodukte im Allgemeinen ein besseres Substrat für die NER sind. Nach und nach konnte diese Enzymaktivität jedoch in unterschiedlichen Organismen, vor allem Pflanzen, Insekten und Amphibien, nachgewiesen werden. So gelang es erstmals im Jahr 1993, (6-4) Photolyasen aus *D. melanogaster*^[240] und später in *Arabidopsis thaliana* und *Xenopus laevis* zu isolieren.^[242-245]

4.1.3.1 Chromophore

Photolyasen binden zwei Chromophore: ein Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD) im aktivem Zentrum sowie 5,10-Methenyltetrahydrofolylpolyglutamat (MTHF) oder 7,8-

Didemethyl-8-hydro-5-deazaflavin (F_0) im Interdomänenloop (**Schema 4.4**).^[26, 246-249] FAD ist ein in der Natur sehr häufiger Cofaktor und nimmt bei enzymatischen Katalysen im Allgemeinen die Rolle eines ubiquitären Redoxpartners ein, der Ein- und Zwei-Elektronenübertragungen durchführen kann. Grundsätzlich kann FAD in drei verschiedenen Redox-Zuständen existieren: dem vollständig oxidierten FAD, dem mit einem Elektron reduzierten, neutralen und radikalischen Semichinon $FADH^0$ sowie dem mit zwei Elektronen vollständig reduzierten $FADH^-$. Während bei vielen anderen Flavoproteinen das Semichinon die aktive Form darstellt, ist es in der Photolyase $FADH^-$. Zwischen der Photolyase und anderen Flavoproteinen gibt es kaum Homologien. Teilhomologien konnten hingegen zu anderen Nukleotidbindenden Proteinen, wie der Aminoacyl-tRNA-Synthetase, festgestellt werden.^[238] Das vollständig oxidierte FAD bindet bereits während der Proteinsynthese in das aktive Zentrum und katalysiert dessen korrekte Faltung.^[230] Anschließend wird es in die aktive Form $FADH^-$ überführt. Dieses überträgt nach Anregung durch Photonenabsorption ein Elektron auf das Photodimer, welches gespalten wird.^[250]



Schema 4.4: Strukturen des essentiellen Cofaktors FAD sowie der Photoantennen F_0 und 5,10-MTHF.

Die Bindung zum zweiten Chromophor (MTHF oder F_0) erfolgt am Interdomänenloop nah an der Proteinoberfläche und ist weniger stabil. In seiner Funktion als Photoantenne ist es zwar nicht essentiell für die Ausübung der Enzymaktivität, steigert aber dessen Effizienz. Der zweite Chromophor absorbiert Photonen und überträgt die Anregungsenergie auf das $FADH^-$ über Förster-Transfer. Hierdurch kann bei limitierenden Lichtbedingungen die Reparaturrate um das 10 bis 100 fache erhöht werden.^[247, 250] MTHF absorbiert maximal bei 360 nm, durch Wechselwirkungen zum Protein verschiebt sich das Absorptionsmaximum auf 370 - 420 nm. Ähnlich verhält es sich mit F_0 . Das ungebundene Deazaflavin zeigt bei 420

nm maximale Absorption. Durch Bindung und Deprotonierung dieses Cofaktors findet in gebundener Form ebenfalls eine Rotverschiebung statt (um 20 nm).^[26]

4.1.3.2 Struktur

(6-4)-Photolyasen sind monomere Proteine mit einer Größe von ca. 60 kDa und zwei nicht-kovalent gebundenen Chromophoren. Bereits ihre Sequenz lässt große Ähnlichkeit zu den Klasse-I-CPD-Photolyasen erkennen (ca. 36 % Homologie). So ist der C-Terminus, welcher das aktive Zentrum ausbildet, besonders hoch konserviert. Elf der 14 essentiellen Reste im aktiven Zentrum sind sich ähnlich; acht von ihnen sind identisch. Bei Betrachtung der Kristallstruktur der (6-4) Photolyase aus *D. melanogaster* lässt sich wie bei den CPD-Photolyasen eine Einteilung in zwei Domänen erkennen: eine N-terminale α/β -Domäne, welche ca. 130 Aminosäuren umfasst, sowie eine α -helicale Domäne am C-Terminus, die das katalytische Zentrum der Photolyasen darstellt. Die Verknüpfung beider Domänen miteinander erfolgt über einen Interdomänenloop, in dem sich der zweite Chromophor befindet. Welches der beiden Chromophore den zweiten Cofaktor darstellt, ist nicht aus der Aminosäure-Sequenz des Interdomänenloops zu erschließen. Dieser ist zum Teil höher konserviert als die katalytische Domäne.

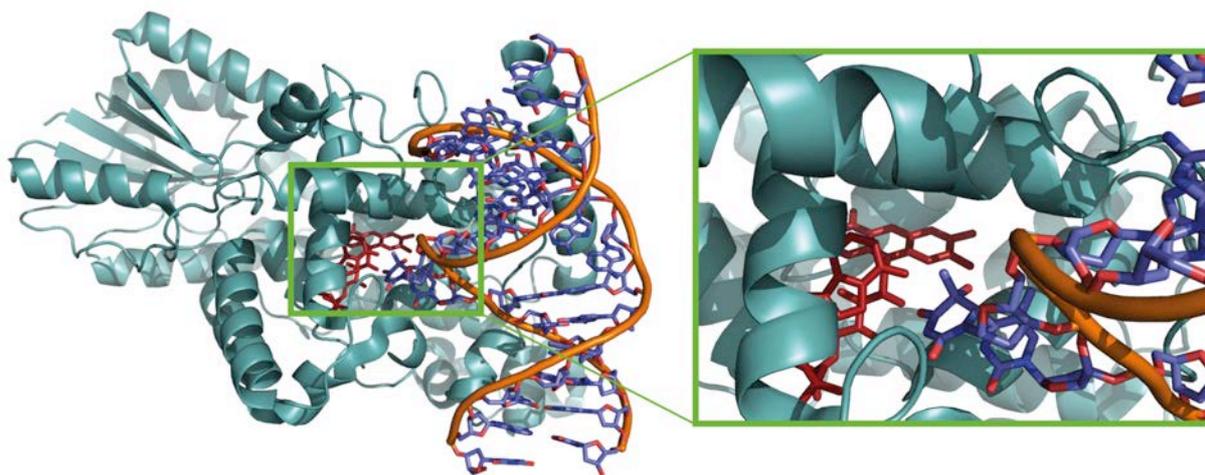


Abbildung 4.1: Kristallstruktur der (6-4) Photolyase aus *Drosophila* im Komplex mit T(6-4)T Photoprodukt in dsDNA (PDB: 3CVU).

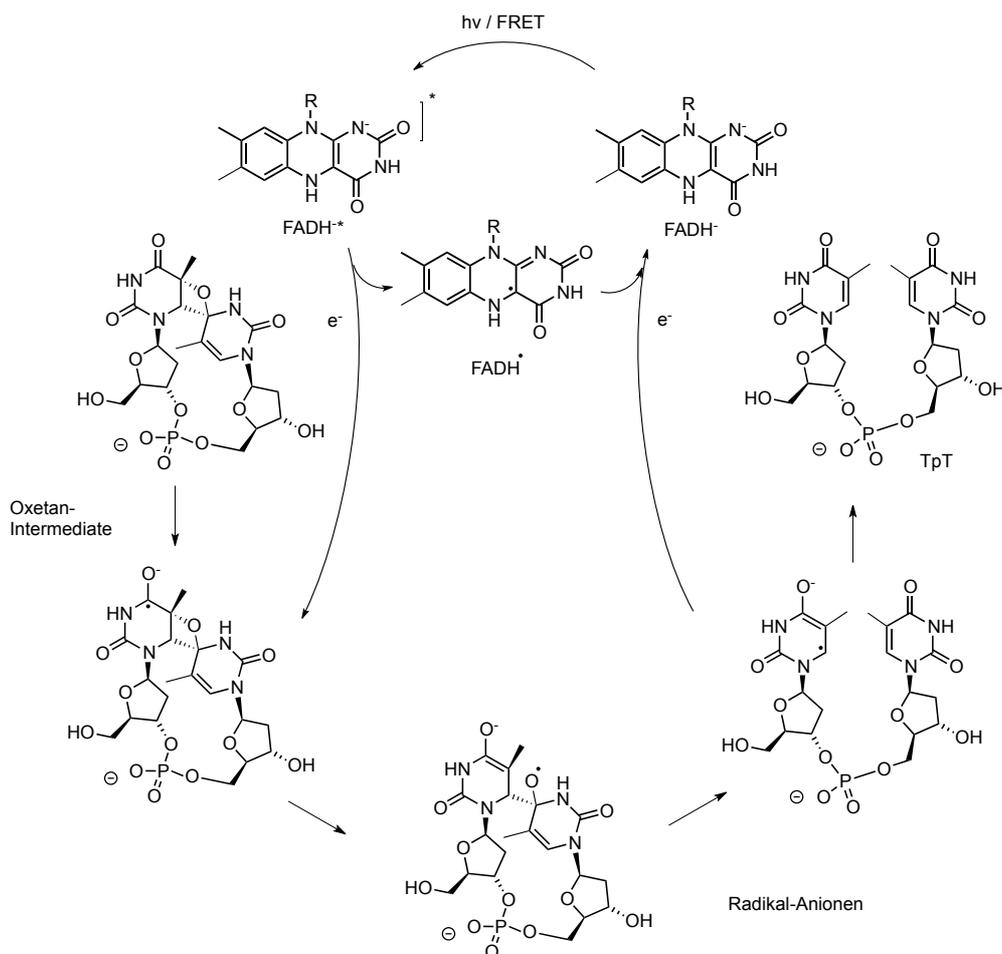
Innerhalb des aktiven Zentrums befindet sich das FAD in der Nähe einer kleinen Öffnung, welche aus DNA-bindenden Resten aufgebaut ist. Diese ermöglichen aufgrund ihrer Größe und Ladung das Eindrehen des (6-4) Schadens aus der α -Helix heraus (*base flipping*). Hierdurch wird die für die Reparatur notwendige Nähe

zum FAD, welches in einer untypischen U-Konformation gebunden wird, geschaffen. In **Abbildung 4.1** ist die erste Cokristallstruktur einer (6-4) Photolyase (aus *D. melanogaster*) in Komplex mit dem T(6-4)T Photoprodukt dargestellt.^[25]

4.1.3.3 Reaktionsmechanismus

Die (6-4) Photolyase erkennt den (6-4) Schaden innerhalb der DNA-Helix und dreht ihn um fast 180 ° aus der Helix heraus in das aktive Zentrum des Proteins. Dieser Zustand wird durch zahlreiche DNA-Protein Wechselwirkungen stabilisiert. Zusätzlich schirmen hydrophobe Reste den eingedrehten (6-4) Schaden nach außen hin ab.

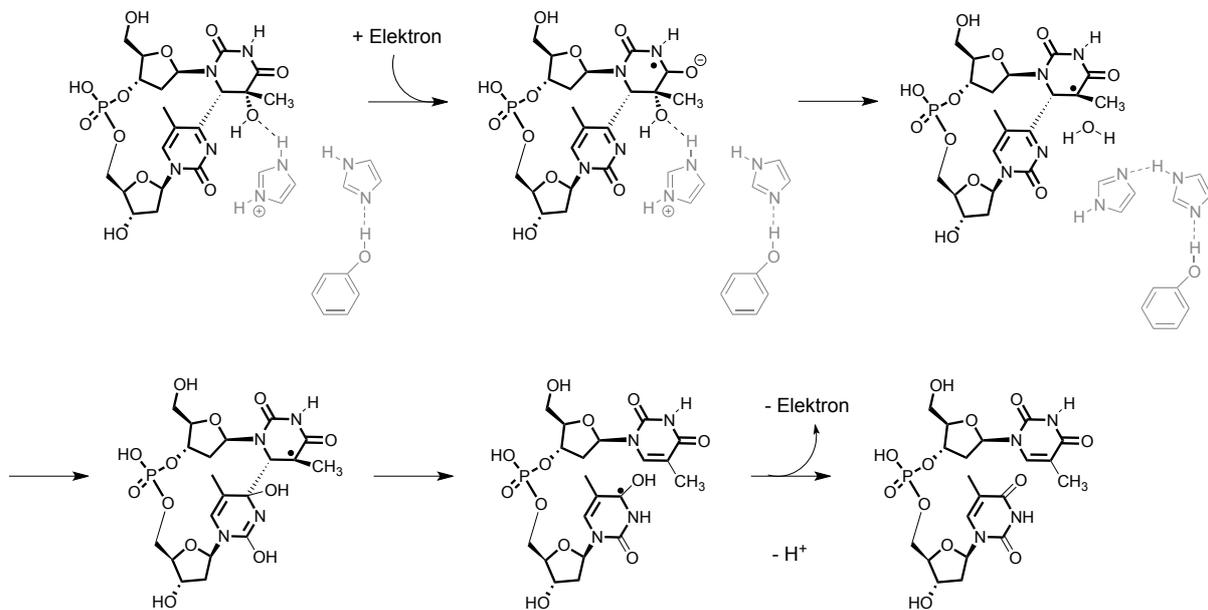
Die Bindung des (6-4) Photoprodukts erfolgt lichtunabhängig und wird von einer Photonen-induzierten Reversion des Schadens gefolgt (**Schema 4.5**). Der Reaktionsmechanismus, welcher zur Reparatur der (6-4) Photoprodukte führt, wird in der Literatur kontrovers diskutiert.^[203, 251-256] Unstrittig ist, dass im natürlichen System die Photoantenne der (6-4) Photolyase durch Absorption eines Photons angeregt wird und diese Anregungsenergie effizient auf das FADH⁻ überträgt.^[256] Dabei erfahren beide Chromophore einen π - π^* -Übergang. Die Übertragung der Anregungsenergie erfolgt über Förster-Transfer. Hier zeigt sich, dass weder Abstand noch Orientierung der beiden Chromophore zueinander zufällig gewählt sind, sondern für diese Art der distanzabhängigen Energieübertragung optimiert wurden.^[26] Der Abstand zwischen den Chromophoren ist größer als zwischen FADH⁻ und dem (6-4) Photoprodukt. Dies verhindert einen Elektronentransfer vom FADH⁻ auf die Photoantenne, welche ein höheres Reduktionspotential als das Substrat besitzt. Das angeregte FADH⁻ (*FADH⁻) transferiert ein Elektron auf den (6-4) Schaden und wird dabei selbst zum Semichinon FADH⁰ oxidiert. Die Elektroneninjektion leitet die Reparatur des Schadens ein, welche mit einem Rücktransfer des Elektrons zu FADH⁰ abschließt. Vergleiche mit CPD-Photolyasen haben gezeigt, dass diese ihr Substrat mit einer weitaus höheren Effizienz reparieren. Während CPD-Photolyasen die Reparatur mit einer Quantenausbeute von 0.7 bis 0.98 katalysieren, beträgt die Quantenausbeute bei der (6-4) Photolyase bei gleicher Bestrahlungsintensität weniger als 1%.^[219]



Schema 4.5: Möglicher Reparaturmechanismus der (6-4) Photolyasen.

Der signifikanteste Unterschied der beiden Photolyasen betrifft jedoch den Reparaturmechanismus. Durch einfache enzymatische Spaltung des Pyrimidin-Dimers, wie er bei der Photoreversion des CPD-Schadens erfolgt, würde das (6-4) Photoprodukt aufgrund des intramolekularen Gruppentransfers bei dessen Bildung nicht in die ursprünglichen Basen überführt werden können. Daher wurde zunächst angenommen, dass die (6-4) Photolyase den Schaden erneut in ein Oxetan- bzw. Azetidin-Intermediat umwandeln muss (**Schema 4.5**), um den Gruppentransfer rückgängig zu machen. Hierbei könnten zwei essentielle Histidin-Reste im aktiven Zentrum der (6-4) Photolyase durch Ladungskontakte mit dem Schaden die Bildung des Übergangszustandes forcieren.^[256] Durch die Wechselwirkungen würde die Aminogruppe N3 des 3'-Pyrimidinonrings protoniert werden. Das dabei entstehende Acyliminium-Ion könnte somit durch die relativ schwach nukleophile OH-Gruppe angegriffen werden und zur Bildung des Oxetan-Intermediats führen. Durch Elektronentransfer vom angeregten FADH* auf das Oxetan-Intermediat entstünde

anschließend ein Radikal-Anion, welches nach Elektronen-Rücktransfer in die intakte Bipyrimidin-Sequenz zerfallen würde. Der Protonierungszustand der Histidine, der für diesen Mechanismus grundlegend wäre, würde auch die starke pH-Abhängigkeit der (6-4) Photolyase erklären. Trotz dieser zahlreichen Untersuchungen zum viergliedrigen Übergangszustand bei der Reparatur von (6-4) Photoprodukten, konnte dieser experimentell nie nachgewiesen werden. Insbesondere die von Arbeitsgruppen *Carell* und *Schlichting* veröffentlichten Cokristallstrukturen der (6-4) Photolyase, welche das Enzym mit ihrem Substrat vor und nach *in situ* Reparatur zeigen, sprechen gegen das Oxetanmodell.^[25] Die Kristallstrukturen zeigen, dass die räumliche Anordnung der Histidine im aktiven Zentrum die Protonierung von N3 nicht ermöglichen können. Stattdessen würden extensive Wasserstoffbrückenbindungen zwischen der C5-OH Gruppe mit einem Wassermolekül und His365 gebildet werden, welche zur Protonierung der Hydroxygruppe an C5 führen könnten (**Schema 4.6**). Dadurch würde diese eine bessere Abgangsgruppe darstellen und könne direkt transferiert werden.



Schema 4.6: Postulierter Mechanismus von *Carell* und *Schlichting*.^[25]

Ebenfalls unklar ist die Reparaturaktivität der (6-4) Photolyase gegenüber den Dewar-Isomeren. *Sancar* und Mitarbeiter konnten in der Tat eine geringfügige Reparatureffizienz der (6-4) Photolyase aus *D. melanogaster* gegenüber T(Dew)T nachweisen,^[253] während Studien von *Iwai* und *Todo* keine Dewar-Reparaturaktivität

nachweisen konnten.^[243, 257] Hierbei bedarf es in Zukunft weiterer Untersuchungen, um die Reparatureigenschaft der (6-4) Photolyasen bezüglich der T(Dew)T sowie T(Dew)C Schäden aufzuklären.

4.2 AUFGABENSTELLUNG

Während durch biochemische und strukturelle Studien mit CPD- und (6-4) Photolyasen die Bindung und der Reparaturmechanismus von CDP- und (6-4) Photoschäden weitestgehend aufgeklärt wurden, ist dies nicht der Fall für die Reparatur von Dewar-Schäden. *Sancar* und Mitarbeitern war es zum ersten Mal gelungen, die (6-4) Photolyase als Reparaturenzym dieser Photoschäden zu identifizieren.^[253] Jedoch bescheinigten ihre Untersuchungen mit der (6-4) Photolyase aus *D. melanogaster* diesem Enzym nur eine geringe Dewar-Reparatureffizienz und eine niedrige Quantenausbeute von <1%. Hingegen konnte eine solche Reparaturaktivität durch Studien von *Iwai* und Mitarbeiter mit der (6-4) Photolyase aus *Xenopus laevis* nicht nachgewiesen werden.^[257]

Im Rahmen dieser Arbeit sollten Dewar-Schäden auf ihre enzymatische Reparaturfähigkeit hin untersucht werden. Hierzu sollten DNA-Stränge mit den beiden Dewar-Schäden T(Dew)T und T(Dew)C sowie dem unnatürlichen Derivat T(Dew)C* synthetisiert werden. Die Synthese von T(Dew)C* würde, wie für die natürlichen Dewar-Isomere, durch die zweistufige Belichtung einer Dipirimidin-Sequenz mit 254 nm und 365 nm erfolgen, wobei eine Thymidin/N4-Methylcytosin (TpC*) Sequenz zu belichten wäre. Die drei Dewar-Isomere sollten anschließend in Reparatur-Studien mit der (6-4) Photolyase aus *D. melanogaster* eingesetzt werden (siehe *Abschnitt 5.17.1*). Ihre unterschiedlichen Substitutionen an der 3'-Base sollten helfen, den Reparaturmechanismus der Dewar-Isomere aufzuklären. Im Anschluss sollten zwei weitere Dewar-Schäden, T(Dew)U und T(Dew)5meC, synthetisiert und ebenfalls auf ihre Reparatureigenschaft hin untersucht werden. Die zusätzlichen Substitutionsmuster an der 3'- und 5'-Base dieser Dewar-Schäden erzeugen „Hybrid“-Isomere aus den T(Dew)C und T(Dew)T Schäden. Auf diese Weise sollten Unterschiede in der Reparierbarkeit von T(Dew)C und T(Dew)T durch die (6-4) Photolyase erklärt werden.

4.3 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

4.3.1 ENZYMATISCHE REPARATUR VON DEWAR-SCHÄDEN

Die (6-4) Photolyase aus *D. melanogaster* wurde, wie bereits beschrieben,^[25] rekombinant in *E. coli* hergestellt. Hierzu wurde das Plasmid pDEST-007:*phr(6-4)* in Rosetta™2-Zellen transformiert und die Proteinexpression in 5 L TB-Medium durchgeführt. Das Protein wurde aus den Zellen über eine StrepII-Tag Säule und Heparin-Säule gereinigt, in Assay-Puffer (50 mM Tris-HCl pH 7.6, 1 mM EDTA, 5 mM DTT, 100 mM NaCl, 5% Glycerin) überführt und bei Bedarf unter Sauerstoff-Ausschluss in einer *GloveBox* bei 4 °C gelagert. Die zu testenden Dewar-Substrate T(Dew)T und T(Dew)C sowie T(Dew)C* wurden von *Dr. Andreas Glas* synthetisiert und aufgereinigt.

Für die Reparatur von (6-4) Photoschäden war die einstündige Belichtung von äquimolaren Mengen an Substrat und der (6-4) Photolyase ausreichend, um eine vollständige Reparatur des (6-4) Photoschadens zu erzielen. Das Reaktionsgemisch wurde anschließend mittels HPLC analysiert (siehe *Abschnitt 5.16.1.6*). Da jedoch im Fall der Dewar-Reparatur nur von einer sehr geringen Reparatureffizienz auszugehen war,^[253] wurde die Belichtungszeit mit Weißlicht von einer bis auf sieben Stunden verlängert sowie ein Überschuss von zehn Äquivalenten an (6-4)-Photolyase eingesetzt.

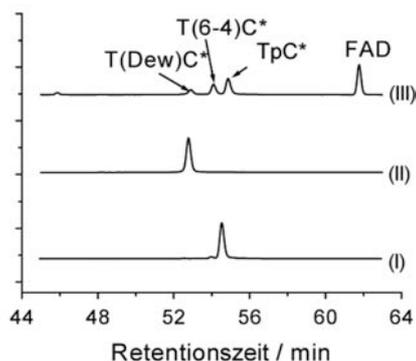


Abbildung 4.2: Reparaturassay der Wildtyp (6-4) Photolyase mit 5'-AGGT(Dew)C*GGC-3'. (I) HPL-Chromatogramm ungeschädigter DNA; (II) HPL-Chromatogramms vor Reparatur; (III) HPL-Chromatogramm nach Reparatur. Die Detektion der HPL-Chromatogramme erfolgte über die Absorption bei 260 nm.

Die Analyse dieser mittels HPLC erzielten Ergebnisse ergab ein unterschiedliches Reparaturverhalten der Wildtyp (6-4) Photolyase gegenüber den einzelnen Dewar-Isomeren. Die (6-4)-Photolyase aus *Drosophila* war in der Lage, die eingesetzte Menge an T(Dew)C-Schaden durch Umwandlung in die intakten Basen nach sieben Stunden vollständig umzusetzen. Jedoch konnte die hier verwendete (6-4) Photolyase, in Übereinstimmung mit der von *Todo* und *Iwai* untersuchten (6-4) Photolyase aus *Xenopus laevis*,^[243, 257] den T(Dew)T-Schaden auch nach verlängerter Belichtungszeit nicht reparieren. Bei der in **Abbildung 4.2** dargestellten T(Dew)C*-Reparatur konnte neben dem Edukt und dem reparierten DNA-Strang eine weitere Spezies, vermutlich eine T(6-4)C* Zwischenstufe, nachgewiesen werden. Um die erzeugten DNA-Stränge nach T(Dew)C*-Reparatur genauer zu charakterisieren, wurden der Assay nochmals in einem größeren Maßstab durchgeführt. Die Stränge wurden von *Dr. Andreas Glas* isoliert, enzymatisch abgebaut und mittels HPLC und HPLC-MS eindeutig als Edukt (Dewar-Schaden), Produkt (ungeschädigte DNA) beziehungsweise als (6-4) Intermediat nachgewiesen. Somit handelte es sich bei der Reparatur der Dewar-Schäden um eine zweistufige Katalyse. Im vorliegenden Fall wurde in einem ersten Schritt T(Dew)C* in den korrespondierenden (6-4) Schaden umgewandelt. Da die weitere Reparatur von T(6-4)C* in die intakten Basen sehr langsam läuft, reichert sich dieses als Intermediat an. Im Fall des natürlichen T(Dew)C-Schadens verhinderte die schnelle nachfolgende Reparatur des T(6-4)C-Schadens dessen Anreicherung und damit den Nachweis.

Anschließend sollte mit unterschiedlichen Kontrollexperimenten der Beweis erbracht werden, dass die (6-4) Photolyase für die beobachtete Reparatur der Dewar-Schäden verantwortlich war. Zum Einen wurde der Strang in Abwesenheit des Reparaturenzyms mit Weißlicht belichtet, um auszuschließen, dass es sich um eine rein photoinduzierte Umlagerung handelte. Des Weiteren wurde statt der (6-4) Photolyase eine vollständig reduzierte FADH⁻-Lösung verwendet. Dies sollte klären, ob die Umlagerung der Dewar-Schäden in ihre (6-4) Spezies und anschließend in die intakten Basen lediglich des reduzierten Cofaktors bedarf. In beiden Fällen konnte keine Reparatur beobachtet werden.

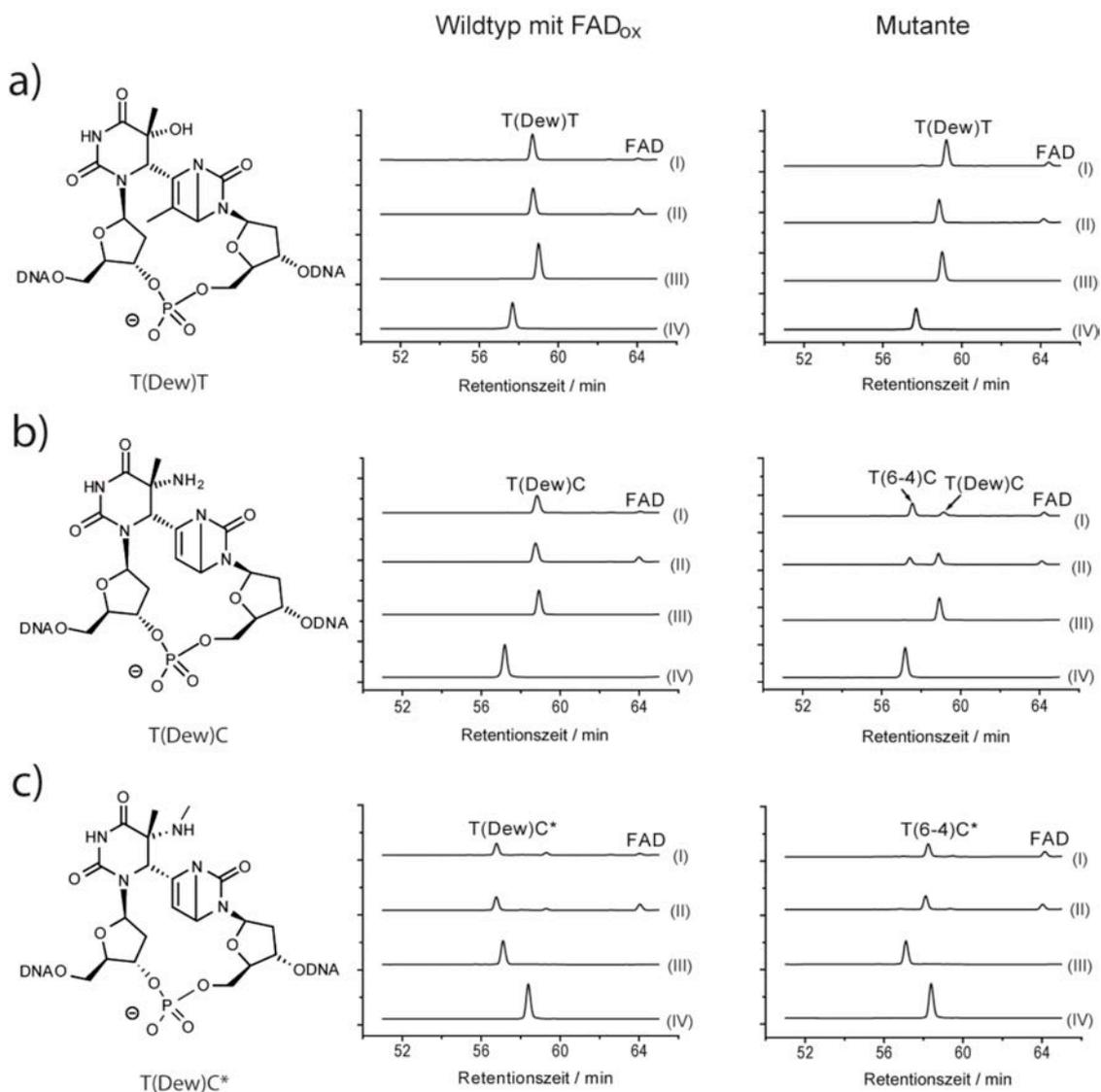


Abbildung 4.3: Reparatur der Dewar-Isomere durch oxidierte (6-4) Photolyase (Mitte) und der Mutante H365N (rechts). a) Reparatur von 5'-AGGT(Dew)TGGC-3'; b) Reparatur von 5'-AGGT(Dew)CGGC-3'; c) Reparatur von 5'-AGGT(Dew)C*GGC-3'. HPL-Chromatogramme mit 10 eq Enzym nach (I) 7 h und (II) 3 h Belichtung. (III) Chromatogramm der Stränge vor Reparatur. (IV) Chromatogramm der korrespondierenden (6-4) Photoprodukte. Die Detektion der HPL-Chromatogramme erfolgte über die Absorption bei 260 nm.

