

# Charakterisierung und Anwendung von PAL, eines blaulichtabhängig RNA-bindenden Proteins

Dissertation zur Erlangung eines Doktorgrades (Dr. rer. nat.)  
an der Fakultät für Biologie, Chemie und Geowissenschaften  
der Universität Bayreuth

vorgelegt von  
**Jennifer Kaiser, M.Sc.**  
aus  
Mannheim

Lehrstuhl für Biochemie II  
Universität Bayreuth  
2020

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von 4/2016 bis 4/2020 in Bayreuth am Lehrstuhl Biochemie II unter Betreuung von Herrn Professor Dr. Andreas Möglich angefertigt.

*Vollständiger Ausdruck der von der Fakultät für Biologie, Chemie und Geowissenschaften der Universität Bayreuth genehmigten Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades einer Doktorin der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)*

Dissertation eingereicht am: 13.05.2020

Zulassung durch die Promotionskommission: 20.05.2020

Wissenschaftliches Kolloquium: 15.10.2020

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Matthias Breuning

Prüfungsausschuss:

Prof. Dr. Andreas Möglich	(Gutachter)
Prof. Dr. Birgitta Wöhrl	(Gutachterin)
Prof. Dr. Frank Hahn	(Vorsitz)
Prof. Dr. Matthias Weiss	

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die so maßgeblich zum Verfassen dieser Arbeit beigetragen haben. An erster Stelle bei Andreas, der mir ermöglicht hat, an diesem spannenden Projekt mitzuarbeiten. Durch seine hervorragende Betreuung konnte ich meinen Horizont nicht nur fachlich erweitern, sondern habe auch viel über Projektorganisation und Präsentation von Daten und Ergebnissen gelernt.

Mein besonderer Dank gilt auch unseren Kooperationspartnern in Bonn unter der Leitung von Professor Günter Mayer. Der rege Austausch und die kritischen Diskussionen haben das Projekt stark bereichert. Vielen Dank an Anna, Sebastian und Christian, mit denen zusammen ich jede abenteuerliche Idee vor Umsetzung zuerst auf Herz und Nieren prüfen konnte. In diesem Zusammenhang ist auch das DFG-Schwerpunktprogramm 1926 zu nennen, an dem ich mitarbeiten durfte, und deren Mitglieder neue Anregungen für unser Projekt gaben.

Auch meinen direkten Kollegen gehört großer Dank ausgesprochen – Julia, Renate, Robert und David – abgesehen davon dass die Laborarbeit mit euch auch bei stets wandelnden Lichtverhältnissen sehr angenehm war, habt ihr durch eure fachliche Kompetenz und technische Unterstützung viel zur Frustrationsvermeidung im Verlauf meiner Arbeit beigetragen. Auch beim Rest des Biochemie-Lehrstuhls möchte ich mich für die angenehme Atmosphäre und die Unterstützung bedanken. Vielen Dank auch an meine Studenten Lisa, Marc und Paul – eure Arbeit hat dieses Projekt bereichert und immer vorangebracht.

Ein großer Dank auch an meinen Ehemann Patrick, der mich nicht nur moralisch unterstützt hat, sondern auch jeden meiner Vorträge geduldig angehört und verbessert hat. Vielen Dank auch meinen Eltern und meiner Schwester, die mich seit meiner Kindheit unterstützt und gefördert haben. Seit ich 13 war habe ich euch erzählt, dass ich ‚Wissenschaftlerin‘ werde – jetzt habe ich es geschafft

# Inhaltsverzeichnis

Abstract .....	I
Zusammenfassung .....	III
1. Einleitung .....	1
1.1 Grundlagen der Optogenetik .....	1
1.2 Aufbau und Anwendung von Photorezeptoren .....	2
1.3 Light-Oxygen-Voltage Photosensormodule .....	4
1.4 Motivation der lichtabhängigen Kontrolle von RNA .....	6
1.5 PAL Protein zur lichtabhängigen RNA-Bindung .....	7
1.6 Wissensstand zu Beginn der Arbeit .....	9
2. Material und Methoden .....	13
2.1 Chemikalienliste .....	13
2.2 Verwendete Bakterienstämme .....	16
2.3 Liste verwendeter Feinchemikalien, Enzyme und Proteine .....	17
2.4 Verwendete vorgefertigte Kits .....	18
2.5 Verwendete Säulen für die Proteinreinigung und Analytik .....	19
2.6 Verwendete Computer-Programme .....	19
2.7 Methoden .....	20
2.7.1 Agarosegelelektrophorese .....	20
2.7.2. Polymerasekettenreaktion .....	20
2.7.3 Restriktionsklonierung .....	23
2.7.4 Transformation von kompetenten <i>E. coli</i> .....	25
2.7.5 Plasmidpräparation für die Sequenzierung .....	25
2.7.6. Vorbereitung von Kryostocks .....	26
2.7.7 Proteinexpression .....	26
2.7.8 Proteinreinigung .....	26
2.7.9 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese .....	27
2.7.10 UV-Vis Spektroskopie .....	29
2.7.11 <i>Circular Dichroismus</i> .....	30
2.7.12 Fluoreszenzspektren .....	31
2.7.13 Synthese von Polyaptamer RNAs .....	31
2.7.14 Fluoreszenzanisotropie .....	31
2.7.15 Elektronenspinresonanz-Spektroskopie .....	32
2.7.16 Gelfiltrationsanalyse .....	33
2.7.17 Gelfiltration mit Vielwinkel-Lichtstreuung .....	33