Um die Reparatur der Dewar-Schäden näher zu charakterisieren, wurden weitere enzymatische Untersuchungen durchgeführt. Versuche mit der (6-4) Photolyase, deren FAD-Cofaktor im oxidierten Zustand vorlag, sollten klären, ob die Reparatur von Dewar-Schäden durch Elektroneninjektion vom Cofaktor induziert wird. In der Tat konnte für keinen der Dewar-Schäden die Umwandlung in den korrespondierenden (6-4) Schaden beobachtet werden (siehe **Abbildung 4.3**, Mitte). Somit handelt es sich bei der enzymatischen Umwandlung von T(Dew)C bzw. T(Dew)C* um einen Elektronen katalysierten Prozess. Die (6-4) Photolyase ist demnach in der Lage, durch Injektion eines Elektrons in den Dewar-Schaden die 4π sigmatrope Umlagerung, welche zur Schadensbildung führte, wieder umzukehren. Zudem wurden Reparaturassays mit einer H365N-Mutante der (6-4) Photolyase aus *D. melanogaster* durchgeführt, welche nicht in der Lage ist, (6-4) Schäden zu reparieren. Dies sollte zur Anreicherung des postulierten und für die T(Dew)C*-Reparatur bereits nachgewiesenen (6-4) Intermediats führen. Die entsprechenden (6-4) Intermediate konnten auf diese Weise in der Tat sowohl für die Reparatur von T(Dew)C als auch für T(Dew)C* angereichert werden (siehe **Abbildung 4.3 b** und **c**, rechts). Die Bildung des T(6-4)T konnte hingegen nicht beobachtet werden, welches einen weiteren Nachweis für die fehlende Reparatoreigenschaft der (6-4) Photolyase gegenüber T(Dew)T lieferte (**Abbildung 4.3 a**, rechts).

Mit diesen Studien konnte neben der (6-4) Photoreaktivierung eine zweite enzymatische Aktivität der (6-4) Photolyasen bestimmt werden. Es handelt sich dabei um die 4π sigmatrope Umlagerung von Dewar-Schäden zu ihren korrespondierenden (6-4) Isomeren, welche anschließend in die reparierten Dinukleotide gespalten wird. Beide Prozesse sind lichtabhängig. Die ausbleibende Reparatur des T(Dew)T-Schadens erklären wir derzeit mit dem Vorliegen eines recht elektronenreichen Ringsystems der 5'-Base des Dinukleotidschadens erklärt werden, welche möglicherweise den Elektronentransfer vom Enzym-Cofaktor unmöglich macht.

4.3.2 CHARAKTERISIERUNG DES ÜBERGANGSZUSTANDES BEI DER DEWAR-REPARATUR

Um den Reparaturmechanismus weiter aufzuklären und insbesondere die unterschiedlichen Reparatureigenschaften zwischen T(Dew)T und T(Dew)C zu verstehen, wurde eine Reihe synthetischer Dewar-Derivate hergestellt. Die in **Abbildung 4.4** dargestellten Dewar-Schäden in DNA-Strängen wurden von *Korbinian Heil* hergestellt und sollten mit ihren unterschiedlichen Elektronendichten des 5'-Ringsystems deren Einfluss auf die Reparaturfähigkeit des jeweiligen Schadens aufklären. Die Unterschiede in den Elektronendichten sollten dabei durch unterschiedliche Substituentenmuster der Basen ermöglicht werden. Daher wurden zum Einen die natürlichen Dewar-Schäden T(Dew)T und T(Dew)C verwendet, welche über unterschiedliche Substituenten an der C5-Position (T:-Me,-OH; C:-Me, -NH₂,) sowie C5'-Position (T:-Me; C:-H) verfügten. Zusätzlich wurden die Dewar-Derivate T(Dew)U und T(Dew)meC getestet, welche Hybrid-Substitutionsmuster an den Positionen C5 und C5' etablieren. T(Dew)U und T(Dew)meC wurden, analog zur Herstellung der natürlichen Schäden, durch zweistufige Belichtung und Aufreinigung der jeweiligen Stränge mit mittigen TpU- und TpmeC- (meC: 5-Methylcytosin) Sequenzen gewonnen. Die Stränge wurden in Reparaturassays mit äquimolaren Mengen an (6-4) Photolyase eingesetzt und über HPLC-Analyse ausgewertet.

Wie aus **Abbildung 4.4** zu entnehmen ist, ergab sich aus den Messungen eine abnehmende Reparaturaktivität des Enzyms gegenüber den Substraten in der Reihenfolge T(Dew)C > T(Dew)U > T(Dew)meC > T(Dew)T heraus, wobei wie erwartet keine Reparatur des T(Dew)T-Schadens stattfand. In keinem Assay konnte das jeweilige (6-4) Intermediat nachgewiesen werden. Dies deutet auf eine langsame 4 π sigmatrope Umlagerung der Dewar-Schäden hin, welche von einer schnell ablaufenden Reparatur der (6-4) Spezies in die intakten Basen gefolgt wird. Die Reihenfolge, in der die angebotenen Substrate von der (6-4) Photolyase repariert werden, bekräftigte die Ausgangshypothese, welche der Methylgruppe an der C5'-Position eine wichtige Rolle zusprach. Demzufolge erhöht dieser Substituent die Elektronendichte im Dewar-Schaden und reduziert die Möglichkeit der Einelektroneninduktion durch den reduzierten und lichtangeregten Cofaktor.

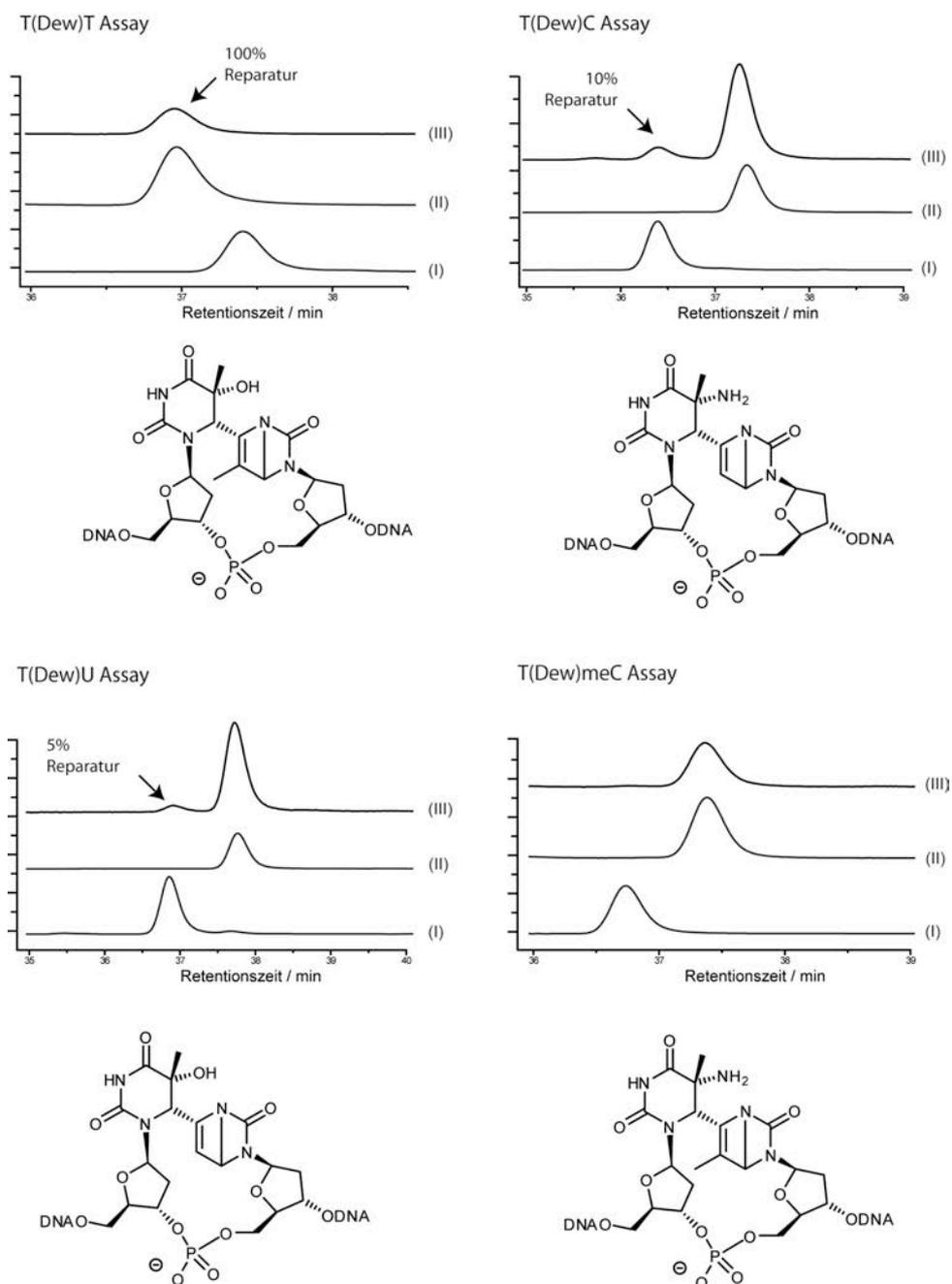


Abbildung 4.4: Reparaturassays der Wildtyp (6-4) Photolyase mit den Dewar-Isomeren T(Dew)T, T(Dew)C, T(Dew)U und T(Dew)T. (I) HPL-Chromatogramm der Assays nach 1 h Belichtung; (II) HPL-Chromatogramm vor Reparatur; (III) HPL-Chromatogramm des ungeschädigten Strangs. Die Detektion der HPL-Chromatogramme erfolgte über die Absorption bei 260 nm.

Diese Beobachtung konnten durch *ab initio* Berechnungen in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Regina De Vivie-Riedle gestützt werden. Hierzu berechnete Dr. Benjamin Fingerhut die Aktivierungsenergien und die Stabilisierung der Übergangszustände, wie sie bei der Reparatur der Dewar-Isomere gebildet werden, in Abhängigkeit der C5'-Methylgruppe. Sowohl die durchgeführten Berechnungen in wässriger Umgebung mittels des *polarizable continuum model* (PCM) als auch in

enzymatischer Umgebung mittels QM/MM zeigten, dass die Methylgruppe an C5' den Übergangszustand destabilisiert, welches die Aktivierungsenergie heraufsetzt. Es konnte gezeigt werden, dass hierfür ein hyperkonjugativer Effekt verantwortlich ist.

5 MATERIALIEN UND METHODEN

5.1 ALLGEMEINE CHEMIKALIEN UND LÖSUNGSMITTEL

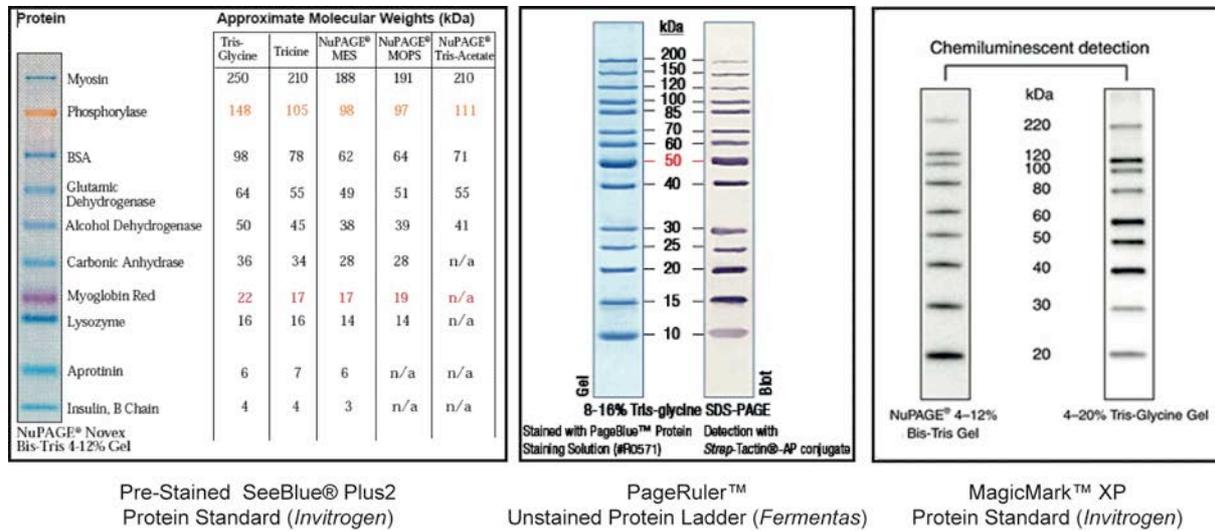
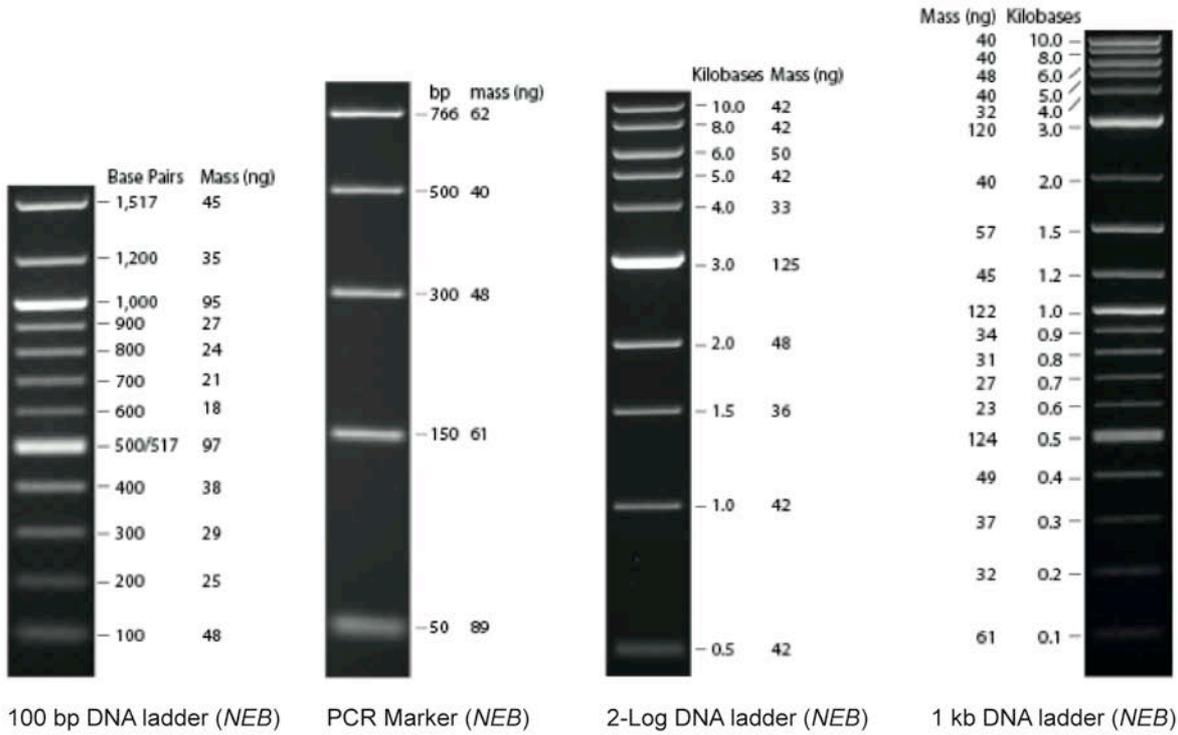
Alle Laborchemikalien und Lösungsmittel wurden in Biochemika-Qualität von *AppliChem* (Darmstadt), *Boehringer* (Mannheim), *Merck* (Darmstadt), *Roth* (Karlsruhe) und *Sigma/Aldrich/Fluka* (Deisenhofen) bezogen.

5.2 GERÄTE

Gerät	Geräte-Typ, Hersteller
<i>Agarose-Gelkammern</i>	Mini Sub-Cell GT MINI, <i>Bio-Rad</i> (München)
<i>Analysenwaage</i>	Sartorius MC1 Typ RC210P, <i>Sartorius</i> (Göttingen)
<i>Elektrotransformator</i>	MicroPulser™, <i>BIO-RAD</i> (München)
<i>FPLC-System</i>	Äkta Purifier, <i>GE Healthcare</i> (München)
<i>French-Press Zellaufschlusskammer</i>	FRENCH® PRESSURE CELL PRESS Typ FA-078AE, <i>Thermo Electron Corporation</i> (Dreieich)
<i>Gel-Belichtungsapparatur</i>	Transilluminator UVT-28 S/M, <i>Herolab</i> (Wiesloch)
<i>Gel-Belichtungsapparatur</i>	IDA 1_2, <i>raytest</i> (Straubenhardt)
<i>Hochdruckhomogenisator</i>	EmulsiFlex-05, <i>AVESTIN</i> (Ottawa)
<i>Inkubator</i>	INCUBATOR IS, <i>noctua</i> (Wiesloch)
<i>Inkubator</i>	innova® 44 Incubator Shaker Series, <i>NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC</i> (New Brunswick)
<i>Kolbenhubpipetten</i>	eppendorf reference, <i>eppendorf</i> (Hamburg)
<i>Laborwaage</i>	Sartorius MC1 Typ LC620D-00V1, <i>Sartorius</i> (Göttingen)
<i>Lyophille</i>	Lyophille Alpha 2-4 LD plus, <i>Christ</i> (Osterode)
<i>NanoDrop</i>	ND-1000 UV/VIS, <i>peqlab</i> (Erlangen)
<i>pH-Elektrode</i>	BlueLine 16 pH, <i>SCHOTT Instruments</i> (Mainz)
<i>pH-Meter</i>	MP220, <i>METTLER TOLEDO</i> (Schwerzenbach)
<i>Photometer</i>	BioPhotometer, <i>eppendorf</i> (Hamburg)

<i>Rotor</i>	SORVALL SLA-3000 SUPER-LITE®, <i>Thermo Electron Corporation</i> (Dreieich)
<i>Rotor</i>	SORVALL SS-34, <i>Thermo Electron Corporation</i> (Dreieich)
<i>Schwenkschüttler</i>	POLYMAX 104D, <i>Heidolph Instruments</i> (Kelheim)
<i>SDS-Gelkammern</i>	Mini-PROTEAN® 3 Cell, <i>Bio-Rad</i> (München)
<i>Thermoschüttler</i>	Thermomixer comfort, <i>eppendorf</i> (Hamburg)
<i>Speedvac</i>	Speedvac Plus, <i>Thermo Life Sciences</i> (Dreieich)
<i>Tiefkühlschrank</i>	VIP Series -86 °C, <i>SANYO</i> (Bad Nenndorf)
<i>Tischzentrifuge</i>	Heraeus BioFuge _{fresco} , <i>Thermo Electron Corporation</i> (Dreieich)
<i>Trans-Blotter</i>	TRANS-BLOT® SD SEMI-DRY TRANSFER CELL, <i>BIO-RAD</i> (München)
<i>Wasseraufbereitungsanlage</i>	Waters Millipore System, <i>Millipore</i> (Schwalbach)
<i>Zentrifuge</i>	eppendorf Centrifuge Typ 5810 R, <i>eppendorf</i> (Hamburg)
<i>Zentrifuge</i>	SORVALL Evolution RC, <i>Thermo Electron Corporation</i> (Dreieich)

5.3 DNA- UND PROTEINSTANDARDS



5.4 PLASMIDE OHNE INSERTS

pET-Duet1, *Novagen* (Schwalbach)

pACYC-Duet1, *Novagen* (Schwalbach)

pENTRY-IBA 10, *IBA GmbH* (Goettingen)

pPSG-IBA 33, *IBA GmbH* (Goettingen)

5.5 SPEZIELLE SYSTEME

5.5.1 PLASMIDPRÄPARATION AUS *E. COLI*:

5.5.1.1 peqGOLD Plasmid Miniprep Kit, *peqlab* (Erlangen)

Komponente	Zusammensetzung
Lösung I pH 8.0	50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 100 mg/mL RNase A
Lösung II	200 mM Natriumhydroxid, 1% (w/v) SDS
Lösung III pH 5.5	3 M Kaliumacetat
DNA-Waschpuffer pH 6.5	1.0 M NaCl, 50 mM MOPS, 15% (v/v) Ethanol
Elutionspuffer-Puffer pH 8.5	10 mM Tris

5.5.2 ISOLATION VON DNA AUS AGAROSEGELEN:

5.5.2.1 MinElute Gel Extraction Kit, *Qiagen* (Hilden)

Komponente	Zusammensetzung
QG-Puffer	mit pH-Indikator
PE-Puffer pH 6.5	1.0 M NaCl, 50 mM MOPS, 15 % (v/v) Ethanol
EB-Puffer pH 8.5	10 mM Tris-HCl

5.5.3 KOLONIERUNG:5.5.3.1 Zero Blunt[®] TOPO PCR Cloning Kit for Sequencing, *Invitrogen* (Karlsruhe)

Komponente	Zusammensetzung
pCR [®] 4Blunt-TOPO [®] Vektor	10 ng/μL
Salzlösung	1.2 M NaCl, 0.06 M MgCl ₂

5.5.3.2 StarGate[®] Standard Entry Cloning Set, *IBA GmbH* (Goettingen)

Komponente
pENTRY-IBA10
StarSolution E

5.5.3.3 StarGate[®] Transfer Reagent Set, *IBA GmbH* (Goettingen)

Komponente
Destinations-Vektor
StarSolution A1
StarSolution A2
StarSolution A3

5.5.4 ORTSSPEZIFISCHE MUTAGENESE:

5.5.4.1 QuikChange[®] Site-Directed Mutagenesis Kit, *Agilent Technologies* (Santa Clara, CA, USA)

Komponente

PfuUltra[™] HF DNA Polymerase (2.5 U/μL)

10x PfuUltra[™] HF Reaktionspuffer

DpnI Restriktionsenzym (*NEB*, 20 U/μL)

XL10-Gold ultrakompetente Zellen

XL10-Gold β-Mercaptoethanol (β-ME) Mix

5.6 ENZYME UND ANTIKÖRPER

Alle Restriktionsenzyme wurden, wenn nicht anders beschrieben, von *New England Biolabs* (*NEB*, Frankfurt) bezogen. Phusion[®] Hot Start DNA-Polymerase ist ein Produkt von *Thermo Fisher Scientific* (Dreieich), KOD-XL Polymerase von *Novagen* (Darmstadt) und PfuUltra[™] HF DNA-Polymerase von *Agilent Technologies* (Santa Clara, CA, USA). Verwendete Ligase, *Antarctic* Phosphatase und andere DNA-modifizierende Enzyme wurden von *NEB* bezogen. Anti-GFP Antikörper (polyklonal, aus Hasen) wurde ebenfalls bei *NEB* (*Cell Signaling Technology*[®]) gekauft. Anti-*Rabbit* HRP-Konjugat ist ein Produkt von *Sigma Aldrich* (Deisenhofen).

5.7 PUFFER

DNaseI-Puffer:

10 mM Tris-HCl pH 7.6, 2.5 mM MgCl₂, 0.5 mM CaCl₂

Strep-Puffer A und B:

Puffer A: 100 mM Tris, 150 mM NaCl, 1mM Na₂EDTA

Puffer B: 2.5 mM Desthiobiotin in Puffer A

His-Puffer A und B:

50 mM Tris-HCl pH 7.4, 500 mM NaCl

Puffer A: 20 mM Imidazol

Puffer B: 250 mM Imidazol

Heparin-Puffer A und B:

50 mM Tris-HCl pH 7.6 bzw. pH 7.4, 1 mM Na₂EDTA, 5% (v/v) Glycerin, (5 mM DTT)

Puffer A: 100 mM NaCl

Puffer B: 800 mM NaCl

YFP-Puffer A und B:

Puffer A: 10 mM Tris-HCl pH 8, 2 mM Na₂EDTA

Puffer B: 1 M NaCl in Puffer A

Polk-Reaktionspuffer:

10 mM Tris-HCl pH 7.4, 1 mM Na₂EDTA, 5% (v/v) Glycerin, 450 mM NaCl

Primerverlängerungs-Puffer:

25 mM Tris-HCl pH 7.5, 5 mM MgCl₂, 0.05 mg/mL BSA, 1 mM DTT, 10% Glycerin

50x TAE Puffer:

2 M Tris-Acetat pH 8.3, 100 mM Na₂EDTA

10x SDS Laufpuffer:

0.25 M Tris, 1.92 M Glycin, 1% (w/v) SDS

Western-Blot Transferpuffer:

48 mM Tris, 39 mM Glycin, 0.0375% (w/v) SDS, 20% (v/v) Methanol

10x PBS Puffer: pH 7.2

40 mM KH_2PO_4 , 160 mM Na_2HPO_4 , 1.15 M NaCl

PBS-T Puffer:

1x PBS Puffer pH 7.2, 0.1% (v/v) Tween 20

10x Agarosegel-Auftragspuffer:

50.0% (v/v) Glycerin, 0.2% (w/v) SDS, 0.05% (w/v) Bromphenolblau, 0.05% (w/v) Xylencyanol FF

2x SDS-Auftragspuffer:

62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 4.0% (w/v) SDS, 20.0% (w/v) Glycerin, 5.0% (w/v) β -Mercaptoethanol

5.8 LÖSUNGEN

12%-iges SDS Trenngel:

6.6 mL ddH₂O, 8 ml Acrylamid-Lösung (30%, *Roth*), 5 mL 1.5 M Tris pH 8.8, 200 μL 10%-ige (w/v) SDS-Lösung, 200 μL 10%-ige (w/v) APS-Lösung, 20 μL TEMED

5%-iges SDS Sammelgel:

5.5 mL ddH₂O, 1.3 mL Acrylamid-Lösung (30%, *Roth*), 1 mL 1 M Tris-HCl pH 6.8, 80 μL 10%-ige (w/v) SDS-Lösung, 80 μL 10%-ige (w/v) APS-Lösung, 8 μL TEMED

Bradfordlösung:

0.01% (v/v) *Coomassie-Brilliant-Blau G 250*, 5.0% (v/v) Ethanol, 10.0% (v/v) H_3PO_4 (85%-ig)

Coomassie Färbelösung:

0.25% (w/v) Coomassie, 10% (v/v) Essigsäure, 20% (v/v) Ethanol

Coomassie Entfärberlösung:

10% (v/v) Essigsäure, 20% (v/v) Ethanol

Amidoblack Färbelösung:

90% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Essigsäure, *Amidoblack* 10B (Zugabe bis OD₆₁₅ 10)

Amidoblack Waschlösung:

90% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Essigsäure

2x TBE-Harnstoff Auftragspuffer:

12% (v/v) Ficoll, 0.01% (w/v) Bromophenolblau, 0.02% (w/v) Xylencyanol FF, 7 M Harnstoff in TBE- buffer

10x TBE Puffer:

89 mM Tris-HCl pH 8.0, 89 mM Borsäure, 20 mM EDTA

20% denaturierende PAGE:

32 mL Rotiphorese Sequenziergel-Konzentrat (*Bio-Rad*), 4 mL 8.3 M Harnstoff, 4 mL 10x TBE, 200 µL 10% APS, 20 µL TEMED

5.9 MEDIEN

LB-Medium

1% (w/v) Pepton, 0.5% (w/v) Hefeextrakt, 1% (w/v) NaCl

TB-Medium:

1.2% (w/v) Pepton, 2.4% (w/v) Hefeextrakt, 0.4% (v/v) Glycerin; nach Autoklavieren:
17 mM KH_2PO_4 , 72 mM K_2HPO_4

LB-Agar:

LB-Medium mit 1.5% (w/v) Agar

S.O.C.-Medium:

0.5% (w/v) Pepton, 0.5% (w/v) Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl; pH 7.2; nach
Autoklavieren: 5.0 mM MgCl_2 , 5.0 mM MgSO_4

Autoinduktions-Medium (AI-Medium):

LB-Medium ohne Salz [1% (w/v) Pepton, 0.5% (w/v) Hefeextrakt], 1% (v/v) Glycerin,
0.1% (w/v) Glucose, 0.35% (w/v) Lactose, 2 mM MgSO_4 in Puffer [50 mM Na_2HPO_4 ,
50 mM KH_2PO_4 , 25 mM $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$]

(LB-Medium ohne Salz, Puffer sowie Lösungen wurden in konzentrierter Form
einzeln angesetzt, sterilisiert und vor Gebrauch zusammengegeben)

5.10 ANTIBIOTIKA (1000X STOCKLÖSUNGEN)

Carbenicillin: 100 mg/ml in ddH₂O

Chloramphenicol: 34 mg/ml in Ethanol_{abs.}

Kanamycin: 2.5 mg/ml in ddH₂O

5.11 INDUKTIONSMITTEL ZUR PROTEINEXPRESSION

IPTG (1000x Stocklösung): 1 M in ddH₂O

Anhydrotetracyclin (100x Stocklösung): 2mg/mL in DMF

5.12 *E. COLI*-STÄMME

Stamm	Genotyp	Hersteller
One Shot® Top10	F ⁻ , <i>mcrA</i> (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) 80 <i>lacZ</i> M15 <i>lacX74</i> <i>recA1</i> <i>ara</i> 139 (<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU</i> <i>galK</i> <i>rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1</i> <i>nupG</i>	Invitrogen, Karlsruhe
NEB5α	F ⁻ , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (rK ⁻ mK ⁺), <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA1</i> , <i>gyrA</i> (Nal ^r), <i>relA1</i> , Δ(<i>lacZYAargF</i>), U169 <i>deoR</i> (Φ <i>dlacD</i> (<i>lacZ</i>))	NEB (Frankfurt)
NEB-Turbo	F ⁺ , <i>proA</i> ⁺ <i>B</i> ⁺ <i>lacIq</i> Δ <i>lacZ</i> M15/ <i>fhuA2</i> Δ(<i>lac-proAB</i>) <i>glnV</i> <i>zgb-210::Tn10</i> (Tet ^R) <i>endA1</i> <i>thi-1</i> Δ(<i>hsdSmcrB</i>)5	NEB (Frankfurt)
T7 Express	<i>fhuA2</i> <i>lacZ::T7</i> <i>gene1</i> [<i>lon</i>] <i>ompT</i> <i>gal</i> <i>sulA11</i> R(<i>mcr-73::miniTn10--Tet^S</i>)2 [<i>dcm</i>] R(<i>zgb-210::Tn10--Tet^S</i>) <i>endA1</i> Δ(<i>mcrC-mrr</i>)114:: <i>IS10</i>	NEB (Frankfurt)
Rosetta™ 2(DE3)	F ⁻ <i>ompT</i> <i>hsdS_B</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>gal</i> <i>dcm</i> (DE3) pRARE2 (Cam ^R)	Novagen (Schwalbach)
BL21 (DE3)GOLD	F ⁻ <i>ompT</i> <i>hsdS</i> (r ⁻ m ⁻) <i>dcm</i> ⁺ Tet ^f <i>gal</i> λ(DE3) <i>endA</i> Hte	Agilent Technologies (Santa Cruz, CA)
XL10-Gold	TetrD(<i>mcrA</i>)183 D(<i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i>)173 <i>endA1</i> <i>supE44</i> <i>thi-1</i> <i>recA1</i> <i>gyrA96</i> <i>relA1</i> <i>lac</i> Hte [F ⁺ <i>proAB</i> <i>lacIqZDM15</i> Tn10 (Tetr) Amy Cam ^r]	Agilent Technologies (Santa Cruz, CA)

5.13 MIKROBIOLOGISCHE METHODEN

5.13.1 TRANSFORMATION CHEMISCH-KOMPETENTER *E. COLI*-ZELLEN

50 µL chemisch-kompetente *E. coli* (Lagerung bei -80 °C) sowie das zu transformierende Plasmid (Lagerung bei -20 °C) wurden ca. 5 min auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden 50-100 ng Plasmid-DNA zu den chemisch-kompetenten Zellen gegeben und 30 min auf Eis inkubiert, bevor der Hitzeschock zur Aufnahme der DNA für 30 s bei 42 °C erfolgte. Die Zellen wurden für weitere 2 min auf Eis inkubiert, anschließend in 950 µL S.O.C.-Medium aufgenommen und für 1 h bei 37 °C in einem Thermoschüttler bei 400 rpm regeneriert. Anschließend wurde die Zellsuspension für 1 min bei 10,250x g abzentrifugiert, der Überstand verworfen, das Zellpellet in 50 µL Medium resuspendiert und auf eine bei 37 °C vorgewärmte LB-Agaroseplatte mit entsprechendem Antibiotikum ausgestrichen. Die angeimpfte Platte wurde bei 37 °C

über Nacht inkubiert. Zur kurzzeitigen Lagerung wurde diese mit Parafilm verschlossen und bei 4 °C aufbewahrt.