2.7.18	Fluoreszenzkreuzkorrelationsspektroskopie (FCCS) .....	34
2.7.19	Bakterieller Reporterassay für die Aktivität von PAL – 2 Plasmidsystem .....	35
2.7.20	Bakterieller Reporterassay für die Aktivität von PAL – 1 Plasmidsystem .....	36
2.7.21	Western Blot zur Expressionsanalyse .....	36
2.7.22	qRT-PCR zur Assay-Analyse.....	37
3.	Ergebnisse .....	40
3.1	Analyse der Interaktion zwischen PAL und den selektierten Aptameren.....	40
3.2	Etablierung eines bakteriellen Reportersystems und Struktur-Funktionsanalyse von PAL .....	45
3.3	Einfluss von Glutamin 347 auf die Signaltransduktion der LOV-Domäne .....	58
3.4	Entdeckung und Analyse von PAL-Homologen .....	62
3.5	Einsatz des optimierten Reporterassays zur Analyse von Aptamervarianten .....	67
3.6	PAL als Instrument für lichtabhängige Phasenseparation.....	72
4.	Diskussion und Ausblick.....	83
4.1	Natürliche Funktion von PAL und PAL-Homologen .....	83
4.2	PAL im Vergleich zu weiteren RNA-basierten Schaltern .....	86
4.3	Temperatur und pH-Abhängigkeit der PAL-Aptamer Interaktion.....	88
4.4	Erkenntnisse der Struktur- und Funktionsanalyse des PAL-Proteins .....	89
4.5	PAL als Werkzeug für die flüssig-flüssig Phasenseparation.....	96
4.6	Zusammenfassung und Ausblick .....	98
5.	Literaturverzeichnis.....	101
6.	Abkürzungsverzeichnis .....	107
7.	Abbildungsverzeichnis .....	109
8.	Tabellenverzeichnis.....	110
9.	(Eidesstattliche) Erklärungen und Versicherungen.....	xxiv
10.	Anhang .....	i
10.1	Plasmidkarten .....	i
10.2	Protein-Reinigungs-Gele .....	xix
10.3	Western Blots zum Expressionsnachweis .....	xxiii

## Abstract

The application of photoreceptors, i.e. proteins regulated in their activity by illumination with light, has led to many advances in the applied and basic research, allowing precise spatiotemporal control of localization, activity and degradation of cellular components. The novel light-activated RNA binding protein PAL isolated from *Nakamurella multipartita* now allows for direct control of RNA-species via illumination with blue light.

In this work the interaction of PAL with two SELEX-derived RNA-aptamer targets was evaluated with *in vitro* fluorescence anisotropy experiments, showing affinities in the light of 12 nM and 17 nM respectively and more than 100-fold lower affinity in the dark. The interaction kinetics were investigated, showing differences in the interaction mode caused by varied selection criteria during the SELEX-process. By varying the stringency of selection conditions, two aptamers with distinct dissociation rate constants were obtained.

The PAL protein was transferred to an *E. coli* based reporter system realized in the course of this work, allowing 10-fold repression of reportergene expression as a result of blue-light dependent RNA-binding. This system represents the first use of PAL as a recombinant photoreceptor for optogenetic applications and was utilized for an extensive structure-function study. For this purpose, domain- and subdomain deletions as well as point mutations were introduced into PAL and the activity of the protein evaluated by the fluorescence of the reporter protein. A PAL mutant lacking a conserved Cystein, resulting in the formation of a stable radical on the chromophore upon illumination, was utilized to conduct EPR-measurements to probe the dynamics of PAL during light adaptation. The mutation study together with the conducted EPR-measurements allowed for the proposition of a mechanistic model for signal-transduction and RNA-binding in the PAL-protein.

A PAL protein variant missing a conserved glutamine was found to confer wild typical activity. Analysis with the anisotropy assay developed in this work proved intact RNA interaction with a reduced affinity and strong dependence on buffer conditions. This finding spurred further research on the light reception of LOV-like photoreceptors.

Optimization of the developed reporter system made it an efficient platform for screening novel aptamer variants binding to two novel PAL-homologes that were discovered in a related *Nakamurella*-strain and also characterized *in vitro*. The homologes showed a canonical photocycle but did not bind to the previously discovered aptamer-sequences.

An *in-vitro* system based on an EYFP PAL-fusion protein in combination with an EYFP-nano-body and polyvalent aptamers was designed and characterized to investigate light activated liquid-liquid-phase separation. In initial experiments, formation of nucleation particles but no macroscopic phase separation events could be observed with fluorescence-cross-correlation spectroscopy.

## Zusammenfassung

Die Anwendung von Photorezeptoren, also durch Licht verschiedener Wellenlängen regulierbare Proteine, für die räumliche und zeitliche Kontrolle der Proteinaktivität -Lokalisierung und -Stabilität hat zu vielseitigen Fortschritten in der Grundlagenforschung und den angewandten Wissenschaften geführt. Das aus *Nakamurella multipartita* isolierte, neuartige, lichtabhängig RNA-bindende Protein PAL erlaubt nun auch die direkte Kontrolle zellulärer RNA-Spezies durch Beleuchtung mit blauem Licht.

In dieser Arbeit wurde die Interaktion von PAL mit zwei durch ein SELEX-Verfahren identifizierte Aptamer-Zielsequenzen *in vitro* durch Fluoreszenzanisotropie Messungen evaluiert und es wurden hohe Affinitäten mit  $K_D$ -Werten von 12 nM und 17 nM im Licht im Vergleich zu einer ungefähr 100-fach geringeren Affinität im Dunkeln festgestellt. Eine Untersuchung der Interaktionskinetiken zeigte den Einfluss der Selektionskriterien des SELEX-Prozess auf die Eigenschaften der Aptamere auf. Es wurden durch Variation der Selektionsbedingungen Aptamere mit unterschiedlichen Dissoziationsraten erhalten

Das PAL-Protein wurde in einem *E. coli* basierten Reportersystem eingesetzt, das im Verlauf dieser Arbeit entwickelt wurde und das eine 10-fache Repression eines Reportergens durch blaulichabhängige RNA-Bindung ermöglicht. Dieses System stellt den ersten rekombinanten Einsatz des PAL-Proteins für eine optogenetische Anwendung dar und wurde verwendet, um eine umfangreiche Struktur-Funktionsanalyse durchzuführen. Zu diesem Zweck wurden sowohl Domänen- und Subdomänendeletionen als auch Punktmutationen in das Protein eingebracht. Die resultierende Proteinaktivität wurde anhand der Fluoreszenz des Reporterproteins ausgewertet. An einer Mutante, die ohne ein konserviertes Cystein im lichtadaptierten Zustand ein stabiles Radikal bildet, wurden EPR-Experimente zur Einschätzung der Dynamik des Proteins bei der Lichtantwort durchgeführt. Die Ergebnisse der Mutationsstudie im Zusammenhang mit den EPR-Messungen erlaubten einen ersten Entwurf des Mechanismus der RNA-Bindung und Signalweiterleitung von PAL.

Eine Punktmutante von PAL, die ohne ein konserviertes Glutamin wildtypische Aktivität aufwies, wurde identifiziert. Die Variante zeigte vorhandene Signaltransduktion und RNA-Bindung, wenn auch mit geringerer Affinität. Diese Feststellung führte zu weiteren Untersuchungen des Mechanismus der Lichtrezeption in LOV-artigen Photorezeptoren.

Die Optimierung des entwickelten Reportersystems erlaubte das effiziente *Screening* von neuen Aptamer-Varianten, um nach Bindesequenzen für zwei im Verlauf der Arbeit identifizierte PAL-Homologe aus einem verwandten *Nakamurella*-Stamm zu suchen.



Diese PAL-Varianten zeigten in *in-vitro* Untersuchungen ebenfalls typische LOV-Photochemie, interagierten jedoch nicht mit den zuvor identifizierten Aptameren.

Zur Untersuchung von lichtaktivierter flüssig-flüssig-Phasenseparation wurde ein *in-vitro*-System basierend auf einem EYFP PAL-Fusionsprotein in Kombination mit einem EYFP-*nano-body* und polyvalenten RNA-Aptameren entworfen und charakterisiert. In ersten Experimenten konnte mittels Fluoreszenz Kreuzkorrelationsspektroskopie die lichtabhängige Bildung von Nukleationskeimen, nicht aber die makroskopische Phasenseparation des Systems beobachtet werden.