5.13.2 TRANSFORMATION ELEKTROKOMPETENTER *E. COLI*-ZELLEN

50 µL elektrokompetente *E. coli*-Zellen (Lagerung bei -80 °C) sowie das zu transformierende Plasmid (Lagerung bei -20 °C) wurden ca. 5 min auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden ca. 50-100 ng Plasmid-DNA zu den elektrokompetenten Zellen gegeben und 1 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette überführt und am Elektroporator mit einem Spannungsimpuls behandelt. Nach Aufnahme in 950 µL S.O.C.-Medium wurden diese zur Regenerierung 1 h bei 37 °C in einem Thermoschüttler bei 400 rpm inkubiert. Die Zellsuspension wurde 1 min bei 13000 rpm in einer Tischzentrifuge zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Zellpellet in 50 µl Medium resuspendiert und auf eine bei 37 °C vorgewärmte LB-Agaroseplatte mit entsprechendem Antibiotikum ausgestrichen. Die angeimpfte Platte wurde bei 37 °C über Nacht inkubiert. Zur kurzzeitigen Lagerung wurde diese mit Parafilm verschlossen und bei 4 °C aufbewahrt.

5.13.3 HERSTELLUNG VON ÜBERNACHT-KULTUREN

Für *E. coli*-Übernachtskulturen (ÜN-Kulturen) wurden 5 mL LB- oder TB-Medium mit dem zur Selektion nötigem Antibiotikum versetzt und in ein 12 ml *SnapCap* gegeben. Zum Animpfen wurde mit einer sterilen Pipettenspitze die gewünschte Bakterienkolonie von einer Agar-Platte in das Kulturröhrchen überführt. Die Kultur wurde ca. 16 h bei 37 °C und 200 rpm im Schüttler inkubiert.

5.13.4 INDUKTION DER PROTEINEXPRESSION

Zur Herstellung des Proteins wurde das jeweilige Expressionsplasmid in den geeigneten *E. coli*-Expressionsstamm transformiert und als 5 mL-ÜN-Kultur kultiviert. Am nächsten Tag wurde diese Kultur in 1 L Medium überführt, welches zur Selektion der gewünschten Zellen mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt worden war. Die Kultivierung erfolgte bei 37 °C in geeigneten Kulturkolben, die eine optimale

Sauerstoffversorgung ermöglichen. Je nach Protein wurden unterschiedliche Proteinexpressionsbedingungen gewählt, die im Folgenden aufgeführt sind.

Protein	Expressionsstamm	Medium	Induktion	Expression
<i>dm phr(6-4)</i>	Rosetta™ 2(DE3)	TB-Medium 5x 1 L	bei OD 1; 2 mg/L Anhydrotetracyclin	16 h bei 16 °C
wt-YFP	T7 Express	LB-Medium 2x 1 L	bei OD 0.6; 2 mg/L Anhydrotetracyclin	3 h bei 37 °C
mut-YFP	T7 Express	LB-Medium 2x 1 L	bei OD 0.6; 238 mg/L IPTG	3 h bei 37 °C
wt-/mut-polk	T7 Express	AI-Medium 2x 0.5 L	nach 4 h (Verbrauch der Glucose)	16 h bei 25 °C

Nach der Expression wurden die Bakteriensuspensionen in Zentrifugenbecher überführt und für 8 min bei 108,166x g zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen anschließend bis zum Zellaufschluss bei -20 °C gelagert.

5.13.5 ZELLAUFSCHLUSS IM DURCHFLUSSHOMOGENISATOR

Um Zellen aus größeren Expressionsansätzen aufzuschließen, wurde der Durchflusshomogenisator verwendet. Hierzu wurden die Zellpellets in Aufschlusspuffer und einer Tablette *Protease Inhibitor Complete EDTA-free (Roche)* resuspendiert (Endvolumen ca. 50 mL). Zum Kühlen wurde der Homogenisator zunächst mit 4 °C kaltem Aufschlusspuffer durchgespült. Bei einem Druck in der Homogenisatorkammer von 10,000-15,000 psi erfolgte der Zellaufschluss in zwei bis drei Durchgängen. Anschließend wurde die Suspension bei 38,724x g für 30 min bei 4 °C zentrifugiert und das Lysat für die weitere Aufreinigung vorbereitet.

5.13.6 ZELLAUFSCHLUSS IN DER *FRENCH-PRESS*

Der Zellaufschluss erfolgte alternativ über die *French-Press*. Dafür wurden die Zellpellets im Aufschlusspuffer und einer Tablette *Protease Inhibitor Complete EDTA-free (Roche)* resuspendiert (Endvolumen ca. 30 mL). Die Zellsuspension wurde in den eisgekühlten Zylinder der *French-Press* überführt. Alle Teile der *French-Press*, die mit der Zellsuspension in Berührung kamen, wurden ebenfalls auf

Eis vorgekühlt. Der Aufschluss erfolgte bei einem maximalen Druck von 1,500 psi. Durch ein Ventil wurden die aufgeschlossenen Zellen abgeführt und in einem 50-mL-Gefäß auf Eis gelagert. Dieser Vorgang wurde je nach Aufschlussgrad der Zellen drei bis vier Mal wiederholt. Die weitere Aufarbeitung des Zelllysats erfolgte analog zum Aufschluss mittels des Hochdruckhomogenisators.

5.14 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN

5.14.1 POLYMERASE KETTEN REAKTION (*POLYMERASE CHAIN REACTION, PCR*)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) ist die enzymatische Amplifizierung von definierten DNA-Abschnitten mit Hilfe kurzer DNA-Oligonukleotide (*Primer*). In diesem zyklischen Prozess, bestehend aus Denaturierung des Templats, *Primer-Annealing* und *Primer-Elongation*, wird die Menge des DNA-Abschnitts theoretisch bei jedem Zyklus verdoppelt. Die *Annealing*-Temperatur (T_M) des *Primers* lässt sich empirisch bestimmen. Hierbei werden die Gesamtlänge des *Primers* sowie dessen Zusammensetzung (GC-Gehalt) betrachtet. Überhängenden Anteile werden dabei nicht berücksichtigt. Für die verwendete Phusion[®] Hot Start DNA-Polymerase (*Thermo Scientific*) wurden zusätzlich 3 °C zu dem ermittelten Wert addiert.

Der Erfolg der PCR und somit der Erhalt des gewünschten PCR-Produkts sind stark abhängig von der Konzentration des eingesetzten Templats, weshalb standardmäßig drei verschiedene Templat-Konzentrationen eingesetzt wurden (10-100 ng). Die Amplifizierung von *phr (6-4)* aus cDNA von *Drosophila melanogaster* wurde von Dr. Melanie Maul durchgeführt und bereits beschrieben. Die Zusammensetzung der PCR-Reaktionen mit der Phusion[®] Hot Start DNA-Polymerase (*Thermo Scientific*) sowie das Schema des PCR-Programms sind wie folgt.

Komponente	Menge
DNA-Templat	x μL
5x Phusion GC Reaktionspuffer	10 μL
10 mM dNTPs	5 μL
10 μM <i>forward</i> Primer	2 μL
10 μM <i>reverse</i> Primer	2 μL
Phusion® Hot Start DNA-Polymerase	1 μL
ddH ₂ O	(30-x) μL

Zyklus	Anzahl	Dauer	Temperatur
Denaturierung	1	5 min	98 °C
Denaturierung	20	30 s	98 °C
<i>Annealing</i>		30 s	(T_M+3) °C
Elongation		20 s/kb	72 °C
Elongation	1	40 s/kb	72 °C
Reaktions-Ende	1	-	4 °C

5.14.2 ORTSGERICHTETE MUTAGENESE

Die von der Firma *Stratagene (Agilent Technologies)* vertriebene QuikChange® Methode zur ortsgerechten Mutagenese basiert auf der enzymatischen Amplifizierung von zirkulärer Plasmid-DNA mit Primern, welche durch Fehlpaarung an der gewünschten Nukleotidsequenz einen Basenaustausch generieren. Mit Hilfe dieser Methode können je nach verwendeten Primern Basen (und somit Aminosäuren des Genprodukts) ausgetauscht, entfernt oder eingefügt werden. Auch die gleichzeitige Mutation mehrerer benachbarter Basen (Aminosäuren) ist möglich.

5.14.2.1 Amplifizierungsreaktion

Zur Amplifizierung der DNA wurde die vom Hersteller empfohlene PfuUltra® HF DNA Polymerase sowie nach Herstellerempfehlung entworfene *forward* und *reverse*

Primer verwendet. Diese wurden so gewählt, dass sie komplementär zueinander im gewünschten Sequenzkontext am Templat anlagern. Es wurden standardmäßig Primer der Länge von 25-45 bp und der Schmelztemperatur von ca. 79 °C eingesetzt. Schmelztemperaturen (T_M) wurden nach der vom Hersteller vorgegebenen Formel berechnet:

$$T_M = 81.5^\circ\text{C} + 0.41 \cdot GC(\%) \cdot \frac{675}{MM(\%)}$$

GC: GC-Gehalt des Primers in % *MM*: Anteil der Fehlpaarungen im Primer in %

Das Pipettierschema der PCR-Reaktionen und das PCR-Programm zur ortsspezifischen Mutagenese sind in den nachfolgenden Tabellen aufgeführt.

Komponente (für 50 µl PCR-Ansatz)	Menge
ddH ₂ O	37 µl
10x PfuUltra [®] HF Reaktionspuffer	5 µl
10 mM dNTPs	2 µl
10 µM <i>forward</i> Primer	2 µl
10 µM <i>reverse</i> Primer	2 µl
PfuUltra [®] HF DNA Polymerase	1 µl
Templat-Plasmid (25 ng/µl)	1 µl

Zyklus	Anzahl	Dauer	Temperatur
Denaturierung	1	3 min	95 °C
Denaturierung		1 min	95 °C
<i>Annealing</i>	20	1 min	55 °C
Elongation		1 min/kb	72 °C
Elongation	1	2 min/kb	72 °C
Reaktions-Ende		-	4 °C

Der Erhalt des PCR-Produkts wurde durch Agarosegelelektrophorese mit 10 µl der PCR-Reaktion nachgewiesen.

5.14.2.2 DpnI-Verdau

Die Produkte dieser PCR-Methode sind mutierte Plasmide mit versetzten Einzelstrang-Brüchen, welche sich vom eingesetzten Templat durch fehlende Methylierung der Nukleobasen unterscheiden. Durch Behandlung des Templat/PCR-Produkt-Gemischs mit dem Methylierungs-sensitiven Restriktionsenzym DpnI kann daher selektiv das Templat degradiert werden. Hierzu wurden zunächst 1 µl DpnI (*NEB*) zu 40 µl der PCR-Reaktion gegeben und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden erneut 1 µl DpnI zur PCR-Reaktion hinzugegeben und für 3 h bei 37 °C inkubiert. Das PCR-Produkt wurde anschließend über das *PCR Purification Kit (Qiagen)* von überschüssigen Primern, Nukleotiden, DNA-Abbauprodukten und den eingesetzten Enzymen gereinigt. Das PCR-Produkt wurde hierzu mit 200 µl PB-Puffer gemischt und an eine *QIAquick spin column* durch Zentrifugation in einer Tischzentrifuge bei 13,000 rpm für 1 min gebunden. Die Säule wurde durch jeweilige Zentrifugation bei 13,000 rpm für 1 min zwei Mal mit 750 µl PE-Puffer gewaschen und anschließend getrocknet. Durch Zugabe von 30 µl EB-Puffer und Zentrifugation nach obigen Bedingungen wurde die DNA eluiert.

5.14.2.3 Transformation in XL10-Gold ultrakompetente Zellen

Zur *in vivo*-Ligation der Einzelstrangbrüche sowie zur Amplifizierung des mutierten Plasmids wurde das PCR-Produkt nach Herstellerangaben in XL10-Gold® ultrakompetente *E. coli*-Zellen transformiert. Hierzu wurden 50 µl der Zellen auf Eis aufgetaut und mit 2 µl β-ME *mix* versetzt. Nach vorsichtigem Durchmischen wurden die Zellen für weitere 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 2 µl des DpnI-behandelten und aufgereinigten PCR-Produkts zu den Zellen gegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte für 30 s bei 37 °C. Nach Abkühlen der Zellen für 2 min auf Eis wurden diese in 950 µl S.O.C.-Medium aufgenommen und für 1 h bei 37 °C und 200 rpm regeneriert. Die Zellsuspension wurde 1 min bei 13,000 rpm in einer Tischzentrifuge zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Zellpellet in 50 µl Medium resuspendiert und auf eine bei 37 °C vorgewärmte LB-Agaroseplatte mit entsprechendem Antibiotikum ausgestrichen. Die angeimpfte

Platte wurde bei 37 °C über Nacht inkubiert. Anschließend wurden bis zu sechs Kolonien zur Amplifizierung der Plasmid-DNA als Übernacht-Kulturen kultiviert. Die Plasmid-DNA wurde, wie in *Abschnitt 5.5.1* beschrieben, isoliert und die eingeführte Mutation durch Sequenzierung verifiziert.

5.14.3 ITERATIVE SATURIERUNGS-MUTAGENESE (ISM)

Die Iterative Saturierungsmutagenese (ISM) wurde von *Prof. Dr. Manfred T. Reetz* entwickelt^[16, 258-260] und sieht die sukzessive Randomisierung ausgesuchter Proteinreste vor. Die ISM basiert auf der Annahme, dass die für die Enzymaktivität wichtigen Reste einen kooperativen Effekt haben. Die Mehrfachmutante mit der gewünschten Eigenschaft könne daher sukzessiv erzeugt werden, indem nacheinander wenige Reste durch Saturierung optimiert werden. Diese dienen anschließend als Ausgangspunkt für die Saturierung der noch zu optimierenden Reste. Pro Zyklus könne so ein *Hit* erzeugt werden, dessen optimierte Eigenschaft ein Vielfaches des jeweiligen Ausgangspunktes sei. Dabei spiele die Reihenfolge, in der die Aminosäuren nacheinander saturiert werden, eine geringe Rolle. Vielmehr werde am Ende unabhängig von der Sequenz der Randomisierung stets eine ähnliche Mehrfachmutante erzeugt, welche die gewünschte Enzymaktivität vorweist. Der Vorteil von ISM gegenüber der gleichzeitigen Saturierung aller zu optimierenden Positionen liegt in der geringen Größe der zu untersuchenden Gesamtbibliothek. Dies kann durch folgendes Rechenbeispiel verdeutlicht werden: Bei insgesamt sieben Positionen würde deren gleichzeitige NNK-Saturierung $32^7=3.4 \cdot 10^{10}$ unterschiedliche Kombinationsmöglichkeiten erzeugen (siehe unten). Saturiert man jedoch iterativ maximal zwei Positionen und verwendet für den nächsten Saturierungsschritt den *Hit* des vorangegangenen Zyklus, so wären nur noch $32^1+32^2+32^2+32^2=3104$ Klone für die Untersuchung der Positionen erforderlich.

In dieser Arbeit wurde ISM angewendet, um ausgewählte Reste der PyIRS mittels degenerierter Primer sukzessive zu randomisieren. Das Prinzip dieser Methode beruht auf der ortsgerichteten Mutagenese. Es wurden jedoch Primer ausgewählt, die statt eines definierten Codons eine NNK-Degenerierung an der gewünschten Position der Gen-Sequenz besaßen. Bei der NNK-Degenerierung werden die ersten beiden Positionen eines Triplet-Codons mit allen vier DNA-Basen stöchiometrisch besetzt (N-Degenerierung), wobei die letzte Base des Triplet-Codons entweder ein

Thymin oder ein Guanin (K-Degenerierung; komplementär: M-Degenerierung) sein kann. Hierdurch werden $4 \cdot 4 \cdot 2 = 32$ Codons erzeugt, die alle 20 natürlichen Aminosäuren und ein Stopp-Codon kodieren. Die Saturierung der ausgesuchten Aminosäuren erfolgte über mehrere Mutations-Reaktionen, bei der jeweils ein bis zwei Aminosäuren verändert wurden. Die Mutationsprodukte wurden mittels des YFP Expressions-Screenings auf verbesserten Einbau der unnatürlichen Aminosäure getestet. Die effektivsten PyIRS-Mutanten wurden sequenziert und in einer nächsten Mutations-Reaktion als Templat eingesetzt. Zur Durchführung dieser Reaktionen wurden zwei unterschiedliche Methoden angewendet. Die Saturierung einer Aminosäure oder mehrerer benachbarter Aminosäuren erfolgte über die QuikChange[®]-Methode. Das Pipettierschema dieser Saturierungs-Reaktion und das PCR-Programm waren wie folgt:

Komponente (für 50 µl PCR-Ansatz)	Menge
ddH ₂ O	26.5 µl
10 x KOD Hot Start Reaktionspuffer	5 µl
2 mM dNTPs	5 µl
2.5 µM <i>forward</i> NNK-Primer	5 µl
2.5 µM <i>reverse</i> MNN-Primer	5 µl
25 mM MgSO ₄	2 µl
KOD [®] Hot Start DNA Polymerase	0.5 µl
Templat-Plasmid (25 ng/µl)	1 µl

Zyklus	Anzahl	Dauer	Temperatur
Denaturierung	1	3 min	95 °C
Denaturierung		1 min	95 °C
<i>Annealing</i>	20	1 min	52-58 °C
Elongation		1 min/kb	72 °C
Elongation	1	2 min/kb	72 °C
Reaktions-Ende		-	4 °C

Im Falle mehrerer, nicht benachbarter Aminosäuren oder bei nicht erfolgreicher QuikChange[®]-Saturierung erfolgte die Mutations-Reaktion über die MegaPrimer-Methode. Hierbei wird in einer ersten PCR-Reaktion ein Abschnitt auf dem Plasmid über zwei Primer amplifiziert, der in einer zweiten PCR-Reaktion als QuikChange[®]-Primer eingesetzt wird. Beide PCR-Reaktionen erfolgten nacheinander in einem einzigen Reaktions-Ansatz. Folgendes Pipettierschema und PCR-Programm wurden für die Saturierungs-Mutagenese mittels der MegaPrimer-Methode angewendet:

Komponente (für 50 µl PCR-Ansatz)	Menge
ddH ₂ O	32.5 µl
10 x KOD Hot Start Reaktionspuffer	5 µl
2 mM dNTPs	5 µl
2.5 µM <i>forward</i> NNK-Primer	2 µl
2.5 µM <i>reverse</i> MNN-Primer	2 µl
25 mM MgSO ₄	2 µl
KOD [®] Hot Start DNA-Polymerase	0.5 µl
Templat-Plasmid (50 ng/µl)	1 µl

Zyklus	Anzahl	Dauer	Temperatur
Denaturierung	1	3 min	95 °C
Denaturierung	5	1 min	95 °C
<i>Annealing</i>		1 min	52-58 °C
MegaPrimer-Elongation		1 min/kb	72 °C
Denaturierung	20	1 min	95 °C
<i>Annealing</i> /Elongation		1 min/kb	68 °C
Elongation	1	2 min/kb	72 °C
Reaktions-Ende	1	-	4 °C

Die Analyse des PCR-Produkts über Agarosegelelektrophorese, DpnI-Verdau und Aufreinigung erfolgte wie in *Abschnitt 5.14.2.2* beschrieben. Die aufgereinigten PCR-Produkte wurden in elektrokompetente BL21(DE3)GOLD *E. coli*-Zellen (*Novagen*) transformiert und auf LB-Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert. Diese sogenannte Bibliothek wurde anschließend in YFP Expressions-*Screenings* eingesetzt.

5.14.4 YFP EXPRESSIONS-SCREENING

Nach Transformation der Plasmid-basierten PyIRS-Bibliothek in den *E. coli*-Expressionsstamm BL21(DE3)GOLD wurden einzelne Kolonien als Flüssigkulturen kultiviert und in Anwesenheit der unnatürlichen Aminosäure auf effizienten Einbau in YFP_{Lys114Amber} getestet. Hierzu wurden Einzelkolonien von der LB-Agarplatte entweder per Hand oder mit dem *colony picker* QPIX (*Genetix*) in 2 mL-*deep-well* Platten (*Nalgene*) überführt. In jedem *well* wurden zuvor 800 µL LB-Medium mit 100 µg/mL Carbenicillin vorgelegt. Die Kulturen wurden über Nacht bei 37 °C und 800 rpm in einem Vibrationsschüttler inkubiert. Bei der Saturierung einer Aminosäureposition wurden >90 Klone (eine 96 *well*-Platte mit Kontrollen) getestet. Die Größe der Bibliothek für die Saturierung von zwei Aminosäurepositionen war >1100 (12-14 96 *well*-Platten mit Kontrollen). Von diesen Vorkulturen wurden mit Hilfe eines Platten-Replikationsroboters je 100 µL in neue 2 mL-*deep-well* Platten überführt, in denen 900 µL LB, 100 µg/mL Carbenicillin, 1 mM IPTG, und 2 mM der unnatürlichen Aminosäure vorgelegt wurden. In Positivkontrollen wurden den Zellen ein bekanntes PyIRS-Substrat in einer Konzentration von 5 mM angeboten. In den Negativkontrollen wurde dem Medium keine unnatürliche Aminosäure hinzugefügt. Die YFP-Expression fand für 4 h bei 37 °C und 800 rpm in einem Vibrationsschüttler statt. Anschließend wurden die Zellen für 8 min bei 4,000 rpm in einer Eppendorf-Zentrifuge zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden in 500 µL PBS resuspendiert und erneut unter obigen Bedingungen zentrifugiert. Der Überstand wurde abermals verworfen und die Zellen in 150 µL PBS resuspendiert. Nach Transfer der Kulturen in schwarze 96 *well* Microtiterplatten wurde die YFP-Fluoreszenzintensität der Zellen an einem GENios *plate reader* (*TECAN*) ausgelesen. Hierzu wurde bei $\lambda_{\text{Ex}} = 485 \text{ nm}$ angeregt und die Fluoreszenz bei $\lambda_{\text{Em}} = 520 \text{ nm}$ gemessen.

5.14.5 AGAROSEGELELEKTROPHORESE

Bei der Agarosegelelektrophorese werden DNA-Fragmente aufgrund ihrer unterschiedlichen Größe getrennt. Längs der Laufrichtung liegt eine Spannung von ca. 100 V an. Die DNA Fragmente wandern zur Anode und werden dabei durch die polymere Struktur des Agarosegels in ihrer Laufgeschwindigkeit beeinflusst (sog. Siebeffekt). Kleine/kompakte DNA-Moleküle wandern schneller als große/lineare DNA-Moleküle. Die DNA kann dabei durch Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffes Ethidiumbromid ($\lambda_{\text{Abs}} = 300 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{Em}} = 595 \text{ nm}$), welcher in dsDNA interkaliert, detektierbar gemacht werden. Es wurden je nach zu erwartender Fragmentgröße 0.8-2.0%-ige Agarosekonzentrationen verwendet. Die Gele wurden stets frisch vorbereitet. Hierzu wurde Agarose in 1x TAE Puffer durch Aufkochen gelöst. Nach Abkühlen der Lösung wurde 0.1 μL Ethidiumbromid/1 mL Agarosegel in das noch flüssige Gel hinzugegeben und in die Gelgieß-Apparatur (*peq/lab*) gegossen.

5.14.6 DNA ISOLIERUNG

5.14.6.1 Isolierung von DNA aus Agarosegelen unter Verwendung des MinElute-Gel-Extraction Kits (*Qiagen*)

Die zu isolierende DNA-Bande wurde zunächst mit einem Skalpell über dem UV-Transilluminator unter entsprechenden Sicherheitsvorkehrungen aus dem Agarosegel ausgeschnitten, in ein 1.5 mL-Reaktionsgefäß überführt und gewogen. Anschließend wurde das Gelstück mit dem dreifachen des Gewichtes an QG-Puffer überschichtet und im Thermomixer bei 55 °C für 10 min inkubiert, so dass es sich vollständig auflöste. Isopropanol wurde im Verhältnis 1:1 zum Gelvolumen hinzugegeben und durch mehrmaliges invertieren gemischt. Die Probe wurde nun auf die im Umfang des Kits mitgelieferte Säule gegeben und 1 min bei 13,000 rpm in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die gebundene DNA zwei Mal mit je 750 μL PE-Puffer gewaschen. Die Säule wurde dazu jeweils 1 min bei 13,000 rpm zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Die Säule wurde durch erneute Zentrifugation getrocknet, mit 20 μL EB-Puffer überschichtet und zur Elution der DNA für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Zentrifugation unter obigen Bedingungen wurde die gebundene DNA isoliert.

5.14.6.2 Isolierung von Plasmid-DNA unter Verwendung des peqGOLD Plasmid Miniprep Kits (*peq/lab*)

Die während der Klonierung erzeugten Plasmidkonstrukte wurden zur Amplifizierung in One Shot[®] Top10 *E. coli*-Zellen transformiert und anschließend als Übernacht-Kulturen kultiviert. Am nächsten Morgen wurden die Bakterien zentrifugiert (4,000 rpm, 10 min), der Überstand verworfen und das entstandene Sediment in 250 µL Lösung I resuspendiert. Diese Suspension wurde in ein 1.5 mL-Reaktionsgefäß überführt, 250 µL Lösung II hinzugegeben und mehrmals invertiert. Die alkalische Lyse erfolgte für 5 min bei Raumtemperatur und wurde anschließend durch Zugabe von 350 µL Lösung III zur Neutralisation abgestoppt. Die Reaktionslösung wurde mehrmals invertiert und für 4 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurde das Reaktionsgefäß in einer Tischzentrifuge mit 13,000 rpm für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in eine im Kit mitgelieferte *HiBind Miniprep* Zentrifugensäule überführt und 1 min mit 13,000 rpm zentrifugiert. Die an die Säule gebundene DNA wurde zwei Mal mit 750 µL DNA-Waschpuffer überschichtet und anschließend mit 13,000 rpm 1 min erneut zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule erneut, zum vollständigen Entfernen des Waschpuffers, unter obigen Bedingungen zentrifugiert. Die Säule wurde nun mit 50 µL Elutionspuffer überschichtet. Nach Inkubation für 5 min erfolgte die Elution der an die Säule gebundenen DNA durch erneute Zentrifugation. Die aufgereinigte DNA wurde bei -20 °C gelagert.

5.14.7 RESTRIKTION VON DNA

Restriktionsreaktionen von Plasmiden bzw. DNA-Fragmenten wurde mit Restriktionsenzymen (*NEB*) in den vom Hersteller empfohlenen Bedingungen durchgeführt. Für den präparativen Verdau von Plasmiden bzw. DNA-Fragmenten wurden 2-10 µg DNA eingesetzt und die Reaktionen wie in nachfolgender Tabelle angesetzt. Die Reaktion erfolgte bei den Temperaturoptima der verwendeten Restriktionsenzyme (20-60 °C) in den vom Hersteller empfohlenen Puffer.

Komponente	Menge
Restriktionsenzym 1 (10 U/ μ L)	2 μ L
Restriktionsenzym 2 (10 U/ μ L)	2 μ L
2-10 μ g DNA	x μ L
10x NEB-Puffer	2.5 μ L
100x BSA-Lösung (abhängig vom Enzym)	(0.25 μ L)
ddH ₂ O	(18.5-x) μ l (-0.25 μ L)

Die verdauten DNA-Stränge wurden bei Bedarf dephosphoryliert und über Agarosegelelektrophorese aufgetrennt.

Im Falle des analytischen Verdauens mit Restriktionsenzymen wurden 100-150 ng DNA für 1 h in folgendem Ansatz verdaut:

Komponente	Menge
Restriktionsenzym 1 (10 U/ μ L)	0.2 μ L
Restriktionsenzym 2 (10 U/ μ L, nur bei Doppelrestriktion)	0.2 μ L
100-150 ng DNA	1 μ L
10x NEB-Puffer	1 μ L
100x BSA-Lösung (abhängig vom Enzym)	(0.1 μ L)
ddH ₂ O	7.6 μ l (-0.1 μ L)

Die verdauten DNA-Stränge wurden über Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und in einem *image reader* analysiert.

5.14.8 DEPHOSPHORYLIERUNG LINEARISierter VEKTOREN

Präparative Restriktionsreaktionen von Vektoren wurden bei der Verwendung von nur einem Restriktionsenzym dephosphoryliert, bevor sie in weiteren Klonierungsschritten eingesetzt wurden. Die Dephosphorylierung wurden nach dem

unten dargestellten Schema durchgeführt und für 30 min bei 37 °C im Thermomixer inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Inaktivierung der *Antarctic* Phosphatase (5 min bei 65 °C) gestoppt.