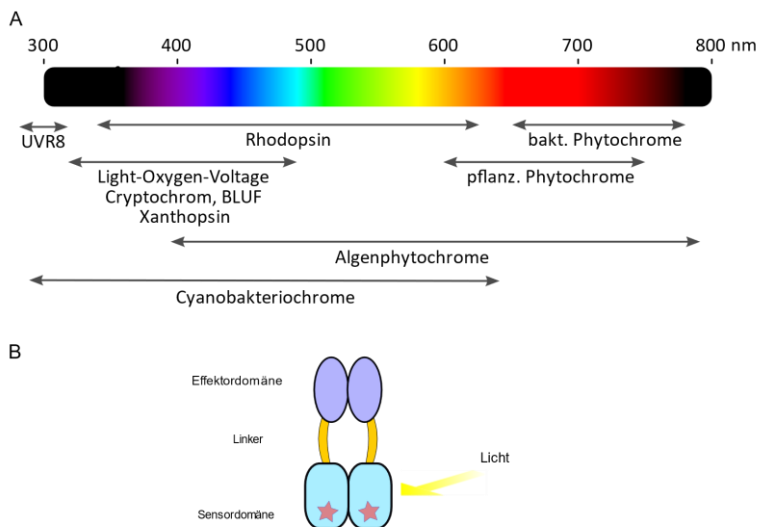
# 1. Einleitung

## 1.1 Grundlagen der Optogenetik

Eines der wichtigsten Signale in der Umwelt ist die elektromagnetische Strahlung. Es ist daher nicht überraschend, dass Organismen in allen Reichen des Lebens vielfältige Möglichkeiten entwickelt haben, diese als Information wahrzunehmen und zu verarbeiten. Vor allem Wellenlängen zwischen 300 und 800 nm eignen sich um biochemische Reaktionen auszulösen. Dies hängt mit dem Energiegehalt der Strahlung zusammen, der in diesem Bereich die Bildung angeregter Elektronenzustände auslöst, die zur Ausbildung kovalenter Bindungen genutzt werden können. Kurzwelligere Strahlung mit höherem Energiegehalt führt zur Ionisierung der bestrahlten Moleküle, längerwellige Strahlung (z.B. Mikrowellenstrahlung), regt die Vibrationszustände der Moleküle an (1).

Eine Vielzahl von biochemischen Reaktionen und Adaptionen sind daher von der das sichtbare Spektrum ausmachenden Strahlung abhängig, ergänzt um die UV-Strahlung. Dabei stellen die menschliche Sehsinneszellen mit ihren Retinal-Chromophoren und den assoziierten Rhodopsinen nur eine Möglichkeit dar, die Strahlungsinformationen zu verarbeiten (2). Schon frühzeitig wurden die Kanalrhodopsine als lichtabhängige Ionenkanäle identifiziert, die als Antwort auf Illumination mit grünem Licht Protonen leiten (3). Diese erlauben die lichtabhängige Manipulation der Membranpolarisation verschiedenster Zellen. Die aus dieser Entdeckung abgeleiteten Anwendungen in der Neurobiologie zur Aktivierung und Deaktivierung von Neuronen sowie der synaptischen Signalweiterleitung (4; 5), stellen die ersten Anwendungen im Bereich der Optogenetik dar (6). Optogenetik bezeichnet im Allgemeinen die zeitliche und räumliche Kontrolle definierter Prozesse in komplexen biologischen Systemen (7). Sie stellt einen großen Vorteil gegenüber klassischen Methoden der Zellmanipulation dar, die meist auf der Zugabe von Chemikalien zu den beobachteten Systemen beruhen. Zum einen können die zugegebenen Substanzen für Zellen toxisch sein und von verschiedenen Zelltypen unterschiedlich metabolisiert werden, was zu einer schlechten Vergleichbarkeit und verringerten Aussagekraft der Ergebnisse führt. Zum anderen ist keine räumliche Kontrolle, wie eine Beschränkung der Effekte auf nur eine subzelluläre Organelle, oder zeitliche Kontrolle, wie die Beschränkung auf bestimmte Zellzyklusabschnitte, möglich. Diese Einschränkungen kann die Optogenetik mit ihrer präzisen räumlichen und zeitlichen Auflösung überwinden. Für ihren Einsatz werden inzwischen nicht nur lichtabhängige Ionenkanäle, sondern auch andere Klassen der sogenannten Photorezeptoren verwendet.