Komponente	Menge
<i>Antarctic</i> Phosphatase (<i>NEB</i> , 10 000 U/mL)	1 µL
linearisierter Vektor (2-10 µg)	25 µL
10x <i>Antarctic</i> Phosphatase-Puffer	3 µL
ddH ₂ O	1 µl

5.14.9 LIGATION

Zum Einbau eines DNA-Fragments (*Insert*) in einen linearisierten Vektor wurden diese mit den gleichen Restriktionsenzymen verdaut, so dass diese nun überlappende und komplementäre Einzelstrang-Überhänge (*sticky ends*) besaßen. In der Ligationsreaktion wurden Vektor und Insert, wenn nicht anders beschrieben, im molaren Verhältnis 1:5 wie folgt eingesetzt:

Komponente	Menge
Vektor (~100 ng)	1.5 µL
Insert	12 µL
10x T4 DNA-Ligasepuffer (<i>NEB</i>)	1 µL
T4 DNA-Ligase (<i>NEB</i> ; 400 000 U/mL)	0,5 µL
ddH ₂ O	15.5 µL

Die Ligation wurde 1 h bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend in One Shot[®] Top10 *E. coli*-Zellen transformiert.

5.14.10 pCR®4BLUNT-TOPO® KLONIERUNG

Die pCR®4Blunt-TOPO® Klonierung ermöglicht die direkte Selektion von rekombinanten Plasmiden durch den Strangbruch innerhalb des letalen *E. coli*-Gens *ccdB*. Dieses Gen bildet ein Fusionskonstrukt mit einem auf dem Vektor kodierten *lacZα* Gens über dessen C-Terminus. Das Konstrukt wird durch den Einbau des PCR-Produkts zerstört und somit die Expression des letalen Genprodukts inhibiert, so dass nur Zellen, welche mit einem rekombinanten Vektor transformiert wurden, überleben. Die Insertion des PCR-Produkts erfolgt über die Topoisomerase I, welche an den linearen pCR®4Blunt-TOPO® Vektors assoziiert ist. Hierzu bindet das PCR-Produkt zunächst an die Enden des Vektors und wird durch die Topoisomerase I in den Vektor ligiert. Dabei löst sich die Topoisomerase I und ein überhängendes Fragment des Vektors ab. Die Reaktion wurde in einem 1.5 mL -Reaktionsgefäß auf Eis wie folgt angesetzt:

Komponente	Menge
pCR®4Blunt-TOPO® Vector (10 ng/μL)	1 μL
Salzlösung (1.2 M NaCl, 0.06 M MgCl ₂)	1 μL
PCR-Produkt	2 μL
ddH ₂ O	2 μL

Dieser Ansatz wurde bei Raumtemperatur für 15 min inkubiert und in chemisch-kompetente One Shot® Top10 *E. coli*-Zellen transformiert.

5.14.11 STARGATE®-TECHNOLOGIE

Bei der Klonierungsstrategie mittels der Stargate®-Technologie (IBA Goettingen) werden PCR-Produkte über kurze kombinatorische Sequenzen (*forward* Primer: 5'-Phosphat-ATGG... und *reverse* Primer: 5'-Phosphat-TCCC...) unmittelbar in einen *Entry*-Vektor eingebracht. Der daraus generierte Donor-Vektor ermöglicht den Transfer des *Inserts* in verschiedene Expressionsvektoren der Stargate®-Familie. Die einzelnen Transferreaktionen werden von der Star-Combinase® (IBA) katalysiert.

5.14.11.1 Generierung des Donor-Vektors

Das PCR-Produkt wurde nach Herstellerangaben ohne Start- und Stoppcodon und mit den kombinatorischen Sequenzen mit Hilfe entsprechender Primer generiert. Anschließend wurde es über ein präparatives Agarosegel aufgereinigt und wie folgt in den Vektor pENTRY-IBA10 (*IBA*) transferiert:

Komponente	Menge
PCR-Produkt (12 nM)	14 μ L
pENTRY-IBA10	10 μ L
StarSolution E	1 μ L

Nach vorsichtigem Durchmischen wurde der Reaktionsansatz 1 h bei 22 °C inkubiert. 10 μ L dieses Ansatzes wurden zur Amplifizierung in chemisch-kompetente OneShot® TOP10 *E. coli*-Zellen transformiert. Der Donor-Vektor wurde aus den Zellen aufgereinigt, zur Kontrolle des Konstrukts analytisch mit den Restriktionsenzymen XbaI und HindIII verdaut und schließlich sequenziert.

5.14.11.2 Generierung des Expressions-Vektors

Nach Verifizierung des Donor-Vektors durch Restriktionsverdau und Sequenzierung wurde dieser wie folgt in einen Destinations-Vektors übertragen:

Komponente	Menge
Donor-Vektor (2 ng/ μ L)	12 μ L
Destinations-Vektor	10 μ L
StarSolution A1	1 μ L
StarSolution A2	1 μ L
StarSolution A3	1 μ L

Die Transferreaktion wurde für 1 h bei 30 °C inkubiert und anschließend zur Amplifizierung in chemisch-kompetente OneShot® TOP10 *E. coli*-Zellen transformiert. Der Donor-Vektor wurde aus den Zellen aufgereinigt und zur Kontrolle des Konstrukts analytisch mit den Restriktionsenzymen XbaI und HindIII verdaut.

5.15 PROTEINCHEMISCHE METHODEN

5.15.1 SDS-POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE (SDS-PAGE)

SDS (*sodium dodecyl sulfate*, Natriumdodecylsulfat) ist ein anionisches Detergenz, das die Eigenladungen von Proteinen maskiert. Hierbei entstehen Micellen mit konstanter negativer Ladung pro Masseinheit. Die Micellen enthalten ca. 1.4 g SDS pro 1 g Protein. Bei der Vorbereitung der Proteinproben werden diese mit einem Überschuss an SDS für 10 min bei 95 °C aufgeköcht, so dass sich Tertiär- und Sekundärstrukturen der Proteine durch Auflösung der Wasserstoffbrückenbindungen und Streckung der Moleküle auflösen. Disulfidbrücken zwischen Cysteinen werden durch Zugabe eines Reduktionsmittels, wie zum Beispiel Dithiothreitol (DTT) oder β -Mercaptoethanol, aufgespalten. Derart behandelte Proteine besitzen ein gleiches Masse/Ladungs-Verhältnis und ermöglichen es somit, sie ausschließlich ihrer Größe nach zu trennen. Durch den Siebeffekt des vernetzten Polyacrylamidgels wandern große Proteine langsamer als kleine Proteine durch das Gel. Polyacrylamidgele bilden sich durch radikalische Polymerisation von Acrylamidmonomeren mit vernetzendem Bisacrylamid. Als Katalysator wird TEMED, als Radikalstarter APS verwendet.

Zur Trennung der Proteine wird ein diskontinuierliches System aus Sammel- und Trenngel verwendet, da hierbei schärfere Banden entstehen als bei einer kontinuierlichen Gelelektrophorese. Der pH-Wert des Sammelgels (pH 6.8) ist dafür verantwortlich, dass Proteine sich in der Mitte eines wandernden elektrischen Felds, welches zwischen einem Leit- (Cl^-) sowie einem Folge-Ion (Glycin) aufgebaut wird, zu konzentrierten Stapeln sammeln und somit gleichzeitig ins Trenngel (pH 8.8) einlaufen. Dort findet, wie oben beschrieben, die Trennung nach Proteinmasse statt.

Das Probenvolumen, welches in die Probenaschen des Sammelgels gegeben wurde, variierte je nach Proteinkonzentration zwischen 5-20 μL . Die entsprechende

Menge an 2x SDS-Auftragspuffer wurde hinzugegeben und für 10 min bei 95 °C aufgeköcht. Als Marker wurde *See-Blue® Plus2 PreStrained Standard (Invitrogen)* verwendet. Die Elektrophorese wurde in 1x SDS-Laufpuffer bei 15 mA pro Gel durchgeführt. Das Gel wurde bei Bedarf in einer LAS3000 Gelapparatur auf Fluoreszenz von Proteinbanden getestet und anschließend mit Coomassie gefärbt. Überschüssiger Farbstoff wurde hierbei durch Waschen mit Entfärber-Lösung entfernt.

5.15.2 WESTERN-BLOT

Der Vorgang des *Western-Blotting* umfasst das Fixieren bzw. die Übertragung von Proteinen auf eine Nitrocellulosemembran und die anschließende Immunodetektion. Der Transfer der Proteine vom Polyacrylamidgel auf die Membran erfolgt durch Anlegen einer Spannung (*Elektroblotting*). Aus einer Expressionskultur wurde nach Expressionsinduktion in Abständen von 30 min 1 mL Probe entnommen und zusätzlich die OD bestimmt. Die Probe wurde 4 min bei 10,000x g abzentrifugiert, das Pellet mit 30 µL/OD₆₀₀ = 1 2x SDS-Auftragspuffer für 10 min bei 95 °C aufgeköcht. Die Proteinkonzentration wurde über *Amidoblack* Färbung bestimmt. Es wurden 7 µg der Proteinprobe über SDS-PAGE aufgetrennt.

Die aufgetrennten Proteine wurden durch Anlegen eines elektrischen Feldes auf eine Nitrocellulose-Membran (*Schleicher und Schüll*) übertragen. Hierzu wurden zwölf Filterpapiere (*Whatmanpapiere*) und eine Nitrocellulosemembran auf die Größe des Trenngels zugeschnitten und mit Western-Blot Transferpuffer getränkt. Sechs *Whatmanpapiere* wurden als Stapel in die Transfer-Apparatur gelegt und mit der Nitrocellulose-Membran bedeckt. Das Gel wurde auf die Membran gelegt und mit den restlichen *Whatmanpapiere* bedeckt.

Der Proteintransfer erfolgte bei 15 V und 2.5 mA/cm² für 1 h. Nach dem Blotten wurde die Membran 1 h mit Blockpuffer (5% BSA in PBS-T) gesättigt. Das auf der Membran immobilisierte Protein wurde mittels einer indirekten Methode durch Markierung mit einem primären sowie einem sekundären Antikörper nachgewiesen. In der primären Reaktion kam ein GFP-sequenzspezifischer Antikörper (anti-GFP, polyklonal aus Hasen, *NEB Cell Signaling Technology*) zum Einsatz. Hierzu erfolgte eine einstündige Inkubation mit dem primären Antikörper (1:5000 in PBS-T Puffer)

auf einem Schwenkschüttler für ca. 16 h bei 4 °C. Die Membran wurde mehrmals bei Raumtemperatur mit PBS-T Puffer gewaschen, um unspezifisch gebundenen Antikörper zu entfernen. In der sekundären Reaktion wurde die Membran mit einem anti-*Rabbit* HRP-konjugierten Antikörper (*Sigma Aldrich*) behandelt. Dies erfolgte durch Inkubation mit dem Antikörper (1:2,000 in PBS-T Puffer) für eine Stunde bei Raumtemperatur auf einem Schwenkschüttler. Unspezifisch gebundener sekundärer Antikörper wurde durch mehrmaliges Waschen in PBS-T Puffer entfernt. Durch Zugabe des HRP-Substrats, H₂O₂, innerhalb einer *Enhanced Chemoluminescence* (ECL)-Lösung (*Lumi-Light Western Blotting Substrate, Roche*) wurde der gebundene sekundäre Antikörper detektierbar gemacht. Nach Überschichtung der Membran mit 5 mL ECL-Lösung für 2 min erfolgte die Detektion der Chemolumineszenz im LAS3000.

5.15.3 PROTEIN CHROMATOGRAPHISCHE METHODEN

5.15.3.1 StrepII-Tag Affinitätschromatographie

Die hohe Bindungsselektivität des StrepII-Tags an Streptavidin ermöglicht die hoch effiziente Reinigung von Proteinen. Hierzu wurde das im Zelllysat enthaltene, lösliche Protein über einen *Superloop* an das Säulenmaterial (5 mL Strep-Tactin[®] Superflow[®], IBA Goettingen) gebunden. Dabei interagiert das StrepII-Tag-Protein mit dem auf dem Säulenmaterial immobilisierten Streptavidin. Unspezifisch gebundenes Protein wurde mit Strep-Puffer A von der Säule gewaschen. Die Elution erfolgte mit Puffer B, der zusätzlich freies Desthiobiotin enthält. Dabei kommt es zur kompetitiven Verdrängung des gebundenen Proteins von der Säule. Alle Schritte wurden bei einer Flussrate von 1 mL/min und 4 °C durchgeführt um eine vorzeitige Denaturierung des Proteins zu vermeiden. Die Fraktionsgröße betrug 5 mL. Das Eluat wurde vereinigt, in Amicon[®] Ultra Zentrifugenfiltern (*Millipore*) aufkonzentriert und in den für das jeweilige Protein geeigneten Puffer umgepuffert.

5.15.3.2 Ni-NTA Affinitätschromatographie

Ni-NTA Affinitätssäulen zeichnen sich durch eine besonders hohe Bindungskapazität aus. Hierbei interagiert ein am C- oder N-Terminus des rekombinanten Proteins lokalisierte Polyhistidin-Sequenz mit den im Säulenmaterial gebundenen

zweiwertigen Nickel-Ionen. Die Bindung der Ni²⁺-Ionen im Säulenmaterial erfolgt über Nitrilotriessigsäure-Reste. Der daraus resultierende oktaedrische Komplex mit dem Trägermaterial und Wasser-Molekülen kann einen stabilen Chelat-Komplex mit Histidinen bilden. Die Elution des Fusionsproteins erfolgt mit Imidazol, welche die gebundenen Histidine kompetitiv aus dem Chelat-Komplex verdrängt. Alternativ kann auch ein Puffer mit niedrigem pH-Wert verwendet werden, der zur Protonierung des Imidazol-Rings im Histidin führt. Bei der Aufreinigung über Ni-NTA Affinitätschromatographie wurde das im Zelllysat enthaltene, lösliche Protein über einen *Superloop* auf eine HisTrap HP-Säule (CV = 1 mL) aufgetragen. Unspezifisch gebundenes Protein wurde mit His-Puffer A mit 20 mM Imidazol von der Säule gewaschen. Die Elution erfolgte mit His-Puffer B, welcher 250 mM Imidazol enthält. Alle Schritte wurden bei einer Flussrate von 1 mL/min und 4 °C durchgeführt um eine vorzeitige Denaturierung des Proteins zu vermeiden. Die Fraktionsgröße betrug 5 mL. Das Eluat wurde vereinigt, in Amicon[®] Ultra Zentrifugenfiltern (*Millipore*) aufkonzentriert und in den für das jeweilige Protein geeigneten Puffer umgepuffert.

5.15.3.3 Kationenaustauscher-Chromatographie

Bei DNA-bindenden Proteinen sowie bei physiologischem pH positiv geladenen Proteinen wurde in einem zweiten Reinigungsschritt eine HiTrap Heparin HP-Säule (CV = 1 mL) bei einem Volumenfluss von $z = 1$ mL/min verwendet. Das in diesen Säulen immobilisierte Heparin dient als schwacher Kationenaustauscher, welches zusätzlich ähnliche Struktureigenschaften wie DNA aufweist. Diese beiden Eigenschaften wurden genutzt, um sowohl genomische DNA von *E. coli* als auch Proteine mit anderen Ladungseigenschaften kompetitiv zum immobilisierten Heparin vom Protein zu trennen. Hierzu wurde das aus dem ersten Reinigungsschritt gewonnene Protein aufkonzentriert, in Heparin-Puffer A umgepuffert und auf die Heparin-Säule aufgetragen. Diese wurde mit 5-10 CV Heparin-Puffer A gewaschen. Es folgte eine Gradientenelution über 15 CV mit Heparin-Puffer B in 1 mL-Fraktionen. Die Protein enthaltenden Fraktionen (detektiert über eine Absorption bei 280 nm) wurden gesammelt, über Amicon[®] Ultra Zentrifugenfilter (*Millipore*) aufkonzentriert und umgepuffert.

5.15.3.4 Anionenaustauscher-Chromatographie

Proteine, welche bei physiologischem pH negativ geladenen sind, wurden in einem zweiten Reinigungsschritt über eine Mono Q PC 1.6/5-Säule (CV = 1 mL) aufgereinigt. Hierzu wurde das über Affinitätschromatographie teilweise aufgereinigte Protein, in der vorliegenden Arbeit verschiedene YFP-Varianten, in YFP-Puffer A umgepuffert und auf die Mono Q-Säule aufgetragen. Nach Waschen der Säule mit YFP-Puffer A für 5 CV erfolgte eine Gradientenelution über 15 CV mit YFP-Puffer B. Die Fraktionsgröße betrug 1 mL. Die Protein enthaltenden Fraktionen (detektiert über eine Absorption bei 280 nm und YFP-Absorption bei 488 nm) wurden gesammelt, über Amicon[®] Ultra Zentrifugenfilter (*Millipore*) aufkonzentriert und umgepuffert.

5.15.4 POSTTRANSLATIONALE PROTEINMODIFIZIERUNG

5.15.4.1 Cu(I)-katalysierte Alkin-Azid Cycloaddition (CuAAC) von Proteinen

Für die posttranslationale Modifizierung von Alkin-YFP mit Fluoreszin- und Zuckeraziden wurden 0.1 nmol des aufgereinigten Proteins mit 500 Äquivalenten des korrespondierenden Azids (0.1 M in DMSO) in einem Endvolumen von 5 µL gemischt. 0.4 µL einer Lösung - bestehend aus 10 nmol CuSO₄, 10 nmol Natrium-Ascorbat und 20 nmol Tris[(1-benzyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl]amin (TBTA) - wurde frisch angesetzt und zur Protein/Azid-Lösung hinzugegeben und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Die Proben wurden anschließend mit SDS-Auftragspuffer aufgeköcht und über SDS-PAGE getrennt. Im Fall der Cycloaddition mit Fluoreszin-Azid wurde das Gel vor der *Coomassie*-Färbung in der LAS3000 Gelaufnahme-Apparatur auf Fluoreszenz (Sybr-Green Anregung) untersucht. Die Proteinbanden wurden anschließend tryptisch bzw. chymotryptisch verdaut und über nano-HPLC MS/MS analysiert.

5.15.4.2 Cu(I)-freie Cycloaddition von Proteinen mit Nitriloxiden

Um Reaktionsbedingungen zur Cu(I)-freien Cycloaddition von Proteinen mit Nitriloxid-Derivaten zu ermitteln, die nicht zur Modifizierung natürlicher Proteinreste führten, wurde ein Dansyl-Nitriloxid im Überschuss mit rekombinantem eYFP für unterschiedliche Reaktionszeiten inkubiert. Die Proben wurden anschließend mit SDS-Auftragspuffer aufgeköcht und über SDS-PAGE getrennt. Das Gel wurde vor der *Coomassie*-Färbung

in der LAS3000 Gelaufnahme-Apparatur auf Fluoreszenz (*Sybr-Green* Anregung) untersucht.

5.15.4.3 Cu(I)-freie Cycloaddition von Proteinen mit Tetrazin-, Hydrazonoylchlorid- und Tetrazolderivaten

Für die Cu(I)-freie Cycloaddition von Proteinen wurde sowohl Norbornen-modifizierte Proteine als auch natürliche Proteine (zum Ausschluss von Nebenreaktionen) verwendet. Hierzu wurden 5 µg des rekombinanten Proteins jeweils mit 100 eq der Tetrazin-, Hydrazonoylchlorid- sowie Tetrazolderivate gemischt und auf ein Endvolumen von 10 µL mit dem jeweiligen Proteinpuffer aufgefüllt. Im Falle der Cycloaddition mit Tetrazin wurde das Reaktionsgemisch zuvor für 10 min bei 306 nm mit einer UV-Handlampe bestrahlt, um das Nitrilimin zu generieren. Die Cycloaddition erfolgte für eine Stunde bei Raumtemperatur. Die Proben wurden anschließend mit SDS-Auftragspuffer aufgekocht und über SDS-PAGE getrennt. Das Gel wurde vor der *Coomassie*-Färbung in der LAS3000 Gelaufnahme-Apparatur auf Fluoreszenz (*Sybr-Green* Anregung) untersucht. Für die Bestimmung der Aktivität derivatisierter *hPolk* wurde diese unmittelbar nach der Cycloaddition in Primerverlängerungs-Experimenten eingesetzt. Die eingesetzten Tetrazin-, Hydrazonoylchlorid- sowie Tetrazolderivate wurden stets frisch als 25 mM Stammlösungen in DMF bzw. H₂O hergestellt.

5.16 ANALYTISCHE METHODEN

5.16.1 PROTEINMESSUNG

5.16.1.1 Warburg-Formel

Proteine können mittels Absorptionsmessung quantifiziert werden, da die aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tryptophan sowie Tyrosin ihre Absorptionsmaxima in der Nähe von 280 nm aufweisen. Bei einer statistisch ermittelten Anzahl von aromatischen Aminosäuren in Proteinen gilt, dass eine Absorptionseinheit bei 280 nm einer Konzentration von 1 mg/mL Protein entspricht. Ist die Aminosäure-Sequenz bekannt kann man durch die Multiplikation mit dem entsprechenden Faktor (*f*) die exakte Proteinkonzentration des vorliegenden Proteins

bestimmen. Um die Absorption evtl. vorhandener Nukleinsäuren und Nukleotide zu berücksichtigen, gilt folgende Formel:

$$\text{exakte Proteinkonzentration} = f \times \text{Proteinkonzentration} = (1,55 \times A_{280\text{nm}}) - (0,76 \times A_{260\text{nm}})$$

5.16.1.2 Bradford-Assay

Der Bradford-Assay basiert auf der Verschiebung des Absorptionsmaximums von *Coomassie*-Brilliant-Blau von 465 nm auf 595 nm, wenn sich anionische Gruppen des Proteins an den Farbstoff anlagern. Die Sensitivität dieser Quantifizierungsmethode reicht von 0.1 mg/mL bis 30 mg/mL Protein pro mL Nachweisreagenz. Hierzu wurden 950 μ L Bradford-Reagenz mit 50 μ L Proteinlösung versetzt, bei Raumtemperatur für 1-5 min inkubiert und die Absorption bei 595 nm in einem Spektrophotometer bestimmt. Die zur Proteinbestimmung herangezogene Kalibrierfunktion basierte auf einer BSA-Verdünnungsreihe.

5.16.1.3 *Amidoblack*-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration SDS-haltiger Proteinlösungen wurde mittels *Amidoblack*-Färbung bestimmt. Hierzu wurden 5 μ L der Proteinprobe zunächst mit 195 μ L ddH₂O verdünnt und zu 800 μ L *Amidoblack* Färbelösung in einem 1.5 mL-Reaktionsgefäß gegeben. Nach vorsichtiger Durchmischung durch Invertieren des Reaktionsgefäßes wurde die Lösung für 10 min bei Raumtemperatur in einer Tischzentrifuge bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das *Proteinpellet* in 1 mL *Amidoblack* Waschlösung aufgenommen und erneut nach obigen Bedingungen zentrifugiert. Die Waschlösung wurde verworfen und das *Proteinpellet* bei Raumtemperatur an der Luft getrocknet. Nach Aufnahme des Proteins in 1 mL 0.2 M NaOH wurde die optische Dichte bei 615 nm gemessen. Zum Kalibrieren des Photometers für diese Messung wurden vier BSA-Konzentrationen mit *Amidoblack* gefärbt und eine Kalibriergerade ermittelt.

5.16.1.4 Proteolytischer „in Gel“-Verdau von Proteinen

Zur Identifizierung der aufgereinigten und modifizierten Proteine wurde standardmäßig ein proteolytischer Verdau mit Trypsin oder Chymotrypsin

vorgenommen. Die dadurch entstandenen Fragmente lieferten einen für das jeweilige Protein charakteristischen Peptid-„Fingerabdruck“.

Alle verwendeten Geräte (Glasplatte, Pinzette, Skalpell) wurden vor Beginn des Versuchs mit Isopropanol gereinigt. Die mit *Coomassie*-Brilliant-Blau gefärbte und zu analysierende Proteinbande wurde mit einem Skalpell aus dem SDS-Gel ausgeschnitten, in kleine Stücke geschnitten und in ein 1.5 mL-Reaktionsgefäß überführt. Die Gelstücke wurden zunächst zwei Mal für 10 min bei Raumtemperatur mit ddH₂O gewaschen und anschließend mit 200 µL 50 mM Ammoniumbicarbonat/Acetonitril (im Verhältnis 1:1) überschichtet. Diese Lösung wurde nach 15 min entfernt und die Gelstücke mit 100 µL 50 mM Ammoniumbicarbonat für 15 min rehydriert. Nach Entfernen der Lösung wurden die Gelstücke mit 100 µL 50 mM Ammoniumbicarbonat und nach 15 min zusätzlich mit 100 µL Acetonitril überschichtet. Nach Abnehmen der Lösungen wurden 100 µL Acetonitril zugegeben, nach 15 min wieder entfernt und bei Raumtemperatur getrocknet. Die Reduktion der Disulfidbrücken erfolgte in 10 mM DTT, welches als Lösung frisch in 50 mM Ammoniumbicarbonat gelöst wurde, für 45 min bei 56 °C. Nach Abkühlen der Reaktionslösung auf Raumtemperatur, wurden die reduzierten Disulfidbrücken derivatisiert. Dies erfolgte in 100 µL einer Iodacetamid-Lösung (55 mM in 50 mM Ammoniumbicarbonat) für 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln. Die Gelstücke wurden gewaschen (zwei Mal für je 15 min bei Raumtemperatur mit 200 µL 50 mM Ammoniumbicarbonat/Acetonitril im Verhältnis 1:1) und durch Zugabe von 100 µL Acetonitril getrocknet. Nach Abnahme des Acetonitrils und vollständigem Trocknen der Gelstücke erfolgte der Verdau der Proteine im Gel. Hierzu wurden 1 µg Trypsin bzw. Chymotrypsin (*sequencing grade, Promega*) in 100 µL 25 mM Ammoniumbicarbonat überführt, zu den Gelstücken gegeben und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Der Überstand wurde anschließend in ein separates 1.5 mL-Reaktionsgefäß überführt. Zur Elution der Peptide wurden die Gelstücke mit 100 µL 25 mM Ammoniumbicarbonat überschichtet und im Ultraschallbad für 15 min inkubiert. Zu dieser Lösung wurden 100 µL Acetonitril hinzugegeben und erneut im Ultraschallbad für 15 min inkubiert. Der Überstand wurde abgenommen und in das separate Reaktionsgefäß überführt. Zur vollständigen Elution der Peptide wurden die Gelstücke mit je 100 µL 5%-iger Ameisensäure und Acetonitril für 15 min im Ultraschallbad inkubiert. Nachdem die

Elutionslösungen im separaten Reaktionsgefäß vereinigt wurden, wurde das Eluat in einer *Speedvac* auf 40 µL eingengt und über nano-HPLC MS/MS analysiert.

5.16.1.5 Nano-HPLC MS/MS

Zur Analyse der Peptide über nano-HPLC MS/MS wurden 15 µL des verdauten Proteins zunächst auf eine Dionex C18 Nano Trap Säule (100 µm) aufgetragen und direkt auf eine Dionex C18 PepMap 100 Säule (3 µm) eluiert und chromatographisch getrennt. Die aufgetrennten Peptide wurden über *Tandem* MS und anschließender *High Resolution MS (HR-MS)* an einem Dionex Ultimate 3000 LC Thermo Finnegan LTQ-FT MS System detektiert. Vor dem zweiten Detektionsschritt erfolgt bei dieser Analysemethode die Fragmentierung der Peptide (überwiegend an den peptidischen Bindungen) unter Protonierung der Fragmente. Bei dieser Methode wurden zwei Ionen-Serien berücksichtigt, da die Fragmentierung der Peptide sowohl vom N-Terminus (B-Ionen Serie) als auch vom C-Terminus (Y-Ionen Serie) erfolgen kann. Die hieraus erhaltenen Peptid- und Fragmentmassen wurden über den SEQUEST Algorithmus des Programms "Xcalibur bioworks" und den Datenbank-Sequenzen des zu untersuchenden Proteins ausgewertet. Als Suchkriterium wurden tryptisch/chymotryptische Peptide mit bis zu zwei ungeschnittenen Erkennungssequenzen festgelegt. Es wurden nur monoisotopische Ionen bei der Suche berücksichtigt. Die Massen der unnatürlichen Aminosäuren sowie deren Modifizierungsprodukte wurden berechnet und in den Suchalgorithmus eingegeben. Abweichungen zwischen gefundenen und berechneten Peptidmassen durften hierbei nicht größer als 10 ppm sein. Bei der Analyse der Fragment-Daten wurden sowohl einfach- als auch zweifach-positiv geladene Fragmente ermittelt.

5.16.1.6 Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC)

Die analytische RP-HPLC wurde auf einer Anlage der Firma Waters durchgeführt (Anlage 2996 *Photodiode Array Detector* und 2695 *Separations Modul*). Die Trennung erfolgte auf einer *Nucleodur 100-3 C18* Säule der Firma *Machery-Nagel*. Als mobile Phase diente ein Gemisch aus Puffer A (0.1 M Triethylammoniumacetat in ddH₂O) und Puffer B (0.1 M Triethylammoniumacetat in 80% Acetonitril) mit einem Konzentrationsgradienten von 0 auf 25% Puffer B in 45 min, welche mit einem Fluss von 0.5 mL/min über die Säule gegeben wurde.

5.17 BIOCHEMISCHE METHODEN

5.17.1 REPARATURASSAYS MIT DER (6-4) PHOTOLYASE

Die Aktivität der (6-4) Photolyase wurde mit Hilfe eines HPLC-Reparaturassays bestimmt. Dazu wurde Doppelstrang-DNA mit mittigem T(6-4)T bzw. den T(6-4)C Schaden mit Wildtyp als auch mutierten Varianten der (6-4) Photolyase aus *Drosophila* in Heparin-Puffer A unter Weißlicht (1 x 15 W, Abstand 20 cm), in einem Gesamtvolumen von 50 µL, inkubiert. Je nach Assay-Typ wurde die Inkubation mit unterschiedlichen Enzym/DNA-Verhältnissen durchgeführt. Anschließend wurde die Reaktion bei 95 °C für 5 min abgestoppt und das denaturierte Protein durch Zentrifugation für 15 min bei 13,000 rpm entfernt. Der Überstand wurde über analytische RP-HPLC analysiert.

5.17.2 PRIMERVERLÄNGERUNGS-STUDIEN MIT HUMANER POLYMERASE K

Beim Vergleich der Restaktivität der posttranslational modifizierten *humanen* Polymerase κ mit dem Wildtyp-Protein wurden unterschiedliche Konzentrationen der Polymerase eingesetzt. Zunächst wurde ein 5'-Fluoreszeinmarkierter 13mer-DNA Einzelstrang mit einem nichtmarkiertem 30mer-Templatstrang im Verhältnis 1:1.5 hybridisiert. Die Hybridisierung erfolgte in einem Thermoschüttler bei zunächst 95 °C für 5 min und langsamen Abkühlen auf 4 °C in 45 min im Primerextensions-Puffer. Der Primer wurde in einer Konzentration von 1 µM eingesetzt und in verschiedenen Verhältnissen mit der Polymerase gemischt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 200 µM dNTPs gestartet und nach 30 min bei 37 °C durch Zugabe von TBE-Harnstoff Auftragspuffer beendet. Die Produkte der Primerextensions-Experimente wurden auf einem 20%-igem denaturierendem Polyacrylamid-Harnstoffgel getrennt. Dies erfolgte in einer Protean xi Cell Gelkammer (*Bio-Rad*) bei einer konstanten Stromstärke von 35 mA und maximal 800 V in 1x TBE Puffer. Anschließend wurden die Gele im LAS3000 über Detektion des Fluoreszinsignals analysiert.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- [1] L. Wang, J. Xie, P. G. Schultz, *Annu. Rev Biophys. Biomol. Struct.* **2006**, *35*, 225-249. *Expanding the genetic code.*
- [2] Q. Wang, A. R. Parrish, L. Wang, *Chem. Biol.* **2009**, *16*, 323-336. *Expanding the genetic code for biological studies.*
- [3] T. Fekner, X. Li, M. M. Lee, M. K. Chan, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 1633-1635. *A pyrrolysine analogue for protein click chemistry.*
- [4] Z. Hao, Y. Song, S. Lin, M. Yang, Y. Liang, J. Wang, P. R. Chen, *Chem. Comm.* **2011**, *47*, 4502-4504. *A readily synthesized cyclic pyrrolysine analogue for site-specific protein "click" labeling.*
- [5] C. R. Polycarpo, S. Herring, A. Berube, J. L. Wood, D. Soll, A. Ambrogelly, *FEBS Lett.* **2006**, *580*, 6695-6700. *Pyrrolysine analogues as substrates for pyrrolysyl-tRNA synthetase.*
- [6] T. Yanagisawa, R. Ishii, R. Fukunaga, T. Kobayashi, K. Sakamoto, S. Yokoyama, *Chem. Biol.* **2008**, *15*, 1187-1197. *Multistep engineering of pyrrolysyl-tRNA synthetase to genetically encode N(epsilon)-(o-azidobenzoyloxycarbonyl) lysine for site-specific protein modification.*
- [7] M. Ibba, D. Söll, *Curr. Biol.* **2002**, *12*, 464-466. *Genetic code: introducing pyrrolysine.*
- [8] J. M. Kavran, S. Gundllapalli, P. O'Donoghue, M. Englert, D. Soll, T. A. Steitz, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2007**, *104*, 11268-11273. *Structure of pyrrolysyl-tRNA synthetase, an archaeal enzyme for genetic code innovation.*
- [9] C. Polycarpo, A. Ambrogelly, A. Berube, S. M. Winbush, J. A. McCloskey, P. F. Crain, J. L. Wood, D. Soll, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, *101*, 12450-12454. *An aminoacyl-tRNA synthetase that specifically activates pyrrolysine.*
- [10] A. Ambrogelly, S. Palioura, D. Soll, *Nat. Chem. Biol.* **2007**, *3*, 29-35. *Natural expansion of the genetic code.*
- [11] J. A. Krzycki, *Curr. Opin. Microbiol.* **2005**, *8*, 706-712. *The direct genetic encoding of pyrrolysine.*

- [12] D. G. Longstaff, R. C. Larue, J. E. Faust, A. Mahapatra, L. Zhang, K. B. Green-Church, J. A. Krzycki, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2007**, *104*, 1021-1026. *A natural genetic code expansion cassette enables transmissible biosynthesis and genetic encoding of pyrrolysine.*
- [13] E. Kaya, K. Gutsmedl, M. Vrabel, M. Muller, P. Thumbs, T. Carell, *Chembiochem* **2009**, *10*, 2858-2861. *Synthesis of threefold glycosylated proteins using click chemistry and genetically encoded unnatural amino acids.*
- [14] N. K. Devaraj, R. Upadhyay, J. B. Haun, S. A. Hilderbrand, R. Weissleder, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 7013-7016. *Fast and sensitive pretargeted labeling of cancer cells through a tetrazine/trans-cyclooctene cycloaddition.*
- [15] K. Gutsmedl, D. Fazio, T. Carell, *Chemistry* **2010**, *16*, 6877-6883. *High-density DNA functionalization by a combination of Cu-catalyzed and cu-free click chemistry.*
- [16] M. T. Reetz, J. D. Carballeira, *Nat. Protoc.* **2007**, *2*, 891-903.
- [17] E. Kaya, M. Vrabel, C. Deiml, S. Prill, V. Fluxa, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.* (angenommen). *A genetically encoded norbornene-amino acid allows mild and selective Cu-free click modification of Proteins.*
- [18] A. Sancar, *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 2203-2237. *Structure and function of DNA photolyase and cryptochrome blue-light photoreceptors.*
- [19] A. Sancar, *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 32153-32157. *Structure and function of photolyase and in vivo enzymology: 50th anniversary.*
- [20] J. E. Cleaver, E. Crowley, *Front. Biosci.* **2002**, *7*, d1024-1043. *UV damage, DNA repair and skin carcinogenesis.*
- [21] H. Ikehata, T. Ono, *J. Radiat. Res. (Tokyo)* **2011**, *52*, 115-125. *The mechanisms of UV mutagenesis.*
- [22] M. Muller, T. Carell, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2009**, *19*, 277-285. *Structural biology of DNA photolyases and cryptochromes.*
- [23] S. Krapf, T. Koslowski, T. Steinbrecher, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, *12*, 9516-9525. *The thermodynamics of charge transfer in DNA photolyase: using thermodynamic integration calculations to analyse the kinetics of electron transfer reactions.*

- [24] A. A. Zieba, C. Richardson, C. Lucero, S. D. Dieng, Y. M. Gindt, J. P. M. Schelvis, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 7824-7836. *Evidence for Concerted Electron Proton Transfer in Charge Recombination between FADH(-) and (306)Trp(center dot) in Escherichia coli Photolyase.*
- [25] M. J. Maul, T. R. Barends, A. F. Glas, M. J. Cryle, T. Domratcheva, S. Schneider, I. Schlichting, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 10076-10080. *Crystal structure and mechanism of a DNA (6-4) photolyase.*
- [26] A. F. Glas, M. J. Maul, M. Cryle, T. R. Barends, S. Schneider, E. Kaya, I. Schlichting, T. Carell, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2009**, *106*, 11540-11545. *The archaeal cofactor F0 is a light-harvesting antenna chromophore in eukaryotes.*
- [27] Y. T. Kao, C. Saxena, L. Wang, A. Sancar, D. Zhong, *Cell Biochem. Biophys.* **2007**, *48*, 32-44. *Femtochemistry in enzyme catalysis: DNA photolyase.*
- [28] A. F. Glas, S. Schneider, M. J. Maul, U. Hennecke, T. Carell, *Chemistry* **2009**, *15*, 10387-10396. *Crystal structure of the T(6-4)C lesion in complex with a (6-4) DNA photolyase and repair of UV-induced (6-4) and Dewar photolesions.*
- [29] N. J. Fuda, M. B. Ardehali, J. T. Lis, *Nature* **2009**, *461*, 186-192. *Defining mechanisms that regulate RNA polymerase II transcription in vivo.*
- [30] T. Juven-Gershon, J. T. Kadonaga, *Dev. Biol.* **2010**, *339*, 225-229. *Regulation of gene expression via the core promoter and the basal transcriptional machinery.*
- [31] L. A. Selth, S. Sigurdsson, J. Q. Svejstrup, *Annu. Rev. Biochem.* **2010**, *79*, 271-293. *Transcript Elongation by RNA Polymerase II.*
- [32] P. B. Moore, T. A. Steitz, *Annu. Rev. Biochem.* **2003**, *72*, 813-850. *The structural basis of large ribosomal subunit function.*
- [33] P. B. Moore, T. A. Steitz, *Trends Biochem. Sci.* **2005**, *30*, 281-283. *The ribosome revealed.*
- [34] T. M. Schmeing, V. Ramakrishnan, *Nature* **2009**, *461*, 1234-1242. *What recent ribosome structures have revealed about the mechanism of translation.*
- [35] I. Wohlgemuth, C. Pohl, M. V. Rodnina, *EMBO J.* **2010**, *29*, 3701-3709. *Optimization of speed and accuracy of decoding in translation.*

- [36] F. H. Crick, *Symp. Soc. Exp. Biol.* **1958**, 12, 138-163. *On protein synthesis.*
- [37] A. D. Hershey, M. Chase, *J. Gen. Physiol.* **1952**, 36, 39-56. *Independent functions of viral protein and nucleic acid in growth of bacteriophage.*
- [38] A. I. Ivanov, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, 101, 16216-16221. *Genes required for Drosophila nervous system development identified by RNA interference.*
- [39] M. Nirenberg, *Trends Biochem. Sci.* **2004**, 29, 46-54. *Historical review: Deciphering the genetic code--a personal account.*
- [40] M. W. Nirenberg, J. H. Matthaei, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1961**, 47, 1588-1602. *The dependence of cell-free protein synthesis in E. coli upon naturally occurring or synthetic polyribonucleotides.*
- [41] J. D. Watson, F. H. Crick, *Clin. Orthop. Relat. Res.* **2007**, 462, 3-5. *Molecular structure of nucleic acids: a structure for deoxyribose nucleic acid.*
- [42] C. Weissmann, P. Borst, R. H. Burdon, M. A. Billeter, S. Ochoa, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1964**, 51, 682-690. *Replication of Viral Rna, lii. Double-Stranded Replicative Form of Msw Phage Rna.*
- [43] G. E. Palade, *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **1955**, 1, 59-68. *A small particulate component of the cytoplasm.*
- [44] F. Chapeville, F. Lipmann, G. Von Ehrenstein, B. Weisblum, W. J. Ray, Jr., S. Benzer, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1962**, 48, 1086-1092. *On the role of soluble ribonucleic acid in coding for amino acids.*
- [45] M. B. Hoagland, M. L. Stephenson, J. F. Scott, L. I. Hecht, P. C. Zamecnik, *J. Biol. Chem.* **1958**, 231, 241-257. *A soluble ribonucleic acid intermediate in protein synthesis.*
- [46] C. Francklyn, J. J. Perona, J. Puetz, Y. M. Hou, *RNA* **2002**, 8, 1363-1372. *Aminoacyl-tRNA synthetases: versatile players in the changing theater of translation.*
- [47] S. Inge-Vechtomov, G. Zhouravleva, M. Philippe, *Biol. Cell.* **2003**, 95, 195-209. *Eukaryotic release factors (eRFs) history.*
- [48] M. Nirenberg, et al., *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **1966**, 31, 11-24. *The RNA code and protein synthesis.*

- [49] F. H. Crick, *J. Mol. Biol.* **1968**, *38*, 367-379. *The origin of the genetic code.*
- [50] J. T. Wong, *Bioessays* **2005**, *27*, 416-425. *Coevolution theory of the genetic code at age thirty.*
- [51] C. J. Epstein, *Nature* **1966**, *210*, 25-28. *Role of the amino-acid "code" and of selection for conformation in the evolution of proteins.*
- [52] T. M. Sonneborn, *Science* **1965**, *148*, 1410. *Nucleotide Sequence of a Gene: First Complete Specification.*
- [53] K. Ikehara, Y. Niihara, *Curr. Med. Chem.* **2007**, *14*, 3221-3231. *Origin and evolutionary process of the genetic code.*
- [54] E. V. Koonin, A. S. Novozhilov, *IUBMB Life* **2009**, *61*, 99-111. *Origin and evolution of the genetic code: the universal enigma.*
- [55] G. Sella, D. H. Ardell, *J. Mol. Evol.* **2006**, *63*, 297-313. *The coevolution of genes and genetic codes: Crick's frozen accident revisited.*
- [56] R. D. Knight, S. J. Freeland, L. F. Landweber, *Nat. Rev. Genet.* **2001**, *2*, 49-58. *Rewiring the keyboard: evolvability of the genetic code.*
- [57] R. D. Knight, L. F. Landweber, *Cell* **2000**, *101*, 569-572. *The early evolution of the genetic code.*
- [58] M. A. Santos, G. Moura, S. E. Massey, M. F. Tuite, *Trends Genet.* **2004**, *20*, 95-102. *Driving change: the evolution of alternative genetic codes.*
- [59] S. Sengupta, X. Yang, P. G. Higgs, *J. Mol. Evol.* **2007**, *64*, 662-688. *The mechanisms of codon reassignments in mitochondrial genetic codes.*
- [60] S. Yokobori, T. Suzuki, K. Watanabe, *J. Mol. Evol.* **2001**, *53*, 314-326. *Genetic code variations in mitochondria: tRNA as a major determinant of genetic code plasticity.*
- [61] C. Allmang, A. Krol, *Biochimie* **2006**, *88*, 1561-1571. *Selenoprotein synthesis: UGA does not end the story.*
- [62] M. A. Santos, C. Cheesman, V. Costa, P. Moradas-Ferreira, M. F. Tuite, *Mol. Microbiol.* **1999**, *31*, 937-947. *Selective advantages created by codon ambiguity allowed for the evolution of an alternative genetic code in Candida spp.*

- [63] W. Leinfelder, E. Zehelein, M. A. Mandrand-Berthelot, A. Böck, *Nature* **1988**, *331*, 723-725. *Gene for a novel tRNA species that accepts L-serine and cotranslationally inserts selenocysteine.*
- [64] A. Böck, *BioFactors* **2000**, *11*, 77-78.
- [65] A. Böck, K. Forchhammer, J. Heider, W. Leinfelder, G. Sawers, B. Veprek, F. Zinoni, *Mol. Microbiol.* **1991**, *5*, 515-520. *Selenocysteine: the 21st amino acid.*
- [66] M. Thanbichler, A. Böck, *Methods. Enzymol.* **2002**, *347*, 3-16. *Selenoprotein biosynthesis: purification and assay of components involved in selenocysteine biosynthesis and insertion in Escherichia coli.*
- [67] Y. Araiso, R. L. Sherrer, R. Ishitani, J. M. Ho, D. Soll, O. Nureki, *Nucleic Acids Res.* **2008**, *36*, 1187-1199. *Structural insights into RNA-dependent eukaryal and archaeal selenocysteine formation.*
- [68] R. L. Sherrer, J. M. Ho, D. Soll, *Nucleic Acids Res.* **2008**, *36*, 1871-1880. *Divergence of selenocysteine tRNA recognition by archaeal and eukaryotic O-phosphoseryl-tRNA^{Sec} kinase.*
- [69] D. Su, M. J. Hohn, S. Palioura, R. L. Sherrer, J. Yuan, D. Soll, P. O'Donoghue, *IUBMB Life* **2009**, *61*, 35-39. *How an obscure archaeal gene inspired the discovery of selenocysteine biosynthesis in humans.*
- [70] U. Burkard, D. Soll, *Nucleic Acids Res.* **1988**, *16*, 11617-11624. *The unusually long amino acid acceptor stem of Escherichia coli selenocysteine tRNA results from abnormal cleavage by RNase P.*
- [71] A. Sauerwald, W. Zhu, T. A. Major, H. Roy, S. Palioura, D. Jahn, W. B. Whitman, J. R. Yates, 3rd, M. Ibba, D. Soll, *Science* **2005**, *307*, 1969-1972. *RNA-dependent cysteine biosynthesis in archaea.*
- [72] C. Baron, E. Westhof, A. Böck, R. Giege, *J. Mol. Biol.* **1993**, *231*, 274-292. *Solution structure of selenocysteine-inserting tRNA^(Sec) from Escherichia coli. Comparison with canonical tRNA^(Ser).*
- [73] M. Thanbichler, A. Böck, *EMBO J.* **2002**, *21*, 6925-6934. *The function of SECIS RNA in translational control of gene expression in Escherichia coli.*

- [74] Z. Liu, M. Reches, I. Groisman, H. Engelberg-Kulka, *Nucleic Acids Res.* **1998**, *26*, 896-902. *The nature of the minimal 'selenocysteine insertion sequence' (SECIS) in Escherichia coli.*
- [75] B. A. Carlson, X. M. Xu, G. V. Kryukov, M. Rao, M. J. Berry, V. N. Gladyshev, D. L. Hatfield, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, *101*, 12848-12853. *Identification and characterization of phosphoseryl-tRNA[Ser]^{Sec} kinase.*
- [76] S. Palioura, R. L. Sherrer, T. A. Steitz, D. Soll, M. Simonovic, *Science* **2009**, *325*, 321-325. *The human SepSecS-tRNA^{Sec} complex reveals the mechanism of selenocysteine formation.*
- [77] Y. Zhang, V. N. Gladyshev, *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, 4952-4963. *High content of proteins containing 21st and 22nd amino acids, selenocysteine and pyrrolysine, in a symbiotic deltaproteobacterium of gutless worm Olavius algarvensis.*
- [78] G. Srinivasan, C. M. James, J. A. Krzycki, *Science* **2002**, *296*, 1459-1462. *Pyrrolysine encoded by UAG in Archaea: charging of a UAG-decoding specialized tRNA.*
- [79] B. Hao, W. Gong, T. K. Ferguson, C. M. James, J. A. Krzycki, M. K. Chan, *Science* **2002**, *296*, 1462-1466. *A new UAG-encoded residue in the structure of a methanogen methyltransferase.*
- [80] J. A. Soares, L. Zhang, R. L. Pitsch, N. M. Kleinholz, R. B. Jones, J. J. Wolff, J. Amster, K. B. Green-Church, J. A. Krzycki, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 36962-36969. *The residue mass of L-pyrrolysine in three distinct methylamine methyltransferases.*
- [81] S. A. Burke, J. A. Krzycki, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 16570-16577. *Reconstitution of Monomethylamine:Coenzyme M methyl transfer with a corrinoid protein and two methyltransferases purified from Methanosarcina barkeri.*
- [82] D. J. Ferguson, Jr., N. Gorlatova, D. A. Grahame, J. A. Krzycki, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 29053-29060. *Reconstitution of dimethylamine:coenzyme M methyl transfer with a discrete corrinoid protein and two methyltransferases purified from Methanosarcina barkeri.*

- [83] D. J. Ferguson, Jr., J. A. Krzycki, *J. Bacteriol.* **1997**, *179*, 846-852. *Reconstitution of trimethylamine-dependent coenzyme M methylation with the trimethylamine corrinoid protein and the isozymes of methyltransferase II from Methanosarcina barkeri.*
- [84] D. G. Longstaff, S. K. Blight, L. Zhang, K. B. Green-Church, J. A. Krzycki, *Mol. Microbiol.* **2007**, *63*, 229-241. *In vivo contextual requirements for UAG translation as pyrrolysine.*
- [85] Y. Zhang, P. V. Baranov, J. F. Atkins, V. N. Gladyshev, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 20740-20751. *Pyrrolysine and selenocysteine use dissimilar decoding strategies.*
- [86] C. Hertweck, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 9540-9541. *Biosynthesis and charging of pyrrolysine, the 22nd genetically encoded amino Acid.*
- [87] M. A. Gaston, R. Jiang, J. A. Krzycki, *Curr. Opin. Microbiol.* **2011**, *14*, 342-349. *Functional context, biosynthesis, and genetic encoding of pyrrolysine.*
- [88] M. A. Gaston, L. Zhang, K. B. Green-Church, J. A. Krzycki, *Nature* **2011**, *471*, 647-650. *The complete biosynthesis of the genetically encoded amino acid pyrrolysine from lysine.*
- [89] S. E. Cellitti, W. Ou, H. P. Chiu, J. Grunewald, D. H. Jones, X. Hao, Q. Fan, L. L. Quinn, K. Ng, A. T. Anfora, S. A. Lesley, T. Uno, A. Brock, B. H. Geierstanger, *Nat. Chem. Biol.* **2011**, *7*, 528-530. *D-Ornithine coopts pyrrolysine biosynthesis to make and insert pyrroline-carboxy-lysine.*
- [90] P. A. Frey, A. D. Hegeman, F. J. Ruzicka, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **2008**, *43*, 63-88. *The Radical SAM Superfamily.*
- [91] M. Rother, J. A. Krzycki, *Archaea* **2010**, *2010*. *Selenocysteine, pyrrolysine, and the unique energy metabolism of methanogenic archaea.*
- [92] R. Giege, M. Sissler, C. Florentz, *Nucleic Acids Res.* **1998**, *26*, 5017-5035. *Universal rules and idiosyncratic features in tRNA identity.*
- [93] F. Mateo, M. Vidal-Laliena, M. J. Pujol, O. Bachs, *Biochem. Soc. Trans.* **2010**, *38*, 83-86. *Acetylation of cyclin A: a new cell cycle regulatory mechanism.*
- [94] J. Ouyang, A. Valin, G. Gill, *Methods Mol. Biol.* **2009**, *497*, 141-152. *Regulation of transcription factor activity by SUMO modification.*

- [95] M. A. Glozak, E. Seto, *Oncogene* **2007**, *26*, 5420-5432. *Histone deacetylases and cancer.*
- [96] Q. Tian, J. Wang, *Neurosignals* **2002**, *11*, 262-269. *Role of serine/threonine protein phosphatase in Alzheimer's disease.*
- [97] K. Friedbichler, A. Hoelbl, G. Li, K. D. Bunting, V. Sexl, F. Gouilleux, R. Moriggl, *Front. Biosci.* **2011**, *17*, 3043-3056. *Serine phosphorylation of the Stat5a C-terminus is a driving force for transformation.*
- [98] L. Raptis, R. Arulanandam, M. Geletu, J. Turkson, *Exp. Cell. Res.* **2011**, *317*, 1787-1795. *The R(h)oads to Stat3: Stat3 activation by the Rho GTPases.*
- [99] C. I. Santos, A. P. Costa-Pereira, *Biochim. Biophys. Acta* **2011**, *1816*, 38-49. *Signal transducers and activators of transcription-from cytokine signalling to cancer biology.*
- [100] N. L. Lehman, *Acta Neuropathol.* **2009**, *118*, 329-347. *The ubiquitin proteasome system in neuropathology.*
- [101] P. Low, *Gen. Comp. Endocrinol.* **2011**, *172*, 39-43. *The role of ubiquitin-proteasome system in ageing.*
- [102] A. Daulny, W. P. Tansey, *DNA Repair* **2009**, *8*, 444-448. *Damage control: DNA repair, transcription, and the ubiquitin-proteasome system.*
- [103] G. A. Ngoh, H. T. Facundo, A. Zafir, S. P. Jones, *Circ. Res.* **2010**, *107*, 171-185. *O-GlcNAc signaling in the cardiovascular system.*
- [104] D. Shental-Bechor, Y. Levy, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2009**, *19*, 524-533. *Folding of glycoproteins: toward understanding the biophysics of the glycosylation code.*
- [105] L. Medvedova, R. Farkas, *Endocr. Regul.* **2004**, *38*, 65-79. *Hormonal control of protein glycosylation: role of steroids and related lipophilic ligands.*
- [106] I. Braakman, N. J. Balleid, *Annu. Rev. Biochem.* **2011**, *80*, 71-99. *Protein folding and modification in the mammalian endoplasmic reticulum.*
- [107] J. Roth, Zuber, C. S. Park, I. Jang, Y. Lee, K. G. Kysela, V. Le Fourn, R. Santimaria, B. Guhl, J. W. Cho, *Mol. Cells* **2010**, *30*, 497-506. *Protein N-glycosylation, protein folding, and protein quality control.*

- [108] G. J. Bernardes, B. Castagner, P. H. Seeberger, *ACS Chem. Biol.* **2009**, *4*, 703-713. *Combined approaches to the synthesis and study of glycoproteins.*
- [109] B. G. Davis, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 4674-4678. *The linear assembly of a pure glycoenzyme.*
- [110] N. Floyd, B. Vijayakrishnan, J. R. Koeppe, B. G. Davis, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 7798-7802. *Thiyl glycosylation of olefinic proteins: S-linked glycoconjugate synthesis.*
- [111] L. Liu, C. S. Bennett, C. H. Wong, *Chem. Comm.* **2006**, 21-33. *Advances in glycoprotein synthesis.*
- [112] J. Kalia, R. T. Raines, *Curr. Org. Chem.* **2010**, *14*, 138-147. *Advances in Bioconjugation.*
- [113] R. K. Lim, Q. Lin, *Chem. Comm.* **2010**, *46*, 1589-1600. *Bioorthogonal chemistry: recent progress and future directions.*
- [114] C. C. Liu, P. G. Schultz, *Annu. Rev. Biochem.* **2010**, *79*, 413-444. *Adding new chemistries to the genetic code.*
- [115] I. S. Carrico, *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 1423-1431. *Chemoselective modification of proteins: hitting the target.*
- [116] E. M. Sletten, C. R. Bertozzi, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 6974-6998. *Bioorthogonal chemistry: fishing for selectivity in a sea of functionality.*
- [117] C. Kan, J. D. Trzupsek, B. Wu, Q. Wan, G. Chen, Z. Tan, Y. Yuan, S. J. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 5438-5443. *Toward homogeneous erythropoietin: chemical synthesis of the Ala1-Gly28 glycopeptide domain by "alanine" ligation.*
- [118] M. Morpurgo, E. A. Bayer, M. Wilchek, *J. Biochem. Biophys. Methods* **1999**, *38*, 17-28. *N-hydroxysuccinimide carbonates and carbamates are useful reactive reagents for coupling ligands to lysines on proteins.*
- [119] J. M. Hooker, A. P. Esser-Kahn, M. B. Francis, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 15558-15559. *Modification of aniline containing proteins using an oxidative coupling strategy.*

- [120] J. M. Chalker, G. J. Bernardes, Y. A. Lin, B. G. Davis, *Chem. Asian. J.* **2009**, *4*, 630-640. *Chemical modification of proteins at cysteine: opportunities in chemistry and biology.*
- [121] M. A. Gilles, A. Q. Hudson, C. L. Borders, Jr., *Anal. Biochem.* **1990**, *184*, 244-248. *Stability of water-soluble carbodiimides in aqueous solution.*
- [122] T. L. Schlick, Z. Ding, E. W. Kovacs, M. B. Francis, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 3718-3723. *Dual-surface modification of the tobacco mosaic virus.*
- [123] R. B. Merrifield, *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* **1969**, *32*, 221-296. *Solid-phase peptide synthesis.*
- [124] J. S. Nowick, K. S. Lam, T. V. Khasanova, W. E. Kemnitzer, S. Maitra, H. T. Mee, R. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 4972-4973. *An unnatural amino acid that induces beta-sheet folding and interaction in peptides.*
- [125] R. Ramage, J. Green, T. W. Muir, O. M. Ogunjobi, S. Love, K. Shaw, *Biochem. J.* **1994**, *299*, 151-158. *Synthetic, structural and biological studies of the ubiquitin system: the total chemical synthesis of ubiquitin.*
- [126] Y. Shin, K. A. Winans, B. J. Backes, S. B. Kent, J. A. Ellman, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 11684-11689. *Fmoc-Based Synthesis of Peptide-Thioesters.*
- [127] A. Brik, E. Keinan, P. E. Dawson, *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 3829-3835. *Protein synthesis by solid-phase chemical ligation using a safety catch linker.*
- [128] P. E. Dawson, S. B. Kent, *Annu. Rev. Biochem.* **2000**, *69*, 923-960. *Synthesis of native proteins by chemical ligation.*
- [129] S. Mezzato, M. Schaffrath, C. Unverzagt, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 1650-1654. *An orthogonal double-linker resin facilitates the efficient solid-phase synthesis of complex-type N-glycopeptide thioesters suitable for native chemical ligation.*
- [130] T. W. Muir, *Annu. Rev. Biochem.* **2003**, *72*, 249-289. *Semisynthesis of proteins by expressed protein ligation.*
- [131] B. L. Nilsson, M. B. Soellner, R. T. Raines, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2005**, *34*, 91-118. *Chemical synthesis of proteins.*

- [132] R. David, M. P. Richter, A. G. Beck-Sickinger, *Eur. J. Biochem.* **2004**, *271*, 663-677. *Expressed protein ligation. Method and applications.*
- [133] K. L. Kiick, E. Saxon, D. A. Tirrell, C. R. Bertozzi, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, *99*, 19-24. *Incorporation of azides into recombinant proteins for chemoselective modification by the Staudinger ligation.*
- [134] M. Shogren-Knaak, H. Ishii, J. M. Sun, M. J. Pazin, J. R. Davie, C. L. Peterson, *Science* **2006**, *311*, 844-847. *Histone H4-K16 acetylation controls chromatin structure and protein interactions.*
- [135] P. Van de Vijver, D. Suylen, A. Dirksen, P. E. Dawson, T. M. Hackeng, *Biopolymers* **2010**, *94*, 465-474. *N-epsilon-(thiaprolyl)-lysine as a handle for site-specific protein conjugation.*
- [136] R. R. Flavell, T. W. Muir, *Acc. Chem. Res.* **2009**, *42*, 107-116. *Expressed protein ligation (EPL) in the study of signal transduction, ion conduction, and chromatin biology.*
- [137] F. I. Valiyaveetil, M. Leonetti, T. W. Muir, R. Mackinnon, *Science* **2006**, *314*, 1004-1007. *Ion selectivity in a semisynthetic K⁺ channel locked in the conductive conformation.*
- [138] M. E. Vazquez, M. Nitz, J. Stehn, M. B. Yaffe, B. Imperiali, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 10150-10151. *Fluorescent caged phosphoserine peptides as probes to investigate phosphorylation-dependent protein associations.*
- [139] J. D. Bain, E. S. Diala, C. G. Glabe, D. A. Wacker, M. H. Lyttle, T. A. Dix, A. R. Chamberlin, *Biochemistry* **1991**, *30*, 5411-5421. *Site-specific incorporation of nonnatural residues during in vitro protein biosynthesis with semisynthetic aminoacyl-tRNAs.*
- [140] S. M. Hecht, B. L. Alford, Y. Kuroda, S. Kitano, *J. Biol. Chem.* **1978**, *253*, 4517-4520. *"Chemical aminoacylation" of tRNA's.*
- [141] M. Giel-Pietraszuk, J. Barciszewski, *FEBS J.* **2006**, *273*, 3014-3023. *Charging of tRNA with non-natural amino acids at high pressure.*
- [142] M. Ohuchi, H. Murakami, H. Suga, *Current opinion in chemical biology* **2007**, *11*, 537-542. *The flexizyme system: a highly flexible tRNA aminoacylation tool for the translation apparatus.*

- [143] P. C. Cirino, Y. Tang, K. Takahashi, D. A. Tirrell, F. H. Arnold, *Biotechnol. Bioeng.* **2003**, *83*, 729-734. *Global incorporation of norleucine in place of methionine in cytochrome P450 BM-3 heme domain increases peroxygenase activity.*
- [144] G. N. Cohen, D. B. Cowie, C. R. Hebd. *Seances Acad. Sci.* **1957**, *244*, 680-683. *[Total replacement of methionine by selenomethionine in the proteins of Escherichia coli].*
- [145] B. M. Eisenhauer, S. M. Hecht, *Biochemistry* **2002**, *41*, 11472-11478. *Site-specific incorporation of (aminoxy)acetic acid into proteins.*
- [146] N. E. Fahmi, L. Dedkova, B. Wang, S. Golovine, S. M. Hecht, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 3586-3597. *Site-specific incorporation of glycosylated serine and tyrosine derivatives into proteins.*
- [147] T. Kanamori, S. Nishikawa, I. Shin, P. G. Schultz, T. Endo, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1997**, *94*, 485-490. *Probing the environment along the protein import pathways in yeast mitochondria by site-specific photocrosslinking.*
- [148] T. Hohsaka, Y. Ashizuka, H. Murakami, M. Sisido, *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29*, 3646-3651. *Five-base codons for incorporation of nonnatural amino acids into proteins.*
- [149] T. Hohsaka, M. Sisido, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2002**, *6*, 809-815. *Incorporation of non-natural amino acids into proteins.*
- [150] M. Sisido, T. Hohsaka, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2001**, *57*, 274-281. *Introduction of specialty functions by the position-specific incorporation of nonnatural amino acids into proteins through four-base codon/anticodon pairs.*
- [151] N. Hino, A. Hayashi, K. Sakamoto, S. Yokoyama, *Nat Protocols* **2006**, *1*, 2957-2962. *Site-specific incorporation of non-natural amino acids into proteins in mammalian cells with an expanded genetic code.*
- [152] E. A. Rodriguez, H. A. Lester, D. A. Dougherty, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, *103*, 8650-8655. *In vivo incorporation of multiple unnatural amino acids through nonsense and frameshift suppression.*
- [153] Y. Ryu, P. G. Schultz, *Nat. Methods* **2006**, *3*, 263-265. *Efficient incorporation of unnatural amino acids into proteins in Escherichia coli.*

- [154] E. Ilegems, H. M. Pick, H. Vogel, *Protein Eng. Des. Sel.* **2004**, *17*, 821-827. *Downregulation of eRF1 by RNA interference increases mis-acylated tRNA suppression efficiency in human cells.*
- [155] S. Sando, A. Ogawa, T. Nishi, M. Hayami, Y. Aoyama, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 1216-1220. *In vitro selection of RNA aptamer against Escherichia coli release factor 1.*
- [156] K. Wang, H. Neumann, S. Y. Peak-Chew, J. W. Chin, *Nat. Biotechnol.* **2007**, *25*, 770-777. *Evolved orthogonal ribosomes enhance the efficiency of synthetic genetic code expansion.*
- [157] L. Wang, P. G. Schultz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *44*, 34-66. *Expanding the genetic code.*
- [158] A. Gautier, D. P. Nguyen, H. Lusic, W. An, A. Deiters, J. W. Chin, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 4086-4088. *Genetically encoded photocontrol of protein localization in mammalian cells.*
- [159] S. M. Hancock, R. Uprety, A. Deiters, J. W. Chin, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 14819-14824. *Expanding the genetic code of yeast for incorporation of diverse unnatural amino acids via a pyrrolysyl-tRNA synthetase/tRNA pair.*
- [160] H. Neumann, S. Y. Peak-Chew, J. W. Chin, *Nat. Chem. Biol.* **2008**, *4*, 232-234. *Genetically encoding N(epsilon)-acetyllysine in recombinant proteins.*
- [161] D. P. Nguyen, H. Lusic, H. Neumann, P. B. Kapadnis, A. Deiters, J. W. Chin, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 8720-8721. *Genetic encoding and labeling of aliphatic azides and alkynes in recombinant proteins via a pyrrolysyl-tRNA Synthetase/tRNA(CUA) pair and click chemistry.*
- [162] T. Plass, S. Milles, C. Koehler, C. Schultz, E. A. Lemke, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 3878-3881. *Genetically encoded copper-free click chemistry.*
- [163] A. Deiters, T. A. Cropp, D. Summerer, M. Mukherji, P. G. Schultz, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 5743-5745. *Site-specific PEGylation of proteins containing unnatural amino acids.*
- [164] A. Deiters, B. H. Geierstanger, P. G. Schultz, *Chembiochem* **2005**, *6*, 55-58. *Site-specific in vivo labeling of proteins for NMR studies.*

- [165] H. Murakami, T. Hoshika, Y. Ashizuka, K. Hashimoto, M. Sisido, *Biomacromolecules* **2000**, *1*, 118-125. *Site-directed incorporation of fluorescent nonnatural amino acids into streptavidin for highly sensitive detection of biotin.*
- [166] Z. Zhang, J. Gildersleeve, Y. Y. Yang, R. Xu, J. A. Loo, S. Uryu, C. H. Wong, P. G. Schultz, *Science* **2004**, *303*, 371-373. *A new strategy for the synthesis of glycoproteins.*
- [167] V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596-2599. *A stepwise Huisgen cycloaddition process: copper(I)-catalyzed regioselective "ligation" of azides and terminal alkynes.*
- [168] C. W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057-3064. *Peptidotriazoles on solid phase: [1,2,3]-triazoles by regiospecific copper(I)-catalyzed 1,3-dipolar cycloadditions of terminal alkynes to azides.*
- [169] A. Deiters, T. A. Cropp, M. Mukherji, J. W. Chin, J. C. Anderson, P. G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 11782-11783. *Adding amino acids with novel reactivity to the genetic code of *Saccharomyces cerevisiae*.*
- [170] J. Gierlich, G. A. Burley, P. M. Gramlich, D. M. Hammond, T. Carell, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 3639-3642. *Click chemistry as a reliable method for the high-density postsynthetic functionalization of alkyne-modified DNA.*
- [171] A. J. Link, D. A. Tirrell, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 11164-11165. *Cell surface labeling of *Escherichia coli* via copper(I)-catalyzed [3+2] cycloaddition.*
- [172] A. Salic, T. J. Mitchison, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2008**, *105*, 2415-2420. *A chemical method for fast and sensitive detection of DNA synthesis in vivo.*
- [173] T. S. Seo, X. Bai, H. Ruparel, Z. Li, N. J. Turro, J. Ju, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, *101*, 5488-5493. *Photocleavable fluorescent nucleotides for DNA sequencing on a chip constructed by site-specific coupling chemistry.*
- [174] A. E. Speers, G. C. Adam, B. F. Cravatt, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 4686-4687. *Activity-based protein profiling in vivo using a copper(I)-catalyzed azide-alkyne [3 + 2] cycloaddition.*
- [175] A. E. Speers, B. F. Cravatt, *Chem. Biol.* **2004**, *11*, 535-546. *Profiling enzyme activities in vivo using click chemistry methods.*

- [176] F. Wolbers, P. ter Braak, S. Le Gac, R. Luttge, H. Andersson, I. Vermes, A. van den Berg, *Electrophoresis* **2006**, *27*, 5073-5080. *Viability study of HL60 cells in contact with commonly used microchip materials.*
- [177] C. R. Becer, R. Hoogenboom, U. S. Schubert, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 4900-4908. *Click chemistry beyond metal-catalyzed cycloaddition.*
- [178] R. B. Turner, P. Goebel, B. J. Mallon, A. D. Jarrett, *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 790-792. *Heats O Hydrogenation 9. Cyclic Acetylenes and Some Miscellaneous Olefins.*
- [179] F. L. Lin, H. M. Hoyt, H. van Halbeek, R. G. Bergman, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 2686-2695. *Mechanistic investigation of the staudinger ligation.*
- [180] Y. G. Gololobov, L. F. Kasukhin, *Tetrahedron* **1992**, *48*, 1353-1406. *Recent Advances in the Staudinger Reaction.*
- [181] E. Saxon, C. R. Bertozzi, *Science* **2000**, *287*, 2007-2010. *Cell surface engineering by a modified Staudinger reaction.*
- [182] C. Gauchet, G. R. Labadie, C. D. Poulter, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 9274-9275. *Regio- and chemoselective covalent immobilization of proteins through unnatural amino acids.*
- [183] G. A. Lemieux, C. L. De Graffenried, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 4708-4709. *A fluorogenic dye activated by the staudinger ligation.*
- [184] S. J. Luchansky, S. Argade, B. K. Hayes, C. R. Bertozzi, *Biochemistry* **2004**, *43*, 12358-12366. *Metabolic functionalization of recombinant glycoproteins.*
- [185] H. Ovaa, P. F. van Swieten, B. M. Kessler, M. A. Leeuwenburgh, E. Fiebiger, A. M. van den Nieuwendijk, P. J. Galardy, G. A. van der Marel, H. L. Ploegh, H. S. Overkleeft, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 3626-3629. *Chemistry in living cells: detection of active proteasomes by a two-step labeling strategy.*
- [186] A. Watzke, M. Kohn, M. Gutierrez-Rodriguez, R. Wacker, H. Schroder, R. Breinbauer, J. Kuhlmann, K. Alexandrov, C. M. Niemeyer, R. S. Goody, H. Waldmann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 1408-1412. *Site-selective protein immobilization by Staudinger ligation.*

- [187] Y. Wang, C. I. Vera, Q. Lin, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 4155-4158. *Convenient synthesis of highly functionalized pyrazolines via mild, photoactivated 1,3-dipolar cycloaddition.*
- [188] W. Song, Y. Wang, J. Qu, M. M. Madden, Q. Lin, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 2832-2835. *A photoinducible 1,3-dipolar cycloaddition reaction for rapid, selective modification of tetrazole-containing proteins.*
- [189] M. L. Blackman, M. Royzen, J. M. Fox, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 13518-13519. *Tetrazine ligation: fast bioconjugation based on inverse-electron-demand Diels-Alder reactivity.*
- [190] N. K. Devaraj, R. Weissleder, S. A. Hilderbrand, *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*, 2297-2299. *Tetrazine-based cycloadditions: application to pretargeted live cell imaging.*
- [191] M. Ober, H. Muller, C. Pieck, J. Gierlich, T. Carell, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 18143-18149. *Base pairing and replicative processing of the formamidopyrimidine-dG DNA lesion.*
- [192] S. Morgan, R. Larossa, A. Cheung, B. Low, D. Soll, *Arch. Biol. Med. Exp. (Santiago)* **1979**, *12*, 415-426. *Regulation of biosynthesis of aminoacyl-transfer RNA synthetases and of transfer-RNA in Escherichia coli.*
- [193] J. Plumbridge, D. Soll, *Mol. Gen. Genet.* **1989**, *216*, 113-119. *Characterization of cis-acting mutations which increase expression of a glnS-lacZ fusion in Escherichia coli.*
- [194] C. Alff-Steinberger, R. Epstein, *J. Theor. Biol.* **1994**, *168*, 461-463. *Codon preference in the terminal region of E. coli genes and evolution of stop codon usage.*
- [195] K. Gutschmiedl, C. T. Wirges, V. Ehmke, T. Carell, *Org. Lett.* **2009**, *11*, 2405-2408. *Copper-free "click" modification of DNA via nitrile oxide-norbornene 1,3-dipolar cycloaddition.*
- [196] R. Betous, L. Rey, G. Wang, M. J. Pillaire, N. Puget, J. Selves, D. S. Biard, K. Shin-ya, K. M. Vasquez, C. Cazaux, J. S. Hoffmann, *Mol. Carcinog.* **2009**, *48*, 369-378. *Role of TLS DNA polymerases eta and kappa in processing naturally occurring structured DNA in human cells.*

- [197] I. G. Minko, M. B. Harbut, I. D. Kozekov, A. Kozekova, P. M. Jakobs, S. B. Olson, R. E. Moses, T. M. Harris, C. J. Rizzo, R. S. Lloyd, *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 17075-17082. *Role for DNA polymerase kappa in the processing of N2-N2-guanine interstrand cross-links.*
- [198] E. Ohashi, T. Hanafusa, K. Kamei, I. Song, J. Tomida, H. Hashimoto, C. Vaziri, H. Ohmori, *Genes Cells* **2009**, *14*, 101-111. *Identification of a novel REV1-interacting motif necessary for DNA polymerase kappa function.*
- [199] R. Vasquez-Del Carpio, T. D. Silverstein, S. Lone, M. K. Swan, J. R. Choudhury, R. E. Johnson, S. Prakash, L. Prakash, A. K. Aggarwal, *PLoS One* **2009**, *4*, e5766. *Structure of human DNA polymerase kappa inserting dATP opposite an 8-OxoG DNA lesion.*
- [200] O. Ziv, N. Geacintov, S. Nakajima, A. Yasui, Z. Livneh, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2009**, *106*, 11552-11557. *DNA polymerase zeta cooperates with polymerases kappa and iota in translesion DNA synthesis across pyrimidine photodimers in cells from XPV patients.*
- [201] R. L. Wells, A. Han, *Int. J. Radiat. Bio./Relat. Stud. Phys. Chem. Med.* **1985**, *47*, 17-21. *Differences in sensitivity between human, mouse and Chinese hamster cells to killing by monochromatic ultraviolet light.*
- [202] K. Heil, D. Pearson, T. Carell, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 4271-4278. *Chemical investigation of light induced DNA bipyrimidine damage and repair.*
- [203] S. T. Kim, K. Malhotra, C. A. Smith, J. S. Taylor, A. Sancar, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 8535-8540. *Characterization of (6-4) photoproduct DNA photolyase.*
- [204] C. Auerbach, J. M. Robson, *Nature* **1946**, *157*, 302. *Chemical production of mutations.*
- [205] J. A. Butler, B. E. Conway, L. Gilbert, K. A. Smith, *Acta Unio Int. Contra Cancrum* **1951**, *7*, 443-447. *Chemical analogies in the action of ionizing radiations and of radiomimetic chemicals on nucleic acid.*
- [206] J. Cadet, et al., *Biol. Chem.* **2002**, *383*, 933-943. *Recent aspects of oxidative DNA damage: guanine lesions, measurement and substrate specificity of DNA repair glycosylases.*

- [207] T. Lindahl, B. Nyberg, *Biochemistry* **1974**, *13*, 3405-3410. *Heat-induced deamination of cytosine residues in deoxyribonucleic acid.*
- [208] D. L. Mitchell, R. S. Nairn, *Photochem. Photobiol.* **1989**, *49*, 805-819. *The biology of the (6-4) photoproduct.*
- [209] R. O. Rahn, J. L. Hosszu, *Photochem. Photobiol.* **1969**, *10*, 131-137. *Photochemical Studies of Thymine in Ice.*
- [210] M. N. Khattak, S. Y. Wang, *Tetrahedron* **1972**, *28*, 945-957. *Photochemical Mechanism of Pyrimidine Cyclobutyl Dimerization.*
- [211] A. Wacker, H. Dellweg, L. Trager, A. Kornhauser, E. Lodemann, G. Turck, R. Selzer, P. Chandra, M. Ishimoto, *Photochem. Photobiol.* **1964**, *3*, 369-394. *Organic Photochemistry of Nucleic Acids.*
- [212] D. L. Mitchell, R. S. Nairn, *Photochem. Photobiol.* **1989**, *49*, 805-819. *The Biology of the (6-4) Photoproduct.*
- [213] M. H. Patrick, S. Y. Wang, A. J. Varghese, C. S. Rupert, *Tex. J. Sci.* **1967**, *19*, 434-472. *Studies on Mechanism of Thymine-Derived Photoproduct Formation in Uv-Irradiated DNA.*
- [214] A. J. Varghese, S. Y. Wang, *Science* **1967**, *156*, 955-957. *Ultraviolet Irradiation of DNA in Vitro and in Vivo Produces a 3rd Thymine-Derived Product.*
- [215] A. J. Varghese, S. Y. Wang, *Science* **1968**, *160*, 186-187. *Thymine-Thymine Adduct as a Photoproduct of Thymine.*
- [216] S. Y. Wang, M. H. Patrick, A. J. Varghese, C. S. Rupert, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1967**, *57*, 465-472. *Concerning Mechanism of Formation of Uv-Induced Thymine Photoproducts in DNA.*
- [217] W. Yang, *Protein Sci.* **2011**, *20*, 1781-1789. *Surviving the sun: Repair and bypass of DNA UV lesions.*
- [218] G. B. Sancar, A. Sancar, *DNA Repair* **2006**, *408*, 121-156. *Purification and characterization of DNA photolyases.*
- [219] D. G. Lemaire, B. P. Ruzsicska, *Photochem. Photobiol.* **1993**, *57*, 755-769. *Quantum yields and secondary photoreactions of the photoproducts of dTpdT, dTpdC and dTpdU.*

- [220] K. Haiser, B. P. Fingerhut, K. Heil, A. Glas, T. T. Herzog, B. M. Pilles, W. J. Schreier, W. Zinth, R. de Vivie-Riedle, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, doi: 10.1002/anie.201106231. *Mechanism of UV-Induced DNA Dewar-Lesion Formation.*
- [221] L. S. Kan, L. Voituriez, J. Cadet, *J. Photochem. Photobiol. B* **1992**, *12*, 339-357. *The Dewar valence isomer of the (6-4) photoadduct of thymidyl-(3'-5')-thymidine monophosphate: formation, alkaline lability and conformational properties.*
- [222] J. Cadet, E. Sage, T. Douki, *Mutat. Res.* **2005**, *571*, 3-17. *Ultraviolet radiation-mediated damage to cellular DNA.*
- [223] C. Desnous, D. Guillaume, P. Clivio, *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 1213-1232. *Spore photoproduct: a key to bacterial eternal life.*
- [224] K. Heil, A. C. Kneuttinger, S. Schneider, U. Lischke, T. Carell, *Chemistry* **2011**, *17*, 9651-9657. *Crystal structures and repair studies reveal the identity and the base-pairing properties of the UV-induced spore photoproduct DNA lesion.*
- [225] T. Douki, B. Setlow, P. Setlow, *Photochem. Photobiol.* **2005**, *81*, 163-169. *Effects of the binding of alpha/beta-type small, acid-soluble spore proteins on the photochemistry of DNA in spores of Bacillus subtilis and in vitro.*
- [226] F. R. de Gruijl, H. J. van Kranen, L. H. Mullenders, *J. Photochem. Photobiol. B* **2001**, *63*, 19-27. *UV-induced DNA damage, repair, mutations and oncogenic pathways in skin cancer.*
- [227] M. R. Hussein, *J. Cutan. Pathol.* **2005**, *32*, 191-205. *Ultraviolet radiation and skin cancer: molecular mechanisms.*
- [228] H. L. Lo, S. Nakajima, L. Ma, B. Walter, A. Yasui, D. W. Ethell, L. B. Owen, *BMC Cancer* **2005**, *5*, 135. *Differential biologic effects of CPD and 6-4PP UV-induced DNA damage on the induction of apoptosis and cell-cycle arrest.*
- [229] H. S. Black, F. R. deGruijl, P. D. Forbes, J. E. Cleaver, H. N. Ananthaswamy, E. C. deFabo, S. E. Ullrich, R. M. Tyrrell, *J. Photochem. Photobiol. B* **1997**, *40*, 29-47. *Photocarcinogenesis: an overview.*

- [230] A. Sancar, *Adv. Protein Chem.* **2004**, 69, 73-100. *Photolyase and cryptochrome blue-light photoreceptors.*
- [231] L. H. Mullenders, A. van Hoffen, M. P. Vreeswijk, H. J. Ruven, H. Vrieling, A. A. van Zeeland, *Rec. Res. Canc. Res.* **1997**, 143, 89-99. *Ultraviolet-induced photolesions: repair and mutagenesis.*
- [232] Z. Palomera-Sanchez, M. Zurita, *DNA Repair* **2011**, 10, 119-125. *Open, repair and close again: chromatin dynamics and the response to UV-induced DNA damage.*
- [233] N. Tuteja, R. Tuteja, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **2001**, 36, 261-290. *Unraveling DNA repair in human: molecular mechanisms and consequences of repair defect.*
- [234] H. Park, K. Zhang, Y. Ren, S. Nadji, N. Sinha, J. S. Taylor, C. Kang, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, 99, 15965-15970. *Crystal structure of a DNA decamer containing a cis-syn thymine dimer.*
- [235] A. Sancar, F. W. Smith, G. B. Sancar, *J. Biol. Chem.* **1984**, 259, 6028-6032. *Purification of Escherichia coli DNA photolyase.*
- [236] G. B. Sancar, F. W. Smith, M. C. Lorence, C. S. Rupert, A. Sancar, *J. Biol. Chem.* **1984**, 259, 6033-6038. *Sequences of the Escherichia coli photolyase gene and protein.*
- [237] G. B. Sancar, *Nucleic Acids Res.* **1985**, 13, 8231-8246. *Sequence of the Saccharomyces cerevisiae PHR1 gene and homology of the PHR1 photolyase to E. coli photolyase.*
- [238] S. Weber, *Biochim. Biophys. Acta.* **2005**, 1707, 1-23. *Light-driven enzymatic catalysis of DNA repair: a review of recent biophysical studies on photolyase.*
- [239] N. Ozturk, Y. T. Kao, C. P. Selby, I. H. Kavakli, C. L. Partch, D. Zhong, A. Sancar, *Biochemistry* **2008**, 47, 10255-10261. *Purification and characterization of a type III photolyase from Caulobacter crescentus.*
- [240] T. Todo, H. Takemori, H. Ryo, M. Ihara, T. Matsunaga, O. Nikaido, K. Sato, T. Nomura, *Nature* **1993**, 361, 371-374. *A New Photoreactivating Enzyme That Specifically Repairs Ultraviolet Light-Induced (6-4)Photoproducts.*

- [241] X. Zhao, D. Mu, *Histol. Histopathol.* **1998**, *13*, 1179-1182. (6-4) photolyase: light-dependent repair of DNA damage.
- [242] J. J. Chen, D. L. Mitchell, A. B. Britt, *Plant Cell* **1994**, *6*, 1311-1317. A Light-Dependent Pathway for the Elimination of UV-Induced Pyrimidine (6-4) Pyrimidinone Photoproducts in Arabidopsis.
- [243] K. Hitomi, S. T. Kim, S. Iwai, N. Harima, E. Otoshi, M. Ikenaga, T. Todo, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 32591-32598. Binding and catalytic properties of *Xenopus* (6-4) photolyase.
- [244] S. T. Kim, K. Malhotra, J. S. Taylor, A. Sancar, *Photochem. Photobiol.* **1996**, *63*, 292-295. Purification and partial characterization of (6-4) photoproduct DNA photolyase from *Xenopus laevis*.
- [245] S. Nakajima, et al., *Nucleic Acids Res.* **1998**, *26*, 638-644. Cloning and characterization of a gene (UVR3) required for photorepair of 6-4 photoproducts in *Arabidopsis thaliana*.
- [246] J. L. Johnson, S. Hammalvarez, G. Payne, G. B. Sancar, K. V. Rajagopalan, A. Sancar, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1988**, *85*, 2046-2050. Identification of the 2nd Chromophore of *Escherichia-Coli* and Yeast DNA Photolyases as 5,10-Methenyltetrahydrofolate.
- [247] M. S. Jorns, B. Y. Wang, S. P. Jordan, L. P. Chanderkar, *Biochemistry* **1990**, *29*, 552-561. Chromophore Function and Interaction in *Escherichia-Coli* DNA Photolyase - Reconstitution of the Apoenzyme with Pterin and or Flavin Derivatives.
- [248] R. Kort, H. Komori, S. Adachi, K. Miki, A. Eker, *Acta Crystallogr. D* **2004**, *60*, 1205-1213. DNA apophotolyase from *Anacystis nidulans*: 1.8 angstrom structure, 8-HDF reconstitution and X-ray-induced FAD reduction.
- [249] T. Todo, S. T. Kim, K. Hitomi, E. Otoshi, T. Inui, H. Morioka, H. Kobayashi, E. Ohtsuka, H. Toh, M. Ikenaga, *Nucleic Acids Res.* **1997**, *25*, 764-768. Flavin adenine dinucleotide as a chromophore of the *Xenopus* (6-4)photolyase.
- [250] G. Payne, A. Sancar, *Biochemistry* **1990**, *29*, 7715-7727. Absolute action spectrum of E-FADH₂ and E-FADH₂-MTHF forms of *Escherichia coli* DNA photolyase.

- [251] S. Asgatay, C. Petermann, D. Harakat, D. Guillaume, J. S. Taylor, P. Clivio, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 12618-12619. *Evidence that the (6-4) photolyase mechanism can proceed through an oxetane intermediate.*
- [252] S. K. Matus, J. L. Fourrey, P. Clivio, *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1*, 3316-3320. *Synthesis of the TT pyrimidine (6-4) pyrimidone photoproduct-thio analogue phosphoramidite building block.*
- [253] X. Zhao, J. Liu, D. S. Hsu, S. Zhao, J. S. Taylor, A. Sancar, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 32580-32590. *Reaction mechanism of (6-4) photolyase.*
- [254] M. K. Cichon, S. Arnold, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 767-770. *A (6-4) photolyase model: repair of DNA (6-4) lesions requires a reduced and deprotonated flavin.*
- [255] J. Yamamoto, K. Hitomi, R. Hayashi, E. D. Getzoff, S. Iwai, *Biochemistry* **2009**, *48*, 9306-9312. *Role of the carbonyl group of the (6-4) photoproduct in the (6-4) photolyase reaction.*
- [256] K. Hitomi, H. Nakamura, S. T. Kim, T. Mizukoshi, T. Ishikawa, S. Iwai, T. Todo, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 10103-10109. *Role of two histidines in the (6-4) photolyase reaction.*
- [257] J. Yamamoto, K. Hitomi, T. Todo, S. Iwai, *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, 4406-4415. *Chemical synthesis of oligodeoxyribonucleotides containing the Dewar valence isomer of the (6-4) photoproduct and their use in (6-4) photolyase studies.*
- [258] M. T. Reetz, D. Kahakaev, J. Sanchis, *Mol. Biosyst.* **2009**, *5*, 115-122.
- [259] M. T. Reetz, D. Kahakeaw, J. Sanchis, *Mol. Biosyst.* **2009**, *5*, 115-122. *Shedding light on the efficacy of laboratory evolution based on iterative saturation mutagenesis.*
- [260] J. Sanchis, et al., *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2008**, *81*, 387-397. *Improved PCR method for the creation of saturation mutagenesis libraries in directed evolution: application to difficult-to-amplify templates.*

7 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

(h)pol η	(<i>humane</i>) Polymerase η
(Na ₂)EDTA	(Dinatrium-) Ethylendiamintetraessigsäure
A	Adenosin
a.u.	ohne Einheit
AaRS	Aminoacyl-tRNA Synthetase
abs.	absolut
add	auffüllen auf
AmpR	Ampicillin Resistenz
APS	Ammoniumpersulfat
BER	Basen Exzisionsreparatur (<i>base excision repair</i>)
BSA	Bovines Serumalbumin
C	Cytosin
C	Kohlenstoff
ca.	circa
CMR	Chloramphenicol Resistenz
CPD	Cyclobutanpyrimidin Dimer
CRY	Cryptochrom
CRY-DASH	Cryptochrom- <i>Drosophila</i> , <i>Arabidopsis</i> , <i>Synechocystis</i> , <i>Human</i>
CuAAC	Cu(I) katalysierte Alkin-Azid Cycloaddition
CV	Säulenvolumen (<i>column volume</i>)
Cyc	N- ϵ -cyclopentylloxycarbonyl-L-lysin
dest.	destilliert
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	Desoxyribonukleintriphosphat
DSBR	Doppelstrangbruch-Reparatur (<i>double strand break repair</i>)
dsDNA	doppelsträngige DNA (<i>double strand DNA</i>)
DTT	Dithiotreithol
eGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
eq	Äquivalente
eYFP	enhanced yellow fluorescent protein
F ₀	7,8-Didemethyl-8-hydro-5-deazaflavin
FAD	Flavinadenindinukleotid

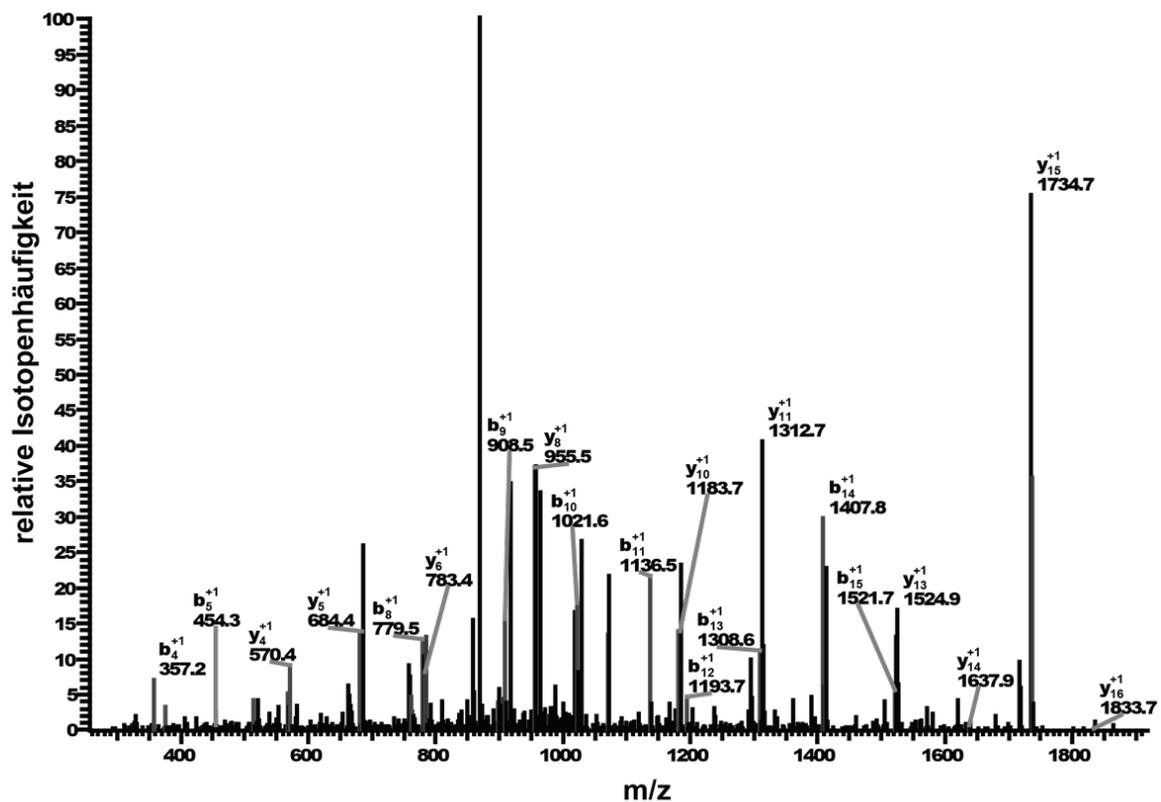
Fluo	Fluoreszein
FRET	Förster-Resonanzenergietransfers
<i>fw</i>	<i>forward</i>
g	Erdbeschleunigung
G	Guanosin
GlnRS	Glutaminyl-tRNA Synthetase
HA	Hydroxylamin
HRP	Meerrettichperoxidase (<i>horse radish peroxidase</i>)
IPTG	Isopropyl- β -thiogalactopyranosid
ISM	Iterative Saturierungsmutagenese
LB	<i>lysogeny broth</i>
MALDI	<i>Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization</i>
MMR	Falschpaarungs-Reparatur (<i>mismatch repair</i>)
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (<i>messenger Ribonucleic acid</i>)
MS	Massenspektrum
MtbB	Dimethylamin-Methyltransferase
MTHF	5,10-Methenyltetrahydrofolylpolyglutamat
MtmB	Monomethylamin-Methyltransferase
MttB	Trimethylamin-Methyltransferase
mut	mutiert
MW	Molekulargewicht (<i>molecular weight</i>)
N	Stickstoff
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NCS	N-Chlorosuccinimid
NER	Nukleotid-Exzisionsreparatur (<i>nucleotide excision repair</i>)
Norb	Norbornen
NorRS	Norb-Lysyl-tRNA Synthetase
OD	optische Dichte
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (<i>phosphate-buffered saline</i>)
PBS-T	PBS mit <i>Tween20</i>
PCM	<i>polarizable continuum model</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PDB	Protein-Datenbank (<i>protein database</i>)
PEG	Polyethylenglycol
pGLN	GlnRS-Promoter

Polk	Polymerase κ
proK	Lys-tRNA-Promoter
PSTK	O-Phosphoseryl-tRNA Kinase
PTM	Posttranslationale Modifikation
pTRP	Tryptophan-Promoter
Pyl	Pyrrolysin
PylRS	pyrrolysyl-tRNA Synthetase
PylT	Pyl-tRNA
RF	<i>release</i> Faktor
RNA	Ribonukleinsäure (<i>Ribonucleic acid</i>)
RP-HPLC	<i>Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography</i>
<i>rv</i>	<i>reverse</i>
SASP	<i>small acid soluble proteins</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>Sodiumdodecylsulfate</i>)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Sec	Selenocystein
SECIS	<i>selenocysteine insertion element</i>
SepSecS	Sep-tRNA:Sec-tRNA Synthase
SerRS	Seryl-tRNA-Synthetase
SSBR	Einzelstrangbruch-Reparatur (<i>single strand break repair</i>)
ssDNA	einzelsträngige DNA (<i>single strand DNA</i>)
T	Thymin
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TB	<i>terrific broth</i>
TBTA	Tris[(1-benzyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl]amin
terK	Lysyl-tRNA-Terminator
tRNA	transfer RNA
U	Uracyl
UAA	unnatürliche Aminosäure
ÜN	über Nacht
UV	ultraviolett
wt	Wildtyp
λ_{Abs}	Absorptions-Wellenlänge
λ_{Em}	Emmissions-Wellenlänge
λ_{max}	Wellenlänge bei maximaler Absorption

8 ANHANG

Tabelle 8.1: Übersicht der gefundenen Peptidmassen ($[M+H]^+$) nach der Click-Reaktion von 3 mut-YFP mit den Zuckeraziden 6-9 und deren Artefakt-Wahrscheinlichkeit (min. p-Wert).

Protein	Peptidsequenz	$[M+H]^+$	min. p-Wert
eYFP	R.AEVKFEGDTLVNRIELK.G	1961,07	$5,40 \times 10^{-05}$
	R.AEVKFEGDTLVNR.I	1477,76	$7,88 \times 10^{-02}$
1 mut	R.AEVK*FEGDTLVNR.I	1559,77	$2,28 \times 10^{-11}$
	K.TRAEVK*FEGDTLVNR.I	1816,92	$8,20 \times 10^{-11}$
1 mut ⁶	R.AEVK ⁶ FEGDTLVNR.I	1764,84	$3,06 \times 10^{-06}$
1 mut ⁷	R.AEVK ⁷ FEGDTLVNR.I	1937,91	$2,08 \times 10^{-03}$
1 mut ⁸	R.AEVK ⁸ FEGDTLVNR.I	1864,93	$2,06 \times 10^{-06}$
	K.TRAEVK ⁸ FEGDTLVNR.I	2122,08	$5,86 \times 10^{-02}$
1 mut ⁹	R.AEVK ⁹ FEGDTLVNR.I	1808,87	$8,40 \times 10^{-05}$
3 mut	F.TGVVPILVELDGDVNGHK*F.S	2091,08	$1,00 \times 10^{-30}$
	F.FKDDGNYKTRAEVK*F.E	1899,92	$3,84 \times 10^{-05}$
	R.AEVK*FEGDTLVNR.I	1559,77	$7,03 \times 10^{-10}$
	K.GIDFK*EDGNILGHK.L	1624,80	$3,52 \times 10^{-12}$
3 mut ⁹	F.TGVVPILVELDGDVNGHK ⁹ F.S	2340,17	$5,76 \times 10^{-05}$
	R.AEVK ⁹ FEGDTLVNR.I	1808,87	$7,08 \times 10^{-04}$
	K.GIDFK ⁹ EDGNILGHK.L	1873,89	$3,61 \times 10^{-02}$



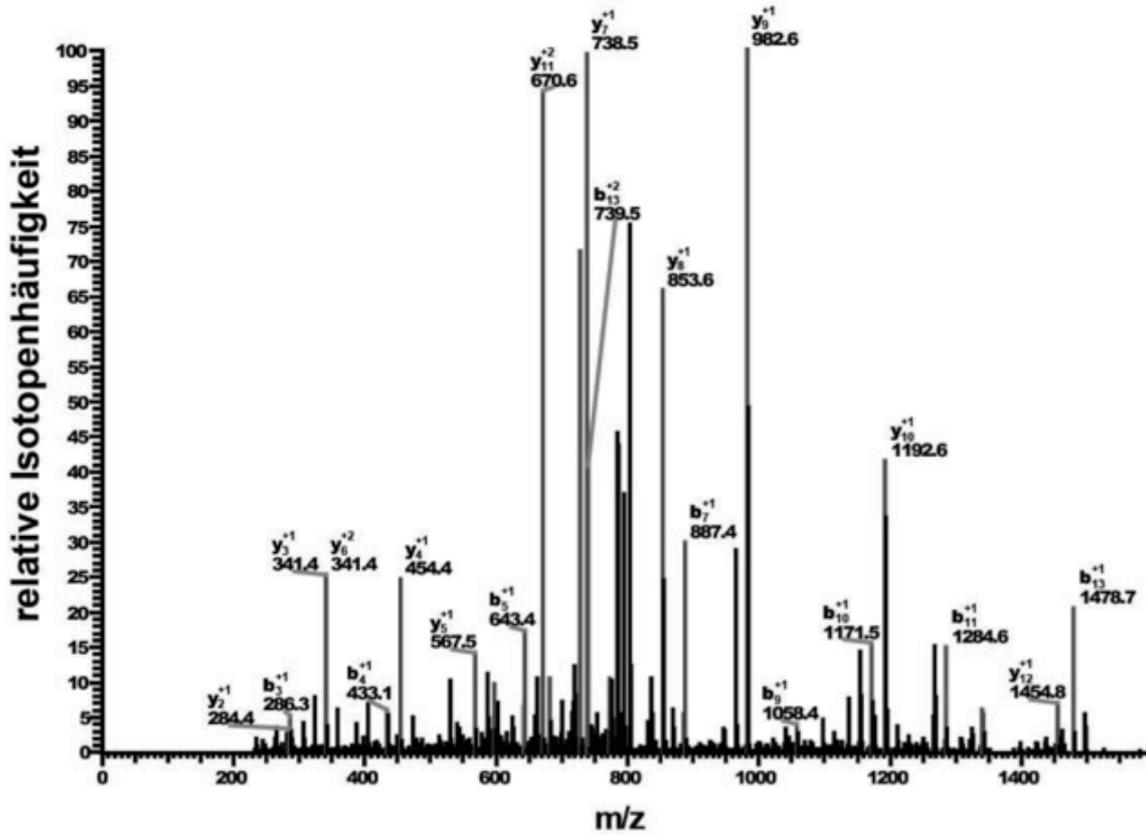
Ionen-Serie mit +1 Ladung

Aminosäure	B-Ionen	Y-Ionen
T	102.05	-
G	159.08	1990.03
V	258.14	1933.01
V	357.21	1833.94
P	454.27	1734.87
I	567.35	1637.82
L	680.43	1524.73
V	779.50	1411.65
E	908.55	1312.58
L	1021.63	1183.54
D	1136.66	1070.45
G	1193.68	955.43
D	1308.70	898.41
V	1407.77	783.38
N	1521.82	684.31
G	1578.84	570.27
H	1715.90	513.25
K*	1926.00	376.19
F	-	166.09

Ionen-Serie mit +2 Ladung

Amino acid	B-Ionen	Y-Ionen
T	51.53	-
G	80.04	995.52
V	129.58	967.01
V	179.11	917.47
P	227.64	867.94
I	284.18	819.41
L	340.72	762.87
V	390.25	706.33
E	454.78	656.79
L	511.78	592.27
D	568.83	535.73
G	597.34	478.22
D	654.86	449.71
V	704.39	392.19
N	761.41	342.66
G	789.92	285.64
H	858.45	257.13
K*	963.50	188.60
F	-	83.55

Abbildung 8.1: MS/MS Spektrum des chymotryptisch erzeugten Peptids TGVPILVELDGDVNGHK*F (K* = Position des Alkin-Lysins) aus 3 mut-YFP. Die tabellarische Aufstellung der Ionen-Serien aus der B- und Y-Fragmentierung ist unten dargestellt.



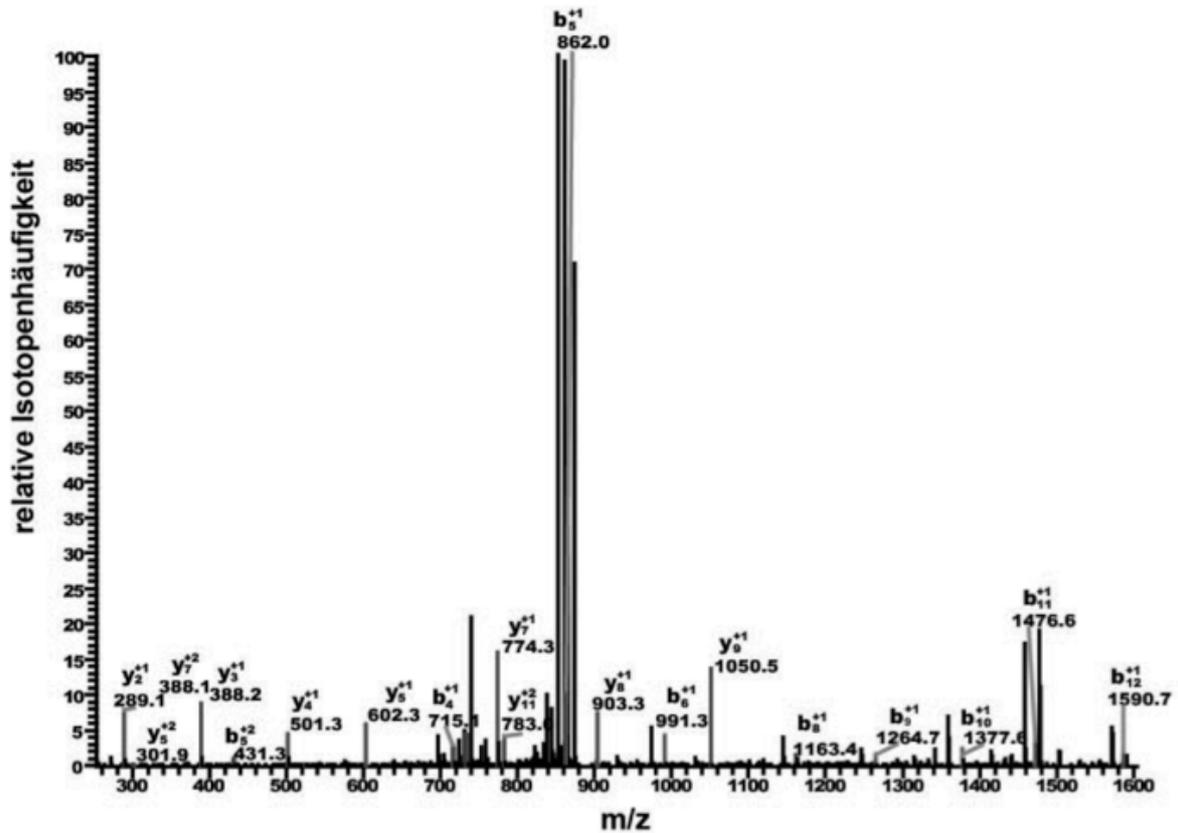
Ionen-Serie mit +1 Ladung

Aminosäure	B-Ionen	Y-Ionen
G	58.03	-
I	171.11	1567.78
D	286.14	1454.69
F	433.21	1339.66
K*	643.31	1192.60
E	772.35	982.50
D	887.38	853.45
G	944.40	738.43
N	1058.44	681.40
I	1171.53	567.36
L	1284.61	454.28
G	1341.63	341.19
H	1478.69	284.17
K	-	147.11

Ionen-Serie mit +2 Ladung

Aminosäure	B-Ionen	Y-Ionen
G	29.52	-
I	86.06	784.39
D	143.57	727.85
F	217.11	670.34
K*	322.16	596.80
E	386.68	491.75
D	444.19	427.23
G	472.70	369.72
N	529.72	341.21
I	586.27	284.18
L	642.81	227.64
G	671.32	171.10
H	739.85	142.59
K	-	74.06

Abbildung 8.2: MS/MS Spektrum des tryptisch erzeugten Peptids GIDFK*EDGNILGHK (K* = Position des Alkin-Lysins) aus 3 mut-YFP. Die tabellarische Aufstellung der Ionen-Serien aus der B- und Y-Fragmentierung ist unten dargestellt.



Ionen-Serie mit +1 Ladung

Aminosäure	B-Ionen	Y-Ionen
A	72.04	-
E	201.09	1693.80
V	300.16	1564.76
K*	715.33	1465.69
F	862.39	1050.52
E	991.44	903.45
G	1048.46	774.41
D	1163.49	717.39
T	1264.53	602.36
L	1377.62	501.31
V	1476.69	388.23
N	1590.73	289.16
R	-	175.12

Ionen-Serie mit +2 Ladung

Aminosäure	B-Ionen	Y-Ionen
A	36.53	-
E	101.05	847.41
V	150.58	782.88
K*	358.17	733.35
F	431.70	525.76
E	496.22	452.23
G	524.73	387.71
D	582.25	359.20
T	632.77	301.68
L	689.31	251.16
V	738.85	194.62
N	795.87	145.08
R	-	88.06

Abbildung 8.3: MS/MS Spektrum des tryptisch erzeugten Peptids TGVVPILVELDGDVNGHK⁸F (K* = Position des Click-Produkts von Alkin-Lysin + 8) aus 3 mut-YFP. Die tabellarische Aufstellung der Ionen-Serien aus der B- und Y-Fragmentierung ist unten dargestellt.

Tabelle 8.2: Ergebnisse des Expressions-Assays mit der PyIRS Tyr306NNK-Trp417NNK Bibliothek in Anwesenheit von HA-Lysin.

I	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	9	17	40	22	313	53	47	45	16	17	24	34
B	22	121	33	38	28	30	34	33	24	25	21	42
C	22	36	22	92	17	24	29	30	114	25	20	22
D	12	49	28	112	59	34	45	47	39	31	30	48
E	34	74	45	29	35	42	44	42	42	78	36	18
F	43	20	43	42	67	42	41	42	46	49	50	40
G	88	53	177	123	43	38	50	55	31	42	14	213
H	42	41	56	49	38	168	86	57	48	76	45	54

VII	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	17	18	7	24	7	26	32	42	29	27	26	147
B	51	36	40	43	37	62	39	37	43	42	189	121
C	22	17	34	34	33	29	44	16	37	36	40	34
D	34	32	158	68	154	40	22	41	37	16	40	60
E	44	48	38	39	67	38	28	18	44	33	56	85
F	44	75	43	44	33	41	50	60	49	60	60	64
G	30	38	23	63	25	52	13	44	34	37	28	135
H	47	694	62	48	84	55	54	45	210	45	48	73

II	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	23	23	28	42	23	36	26	30	40	35	42	38
B	38	50	57	49	46	42	56	49	51	56	37	54
C	35	171	43	64	47	38	670	45	43	74	46	53
D	22	44	57	158	31	58	59	52	60	61	57	85
E	47	41	42	43	31	38	55	34	41	44	70	50
F	48	56	52	46	41	149	51	53	526	57	87	42
G	67	69	51	66	69	35	68	37	15	73	90	283
H	50	147	51	55	44	172	53	52	51	54	79	58

VIII	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	19	26	26	28	29	31	32	28	36	31	66	72
B	42	36	27	14	97	50	34	50	33	33	108	78
C	21	19	15	18	20	139	10	21	15	27	47	59
D	28	47	130	58	33	37	13	41	44	40	48	239
E	44	28	23	35	39	29	35	31	28	25	40	47
F	49	48	44	37	48	241	35	45	41	51	42	48
G	47	41	28	26	158	39	36	44	48	35	40	30
H	61	56	39	44	48	38	48	47	49	48	58	31

III	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	31	17	21	24	30	41	53	31	40	65	68	51
B	97	415	111	78	111	91	104	106	91	104	79	99
C	38	284	22	23	26	39	80	80	55	191	81	55
D	47	51	62	54	124	48	54	117	96	56	110	53
E	34	24	56	40	40	60	55	67	65	336	92	55
F	64	56	60	64	56	59	161	63	60	76	69	46
G	53	44	111	42	24	38	48	67	43	97	56	208
H	60	48	103	60	62	61	61	94	72	57	72	44

IX	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	46	41	45	41	38	47	32	42	46	47	35	43
B	36	35	144	49	33	51	26	78	50	45	39	108
C	37	79	50	48	51	24	82	39	52	34	45	46
D	84	324	55	47	45	52	57	55	36	53	50	38
E	34	39	46	48	39	24	45	87	37	47	44	58
F	50	325	51	43	212	408	55	62	42	50	48	35
G	40	49	36	39	37	45	41	186	43	41	184	51
H	305	43	61	45	49	96	54	50	48	60	40	41

IV	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	19	19	20	14	20	22	17	263	30	21	119	18
B	22	36	19	46	22	17	11	19	27	30	27	29
C	24	19	15	21	13	17	5	25	20	18	28	33
D	71	180	83	252	97	74	18	201	16	69	22	37
E	27	49	23	102	23	67	23	27	29	30	33	31
F	18	24	27	16	26	82	20	25	96	32	53	32
G	28	24	24	26	24	27	23	31	93	34	29	172
H	21	59	30	120	33	36	40	36	42	53	158	47

X	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	92	291	36	27	42	38	45	39	42	34	75	44
B	97	50	127	56	54	49	50	49	32	51	24	66
C	68	324	34	30	32	43	42	26	43	47	35	42
D	54	83	48	58	151	49	48	50	50	53	674	40
E	25	36	41	32	28	70	179	104	29	40	49	33
F	77	100	52	78	37	77	48	22	48	51	55	50
G	206	48	208	40	45	41	61	21	44	45	684	205
H	43	50	58	52	47	58	56	48	59	49	56	50

V	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	19	16	12	4	15	52	19	63	16	17	24	20
B	25	35	32	37	37	46	19	28	34	34	30	36
C	53	72	1074	52	247	230	11	21	39	26	28	21
D	19	30	35	92	26	39	33	34	24	45	22	48
E	39	87	31	24	8	30	22	32	58	36	39	47
F	24	40	73	60	32	125	32	37	32	55	36	47
G	57	27	31	38	34	29	32	39	63	48	166	150
H	43	28	57	144	33	47	43	39	43	50	24	49

XI	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	88	187	63	23	47	26	44	47	271	54	60	41
B	51	39	38	38	46	36	37	46	45	43	23	17
C	44	43	39	54	55	48	214	48	56	56	45	40
D	46	43	46	38	123	38	39	43	48	223	40	91
E	307	21	53	39	53	43	53	57	40	49	58	44
F	57	88	48	51	69	53	71	47	47	48	43	52
G	68	148	382	41	45	61	40	31	309	57	60	63
H	50	48	42	49	38	35	43	34	46	46	45	31

VI	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	30	38	24	63	27	17	12	130	23	13	102	22
B	31	50	46	38	488	29	34	86	10	35	23	24
C	37	45	44	25	36	36	36	28	34	30	26	29
D	39	50	50	24	41	35	38	24	41	30	58	78
E	33	39	32	13	31	37	35	37	39	53	38	27
F	69	62	49	50	43	62	34	47	55	48	49	54
G	70	35	33	22	58	88	32	153	32	39	52	87
H	36	40	266	64	44	48	69	55	92	46	43	37

XII	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	29	25	26	26	33	10	41	22	25	23	24	24
B	45	31	33	55	20	29	26	27	153	185	45	32
C	31	33	27	127	14	14	51	13	44	32	32	29
D	32	29	17	51	21	35	45	47	34	41	37	46
E	25	39	24	23	22	34	35	29	27	26	13	47
F	33	31	27	30	27	45	33	36	35	40	50	46
G	18	21	22	29	25	27	39	26	27	32	23	83
H	29	429	38	32	31	32	93	32	31	24	26	0

Tabelle 8.3: Ergebnisse des Expressions-Assays mit der PyIRS Tyr306NNK-Trp417NNK Bibliothek in Anwesenheit von Norb-Lysin.

I	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	42	39	40	39	42	135	136	19	130	431	51	38
B	27	53	21	39	73	51	54	38	53	43	47	85
C	24	42	30	43	37	26	36	40	32	41	35	35
D	35	51	50	32	48	46	44	331	117	66	42	54
E	36	36	37	22	29	20	22	30	29	78	29	19
F	38	36	56	42	24	40	34	43	44	115	44	33
G	483	35	22	125	29	32	110	95	28	23	28	117
H	46	40	43	44	55	28	49	41	223	50	32	72

VII	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	75	35	19	15	21	31	32	43	31	28	23	24
B	23	29	30	25	29	67	51	58	24	46	51	60
C	28	30	22	27	37	39	491	31	116	77	25	63
D	41	95	12	31	101	39	44	42	148	33	16	7
E	39	29	48	40	46	33	31	45	58	57	42	6
F	53	52	56	49	31	52	49	53	29	146	49	37
G	30	35	31	38	47	23	36	39	44	28	32	135
H	34	38	40	61	57	85	35	42	30	50	58	48

II	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	30	47	37	25	28	36	29	78	20	33	36	146
B	44	54	48	68	55	44	28	447	47	48	56	46
C	32	30	38	37	44	39	35	48	113	33	39	41
D	56	52	54	49	155	53	59	46	59	39	58	63
E	46	80	40	48	97	46	36	43	52	50	51	51
F	68	65	39	173	55	81	62	86	89	66	57	49
G	40	41	51	48	43	43	21	53	43	54	36	134
H	52	90	34	59	107	151	53	32	162	28	47	73

VIII	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	37	35	35	36	46	36	47	43	39	55	44	70
B	47	57	53	56	40	49	53	61	47	47	58	169
C	40	44	36	45	42	53	52	46	42	50	31	80
D	29	65	51	59	79	61	48	62	90	55	63	44
E	49	70	45	53	42	44	34	45	54	38	20	51
F	64	180	52	38	56	63	61	136	58	177	86	75
G	37	41	50	298	41	37	43	73	60	61	177	139
H	53	49	53	56	109	84	107	62	47	70	39	50

III	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	28	33	42	40	41	39	70	35	35	40	40	42
B	45	43	34	48	146	36	42	47	30	49	54	41
C	139	42	36	35	128	35	16	35	46	26	140	19
D	49	89	54	131	38	26	250	20	48	40	41	42
E	42	45	31	31	34	24	44	136	36	48	25	44
F	51	52	306	54	40	50	51	50	39	51	45	74
G	28	39	60	56	30	46	41	44	38	43	129	128
H	53	93	89	33	23	51	47	533	379	43	44	55

IX	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	23	39	20	44	36	66	115	55	40	44	46	38
B	36	53	50	52	47	50	50	59	61	56	59	74
C	46	38	79	136	38	42	36	33	643	33	43	397
D	48	50	131	54	81	46	47	30	82	60	70	64
E	36	47	57	39	32	45	47	50	41	31	76	165
F	38	51	101	45	46	54	48	54	45	167	51	50
G	48	47	38	38	62	19	39	50	47	41	28	139
H	42	52	57	47	54	139	56	105	69	176	45	52

IV	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	119	48	33	44	47	44	132	39	33	51	145	43
B	46	49	50	113	58	51	45	52	41	58	32	49
C	127	128	44	40	61	64	47	36	41	380	58	28
D	55	46	54	58	48	133	141	57	62	28	38	46
E	49	43	32	46	19	67	28	80	41	113	48	49
F	27	173	57	47	45	49	39	50	44	55	49	50
G	46	46	41	44	43	48	37	33	44	56	49	341
H	58	60	129	168	58	53	61	56	59	275	50	53

X	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	52	50	47	38	45	77	42	47	49	44	31	33
B	183	71	60	56	67	43	61	65	54	40	51	388
C	37	52	46	55	37	19	43	61	47	50	28	28
D	94	70	50	49	53	39	58	59	27	335	55	60
E	49	56	47	48	146	52	46	25	34	52	50	39
F	59	56	147	167	40	55	77	60	116	28	56	41
G	45	53	55	40	69	52	54	150	87	157	60	146
H	150	58	63	39	59	59	58	57	62	62	59	48

V	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	17	203	43	38	34	26	46	29	41	33	45	36
B	251	59	50	30	50	53	49	125	43	67	34	38
C	118	48	55	58	44	23	46	127	42	50	97	45
D	49	44	175	48	381	154	48	29	105	56	57	25
E	21	52	53	84	46	41	49	17	42	43	174	71
F	63	68	48	49	137	58	60	46	56	187	59	172
G	37	43	49	50	54	142	50	143	379	39	54	150
H	45	60	72	67	85	65	406	53	56	181	65	63

XI	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	27	31	23	29	32	29	78	20	168	14	33	53
B	50	47	34	61	105	39	45	45	47	45	43	45
C	57	554	60	141	49	40	42	28	38	45	121	58
D	27	53	68	165	49	52	54	53	152	39	43	59
E	42	42	34	50	40	554	63	48	45	47	45	42
F	65	38	60	38	50	54	54	66	61	87	55	81
G	532	52	33	35	31	28	48	32	30	47	48	130
H	54	67	59	53	78	48	57	33	228	59	46	70

VI	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	147	52	47	39	38	42	45	22	38	23	51	51
B	37	50	51	564	66	44	38	46	60	48	44	52
C	65	11	29	22	51	48	37	45	21	30	52	44
D	189	78	66	51	42	127	76	25	58	51	58	58
E	45	579	47	31	34	38	70	23	129	53	41	38
F	65	63	43	48	36	42	43	27	61	39	284	40
G	41	44	42	39	57	49	10	39	20	25	56	127
H	68	76	60	47	64	99	57	46	59	27	62	54

XII	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	46	98	38	44	26	47	49	34	41	17	29	36
B	33	39	37	57	49	52	55	318	47	54	40	54
C	64	41	46	41	230	38	39	39	27	41	38	131
D	72	59	49	43	192	47	41	44	49	52	74	53
E	42	47	22	46	19	45	30	43	44	95	47	183
F	82	53	40	56	41	72	72	51	56	57	67	136
G	40	47	49</									

Tabelle 8.4: Ergebnisse des Expressions-Assays mit der PyIRS Val 401NNK-Ile405NNK Bibliothek in Anwesenheit von HA-Lysin.

I	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	6	15	717	597	23	43	46	743	23	57	40	37
B	4	22	25	42	39	41	32	521	45	35	710	4.754
C	42	36	26	99	634	631	731	22	44	43	28	119
D	161	36	39	649	558	47	46	45	44	42	34	127
E	678	43	6	42	28	38	39	50	37	24	37	83
F	45	23	642	599	592	44	25	50	42	45	22	3.773
G	31	39	552	35	599	45	683	43	19	42	46	607
H	5	34	661	36	41	32	42	128	44	45	53	536

VII	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	27	42	29	389	23	24	37	35	418	402	37	30
B	19	36	23	55	34	25	489	40	32	35	39	3.442
C	47	39	584	27	26	20	41	521	44	578	31	159
D	515	316	587	42	49	289	38	38	54	134	371	135
E	32	470	55	29	27	41	446	49	25	621	35	32
F	36	37	512	493	92	35	28	44	45	38	133	3.838
G	37	532	108	32	588	45	44	25	24	42	39	553
H	35	41	42	548	28	39	41	38	37	26	620	545

II	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	19	23	21	10	7	44	12	55	17	26	377	206
B	524	43	50	44	445	30	9	582	424	307	36	24
C	32	483	47	13	37	40	9	42	26	322	45	72
D	35	40	26	531	40	25	10	40	42	39	43	42
E	555	24	331	28	35	33	6	319	21	40	43	45
F	6	22	35	304	502	43	38	48	385	33	172	286
G	6	24	425	23	368	66	38	22	39	48	506	35
H	10	7	23	286	46	36	38	24	26	28	22	37

VIII	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	7	8	8	9	10	8	90	334	27	44	30	339
B	6	7	11	9	7	11	10	43	46	439	38	31
C	10	8	7	7	8	11	47	110	431	36	483	26
D	5	7	8	8	7	22	433	12	7	29	28	55
E	8	8	10	11	10	10	8	8	362	24	45	23
F	6	6	11	8	11	9	10	7	9	37	9	505
G	8	6	5	11	7	9	9	10	8	497	430	22
H	10	6	11	10	8	7	9	6	7	502	39	34

III	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	74	20	30	4	5	578	35	623	556	37	530	35
B	23	16	18	31	28	36	878	25	566	38	36	22
C	35	536	395	45	173	560	23	29	383	19	127	40
D	19	470	42	35	33	25	23	610	38	21	31	38
E	16	269	22	34	21	538	60	560	40	533	40	36
F	31	25	36	4	359	37	35	614	22	37	204	42
G	17	528	34	34	5	491	22	22	27	559	42	296
H	5	480	17	6	31	17	25	18	59	54	43	17

IX	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	393	6	168	1	340	72	11	18	78	118	32	421
B	40	52	483	20	99	22	17	31	34	253	34	495
C	29	34	2	30	511	20	527	20	36	150	22	355
D	40	3	64	3	33	95	33	50	22	36	20	35
E	1	34	37	508	33	55	36	38	22	493	37	129
F	243	87	5	276	32	700	25	39	19	601	587	347
G	2	2	30	37	13	42	41	29	16	34	20	573
H	3	2	17	4	5	840	67	20	31	36	401	135

IV	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	37	33	35	348	49	24	34	38	50	84	35	31
B	502	38	25	47	43	530	46	25	33	42	233	40
C	616	21	54	26	22	283	42	48	44	27	148	46
D	36	36	109	529	24	449	25	550	44	30	345	38
E	22	33	426	39	28	38	39	579	6	58	34	529
F	566	46	68	36	10	474	24	57	28	356	135	23
G	468	58	21	512	23	549	34	38	24	24	36	40
H	25	38	45	64	23	20	38	39	38	318	459	20

X	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	497	19	36	55	35	28	528	38	37	316	37	33
B	33	468	33	21	568	384	31	39	4	63	39	40
C	450	32	35	19	33	513	39	38	516	39	603	599
D	32	504	443	37	19	534	512	34	20	31	198	21
E	465	37	24	72	456	19	533	22	86	37	40	45
F	440	36	29	371	33	42	539	560	47	41	498	225
G	465	33	472	27	535	241	25	18	536	24	39	584
H	261	501	18	18	22	518	34	30	43	46	31	39

V	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	19	29	23	27	38	31	20	60	31	21	404	36
B	68	29	23	37	612	525	536	26	39	35	49	31
C	31	57	39	37	34	25	39	83	24	618	36	38
D	32	24	555	547	48	532	436	27	40	41	33	76
E	36	510	7	43	570	40	34	19	568	34	239	78
F	34	342	769	125	15	562	24	40	594	24	42	59
G	37	305	23	40	36	38	37	574	36	525	16	573
H	23	36	23	61	46	35	39	527	35	280	23	35

XI	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	39	6	390	264	540	24	443	37	30	21	32	519
B	5	8	47	27	26	35	40	22	31	34	24	36
C	33	7	35	22	459	32	25	45	22	22	45	22
D	35	38	6	9	475	40	29	546	536	714	40	21
E	13	7	8	7	429	24	20	41	37	537	543	21
F	6	7	8	30	115	49	493	38	39	39	43	507
G	6	6	5	32	121	36	33	39	26	473	474	45
H	6	6	10	33	33	35	33	508	44	502	52	437

VI	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	32	21	32	32	76	62	44	25	318	29	36	16
B	35	28	44	35	70	35	36	22	20	466	43	322
C	5	56	21	36	32	21	33	23	36	423	474	430
D	6	571	24	70	43	33	34	247	97	209	38	47
E	7	31	276	524	36	426	44	5	37	388	47	26
F	7	39	33	35	25	399	29	67	37	21	20	43
G	5	39	31	27	26	67	40	40	32	21	461	25
H	6	30	133	798	64	40	468	22	32	18	33	5

XII	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	4	3	398	38	17	406	415	33	457	27	37	38
B	7	6	36	15	38	32	38	16	21	556	20	512
C	36	19	21	24	31	22	42	23	30	33	37	42
D	401	46	316	26	239	34	615	37	45	42	38	37
E	3	478	58	37	34	34	38	45	37	605	57	41
F	36	33	505	534	30	34	44	43	39	562		

Tabelle 8.5: Ergebnisse des Expressions-Assays mit der PyIRS Val 401NNK-Ile405NNK Bibliothek in Anwesenheit von Norb-Lysin.

I	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	164	367	18	65	39	221	141	42	520	68	443	25
B	329	25	45	459	51	133	54	48	46	42	39	2,497
C	375	20	31	55	56	445	114	46	42	35	499	104
D	441	40	26	41	643	502	529	448	55	510	528	113
E	234	41	21	530	36	341	33	181	532	260	110	36
F	430	51	49	424	277	68	466	30	524	38	541	3,021
G	47	321	40	371	349	441	72	48	35	81	578	439
H	40	21	38	393	486	21	47	62	458	37	608	476

VIII	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	132	530	182	41	70	50	159	41	51	401	53	25
B	308	322	13	36	24	39	97	172	37	40	58	2,450
C	33	36	37	39	41	76	253	102	752	574	23	112
D	34	150	61	86	550	504	40	847	498	593	37	100
E	163	443	33	600	29	490	537	731	14	43	224	44
F	50	78	519	31	256	500	535	44	319	37	30	2,934
G	179	38	506	510	267	34	545	38	431	38	44	338
H	31	583	614	551	487	73	583	28	553	41	491	525

II	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	35	278	33	39	71	331	44	44	37	415	50	81
B	40	41	38	39	435	590	42	25	25	37	477	320
C	39	40	108	20	24	414	579	409	45	308	74	474
D	34	24	59	19	348	523	114	38	70	45	171	55
E	509	38	377	37	25	104	480	62	43	29	92	458
F	146	513	404	423	40	106	417	405	491	37	40	59
G	396	52	56	445	128	43	39	48	481	44	467	385
H	387	100	461	70	44	41	55	43	46	44	252	70

IX	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	31	14	563	499	49	53	19	529	53	609	463	617
B	672	40	35	160	433	36	36	592	615	27	596	108
C	50	628	125	17	700	71	47	37	498	29	670	647
D	40	541	22	30	39	535	44	657	36	17	50	46
E	31	20	717	47	691	577	39	249	242	590	41	39
F	33	119	441	77	542	229	35	641	57	545	387	586
G	264	36	442	724	29	19	37	45	730	526	56	41
H	505	624	110	200	36	28	55	576	45	40	18	27

III	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	274	38	16	307	419	230	199	47	414	104	25	28
B	334	425	83	45	592	62	42	45	46	548	619	23
C	431	521	44	493	264	25	40	578	56	41	60	566
D	40	40	517	703	455	46	474	24	521	55	49	43
E	334	48	43	466	32	238	41	30	140	539	547	745
F	505	24	42	22	481	35	39	149	544	36	522	611
G	37	61	423	71	521	68	60	57	34	39	619	567
H	81	70	241	583	367	244	267	493	60	39	739	488

X	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	388	39	16	15	41	32	480	21	41	37	32	242
B	628	464	22	690	607	18	58	491	118	18	486	31
C	386	501	488	667	438	29	29	484	30	217	38	28
D	40	541	691	483	65	578	527	37	39	450	464	36
E	117	32	68	500	493	33	34	107	38	35	15	159
F	555	32	459	489	47	395	72	23	31	461	120	39
G	439	33	100	34	488	154	37	86	32	84	32	300
H	461	56	41	435	491	51	33	33	381	445	58	32

IV	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	243	202	40	34	123	332	330	541	21	381	44	23
B	110	37	209	23	40	83	335	31	456	448	257	25
C	140	41	36	467	27	390	148	40	480	37	88	57
D	36	37	438	53	48	89	52	26	42	552	451	400
E	52	63	407	38	50	33	444	44	475	445	459	50
F	510	50	388	59	46	59	115	94	436	46	531	407
G	236	229	470	88	466	282	453	55	37	39	336	45
H	97	33	106	497	51	414	46	221	39	42	54	73

XI	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	389	386	41	37	63	462	431	16	33	36	32	25
B	67	388	43	574	40	410	425	368	33	37	52	425
C	29	385	397	162	27	459	33	212	153	41	461	41
D	124	40	36	621	481	341	40	303	40	30	373	43
E	31	46	35	464	110	24	634	399	435	514	42	56
F	31	23	42	41	37	501	41	510	36	23	132	27
G	32	331	31	352	127	458	43	376	42	454	437	91
H	52	420	34	146	491	390	123	38	549	37	36	314

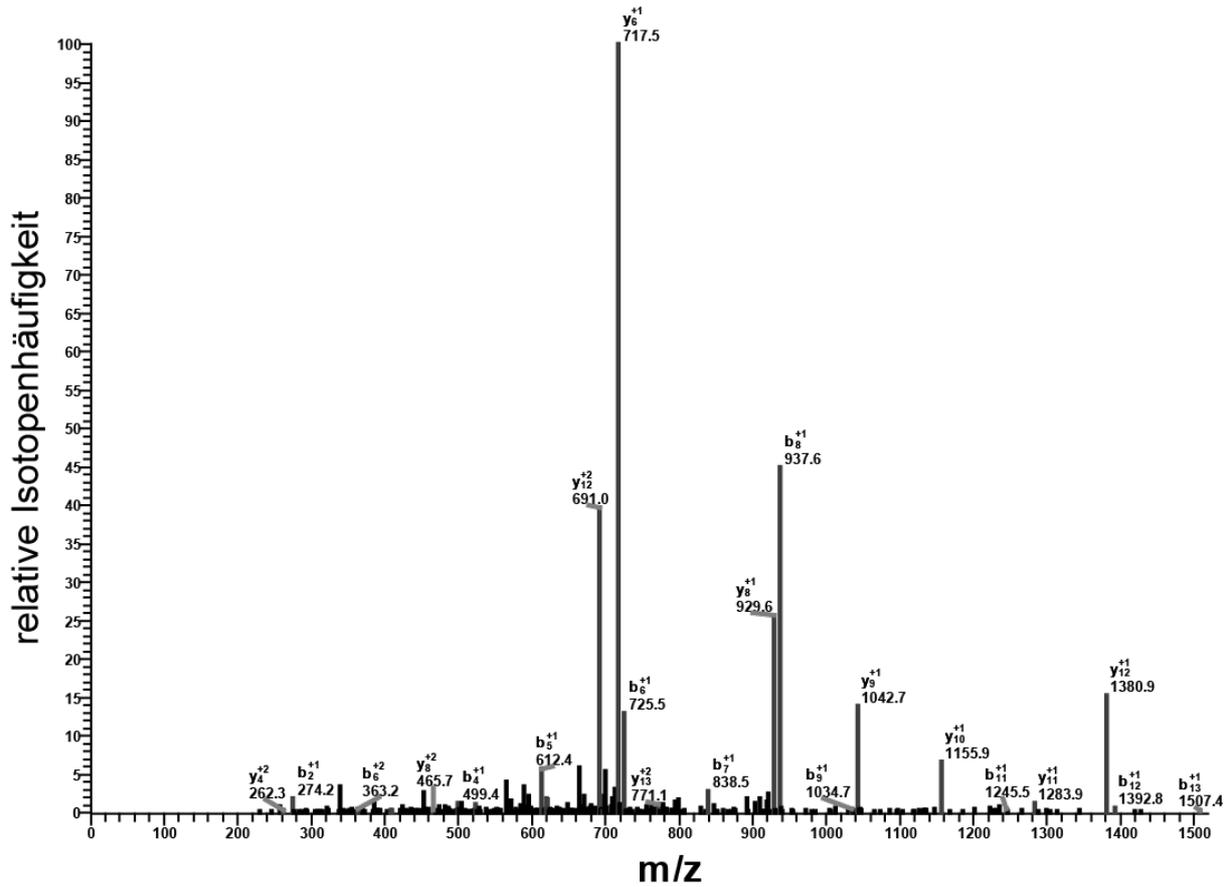
V	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	378	362	36	67	508	16	96	91	35	45	39	106
B	13	484	549	509	44	42	35	502	61	87	35	43
C	36	21	266	61	504	36	341	592	44	20	33	538
D	130	550	542	47	36	88	56	45	157	42	46	30
E	335	614	70	47	55	506	61	462	47	625	534	44
F	38	42	527	36	535	19	289	556	322	31	26	38
G	80	101	492	36	585	35	55	29	112	364	36	45
H	508	67	20	635	89	511	12	57	32	488	17	26

XII	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	479	13	23	470	84	110	583	448	45	26	433	97
B	18	88	39	38	25	33	619	636	374	563	39	454
C	18	257	36	458	102	585	469	592	41	40	42	113
D	37	51	84	533	32	45	33	550	46	45	125	42
E	631	20	29	445	415	84	37	539	41	52	574	41
F	590	618	186	44	81	387	562	594	401	318	540	391
G	40	55	14	605	60	54	123	29	290	33	391	115
H	330	464	567	43	161	76	150	37	40	556	333	32

VI	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	219	11	31	40	19	374	37	52	384	35	76	44
B	181	133	365	403	40	38	394	30	432	374	34	373
C	474	474	22	32	19	38	61	67	153	424	37	37
D	557	430	335	59	33	34	27	36	457	439	20	368
E	32	41	29	389	310	405	34	40	203	68	30	58
F	33	30	247	67	34	14	30	568	493	35	14	34
G	400	117	338	43	417	29	18	33	367	292	64	39
H	29	265	30	41	35	375	364	22	372	343	387	48

XIII	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	80	19	41	6	53	162	30	12	25	110	41	26
B	178	17	369	15	18	26	31	216	28	33	59	51
C	22	337	34	305	181	26	32	181	39	34	41	79
D	43	524	38	101	26	404	362	39	59	457	35	463
E	17	132	248	83	308	404	36	41	100	279	24	500
F	154	43	31	312	463	396	18	147	37	88	156	235
G	93	22	438	20	22	27	32	49	37	46	38	88
H	511	43	36	438	462	445	407	77	36	33	44	37

VII	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	43	31	32	23	37	468	37	38	41	160	280	46
B	411	357	51	63	42	35	44	478	449	38	127	193
C	30	27	489	232	115	419	353	25	41	458	53	42
D	35	34	40	422	291	93	494	542	46	371	503	35
E	29	347	441	32	540	404	16	49	29	474	466	44
F	34	470	454	240	48	36	17	591	33	42	437	40
G	38	54	392	40	139	469	71	37	35	450	29	51



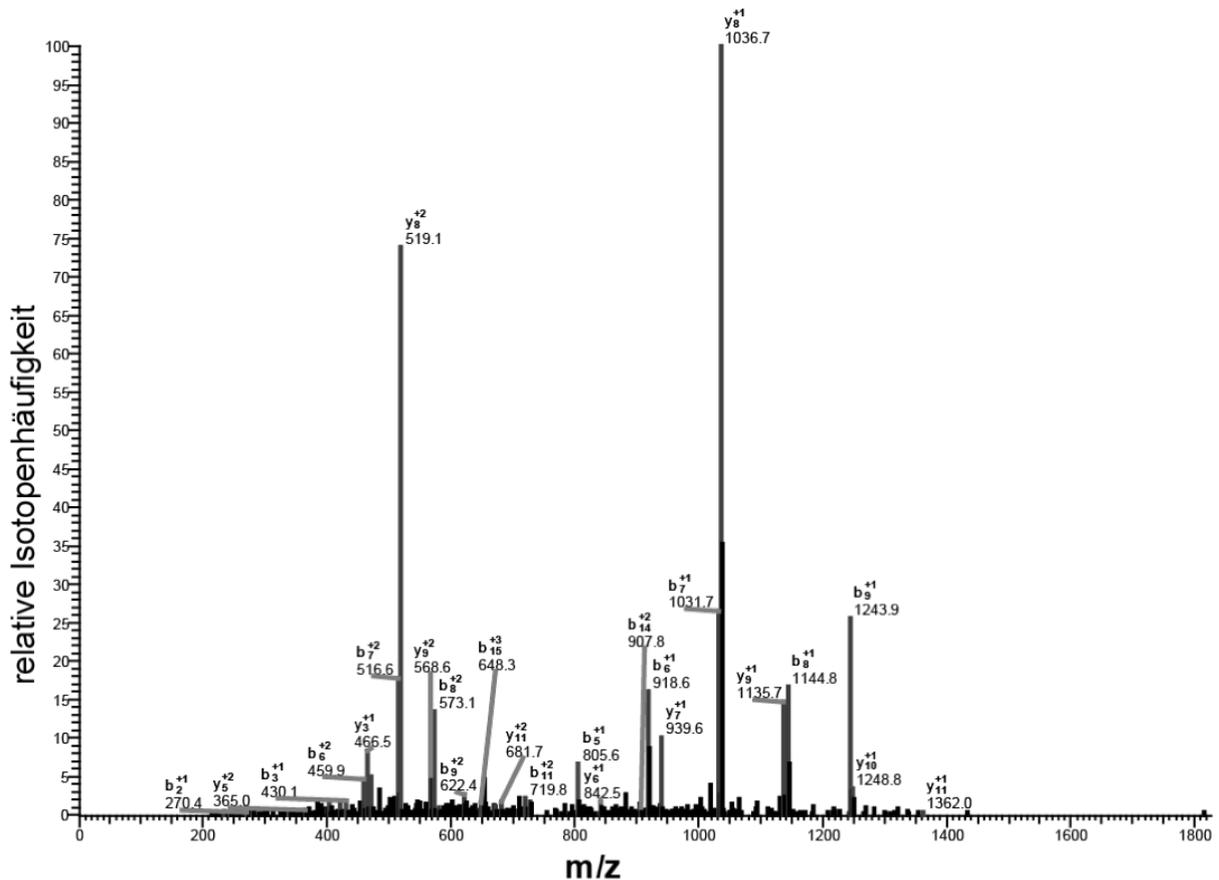
Ionen-Serie mit +1 Ladung

Aminosäure	B-Ionen	Y-Ionen
L	114.09	-
C [^]	274.12	1540.82
P	371.17	1380.79
Q	499.23	1283.74
L	612.32	1155.68
I	725.4	1042.59
I	838.49	929.51
V	937.55	816.43
P	1034.61	717.36
P	1131.66	620.3
N	1245.7	523.25
F	1392.77	409.21
D	1507.8	262.14
K	-	147.11

Ionen-Serie mit +2 Ladung

Aminosäure	B-Ionen	Y-Ionen
L	57.55	-
C [^]	137.56	770.91
P	186.09	690.9
Q	250.12	642.37
L	306.66	578.34
I	363.2	521.8
I	419.75	465.26
V	469.28	408.72
P	517.81	359.18
P	566.33	310.66
N	623.35	262.13
F	696.89	205.11
D	754.4	131.57
K	-	74.06

Abbildung 8.4: MS/MS Spektrum des Peptids LCPQLIIVPPNFDK. Dieses wurde durch tryptischen Verdau von *h*Polk generiert (Q wurde in *h*Polk_{Gln163Norb} durch Norb-Lysin substituiert). Die tabellarische Aufstellung der Ionen-Serien aus der B- und Y-Fragmentierung ist unten dargestellt.



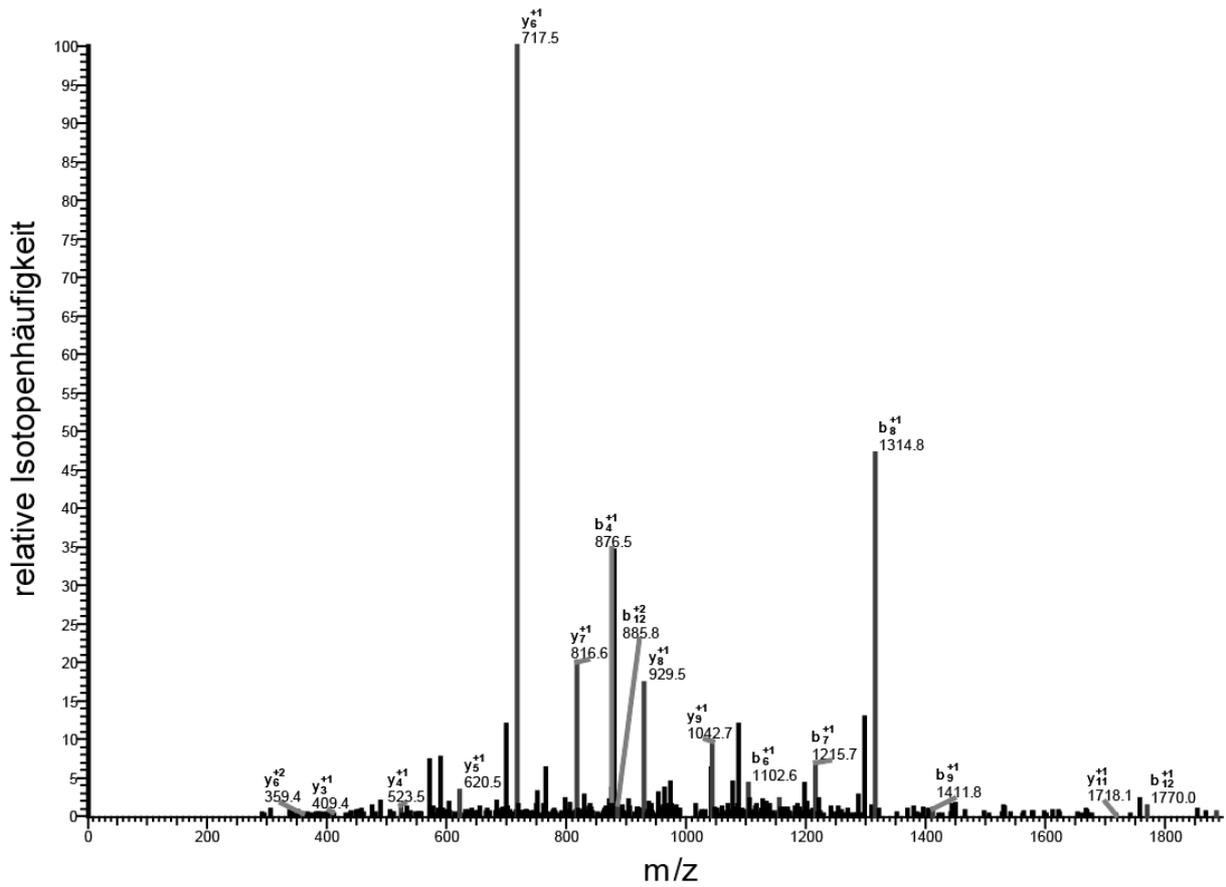
Ionen-Serie mit +1 Ladung

Aminosäure	B-Ionen	Y-Ionen
R	157.11	-
L	270.19	2123.17
C^	430.22	2010.09
P	527.28	1850.06
X	805.44	1753
L	918.52	1474.84
I	1031.61	1361.76
I	1144.69	1248.67
V	1243.76	1135.59
P	1340.81	1036.52
P	1437.87	939.47
N	1551.91	842.42
F	1698.98	728.37
D	1814	581.3
K	1942.1	466.28
Y	2105.16	338.18
R	-	175.12

Ionen-Serie mit +2-Ladung

Aminosäure	B-Ionen	Y-Ionen
R	79.06	-
L	135.6	1062.09
C^	215.62	1005.55
P	264.14	925.53
X	403.22	877.01
L	459.77	737.92
I	516.31	681.38
I	572.85	624.84
V	622.38	568.3
P	670.91	518.76
P	719.44	470.24
N	776.46	421.71
F	849.99	364.69
D	907.51	291.16
K	971.55	233.64
Y	1053.08	169.59
R	-	88.06

Abbildung 8.5: MS/MS Spektrum des Peptids LCPXLIIVPPNFDK. Dieses wurde durch tryptischen Verdau von *h*Polk_{Gln163Norb} generiert (X ist die Position von Norb-Lysin). Die tabellarische Aufstellung der Ionen-Serien aus der B- und Y-Fragmentierung ist unten dargestellt.



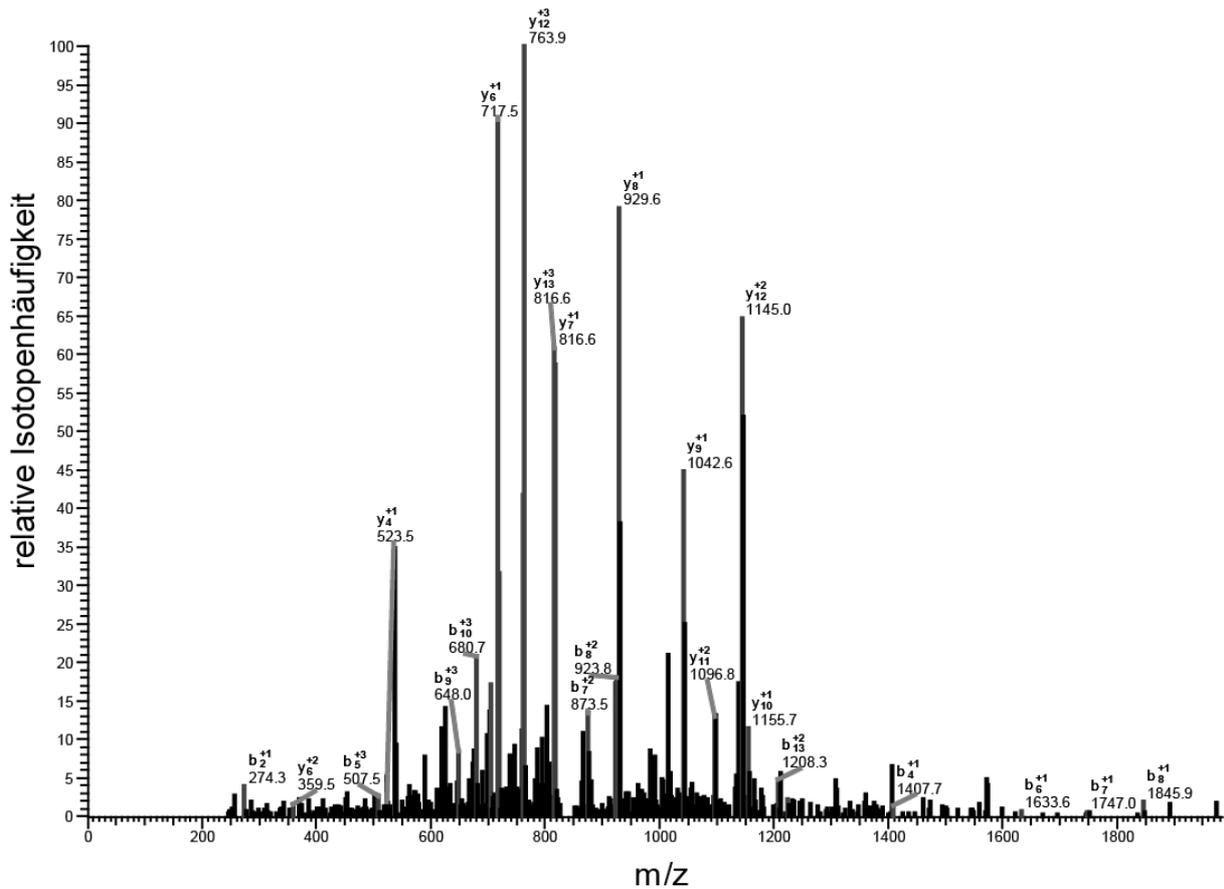
Ionen-Serie mit +1 Ladung

Aminosäure	B-Ionen	Y-Ionen
L	114.09	-
C [^]	217.1	1918.02
P	314.15	1815.01
X ¹⁴	876.43	1717.96
L	989.52	1155.68
I	1102.6	1042.59
I	1215.68	929.51
V	1314.75	816.43
P	1411.81	717.36
P	1508.86	620.3
N	1622.9	523.25
F	1769.97	409.21
D	1885	262.14
K	-	147.11

Ionen-Serie mit +2 Ladung

Aminosäure	B-Ionen	Y-Ionen
L	57.55	-
C [^]	109.05	959.51
P	157.58	908.01
X ¹⁴	438.72	859.48
L	495.26	578.34
I	551.8	521.8
I	608.35	465.26
V	657.88	408.72
P	706.41	359.18
P	754.93	310.66
N	811.95	262.13
F	885.49	205.11
D	943	131.57
K	-	74.06

Abbildung 8.6: MS/MS Spektrum des Peptids LCPX¹⁴LIIVPPNFDK. Dieses wurde durch tryptischen Verdau von hPolk_{Gln163Norb} generiert (X¹⁴ ist die Position des Photoclick-modifizierten Norb-Lysins mit 14). Die tabellarische Aufstellung der Ionen-Serien aus der B- und Y-Fragmentierung ist unten dargestellt.



Ionen-Serie mit +1 Ladung

Aminosäure	B-Ionen	Y-Ionen
L	114.09	-
C [^]	274.12	2449.24
P	371.17	2289.21
X ¹⁵	1407.66	2192.16
L	1520.74	1155.68
I	1633.83	1042.59
I	1746.91	929.51
V	1845.98	816.43
P	1943.03	717.36
P	2040.08	620.3
N	2154.13	523.25
F	2301.2	409.21
D	2416.22	262.14
K	-	147.11

Ionen-Serie mit +2 Ladung

Aminosäure	B-Ionen	Y-Ionen
L	57.55	-
C [^]	137.56	1225.13
P	186.09	1145.11
X ¹⁵	704.33	1096.58
L	760.88	578.34
I	817.42	521.8
I	873.96	465.26
V	923.49	408.72
P	972.02	359.18
P	1020.55	310.66
N	1077.57	262.13
F	1151.1	205.11
D	1208.62	131.57
K	-	74.06

Abbildung 8.7: MS/MS Spektrum des Peptids LCPX¹⁵LIIVPPNFDK. Dieses wurde durch tryptischen Verdau von hPolk_{Gln163Norb} generiert (X¹⁵ ist die Position des Diels-Alder-modifizierten Norb-Lysins mit ¹⁵). Die tabellarische Aufstellung der Ionen-Serien aus der B- und Y-Fragmentierung ist unten dargestellt.

Lebenslauf

SCHULAUSBILDUNG

- 09/1990 - 07/1994 Lotteschule, Wetzlar (Grundschule)
09/1995 - 07/2000 Kestner-Schule Wetzlar (Gesamtschule)
09/2000 - 07/2003 Goetheschule Wetzlar (Oberstufengymnasium)
- Abitur

STUDIUM

- 10/2003 - 11/2007 Studium der Biotechnologie an der Fachhochschule Gießen-Friedberg
08/2006 - 01/2007 Praxissemester im Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie, Marburg
04/2007 - 11/2007 Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Thomas Carell an der Ludwig-Maximilians-Universität München
Thema: „Expression, Isolierung und Charakterisierung einer (6-4) Photolyase aus *Ostreococcus tauri*“
11/2007 Fachhochschul-Abschluss: Dipl.-Ing. für Biotechnologie

PROMOTION

- Seit 01/2008 Promotionsstudium in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. T. Carell an der Ludwig-Maximilians-Universität München

München, 24.11.2011