Photorezeptoren reagieren entweder über kleine organischen Molekülen wie Flavinen, Billinen und Retinalen, oder direkt mittels den Aminosäure-Seitenketten auf Licht verschiedenster Wellenlängen (8). Die Lichtrezeption wird in allen Fällen durch die konjugierten  $\pi$ -Elektronensysteme der Chromophore vermittelt. Auch chemisch eng verwandte Chromophore können dabei mitunter unterschiedliche Spektralbereiche absorbieren, da das Absorptionsverhalten durch die Proteinumgebung und die mit dem Chromophor interagierenden Reste moduliert wird (9). Daher ist eine Einteilung anhand der Chromophore und der ausgelösten Photochemie in bis zu zehn verschiedene Klassen möglich (Abbildung 1). Eine zusätzliche Unterscheidung anhand der Lichtschaltbarkeit ist für die Anwendung sinnvoll. Während Blaulicht- und UVR8-Rezeptoren nach Erreichen des lichtadaptierten Zustands thermisch in den dunkeladaptierten Zustand relaxieren, sind Phytochrome und einige Rhodopsine photochromisch, können also durch Bestrahlung mit zwei spezifischen Wellenlängen hin- und hergeschaltet werden (8).



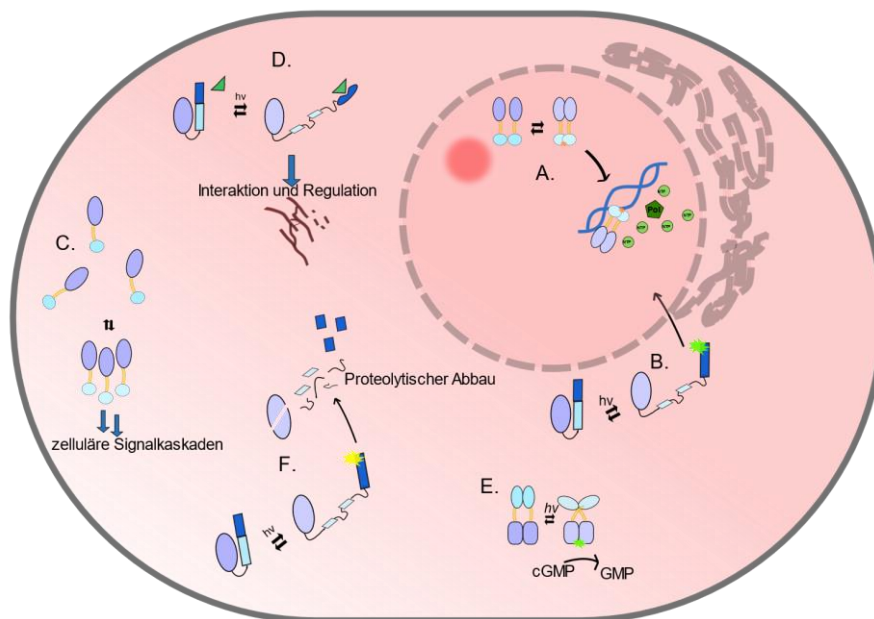
**Abbildung 1 Übersicht über natürlich vorkommende Photorezeptoren:** A) zeigt die Absorptionsbereiche bekannter natürlicher Photorezeptorhauptklassen (Einteilung nach Chromophoren und Photochemie). B) verdeutlicht den modularen Aufbau der meisten Photorezeptoren mit einer chromophorhaltigen, lichtrezeptiven Sensordomäne und einer die Lichtreaktion im zellulären System vermittelnden Effektor-domäne (Angepasst aus (8)).

## 1.2 Aufbau und Anwendung von Photorezeptoren

Grundsätzlich sind Photorezeptoren modular aus einem Sensormodul, die den Chromophor enthält und lichtabhängig strukturelle Änderung erfährt, und einem oder mehreren Effektormodulen, die in den Zellen zu einer biologischen Reaktion führen, aufgebaut. Die vorkommenden Effektormodule sind sehr divers. Viele Sensormodule sind mit Histidinkinasen gekoppelt, aber die sogenannten Phytochrome vermitteln auch Protein-Protein-Interaktion (10).

Mit den Aureochromen ist auch eine Klasse lichtabhängiger Transkriptionsfaktoren bekannt, es werden Protein-DNA Interaktion reguliert (11) und gleichzeitig die subzelluläre Lokalisation lichtabhängig verändert (10).

Es werden nicht nur natürliche Photorezeptoren, sondern auch für Anwendungen spezifisch entworfene, synthetische Photorezeptoren (12; 13) eingesetzt. Diese sind von natürlichen Proteinen abgeleitet, werden genetisch kodiert und rekombinant im entsprechenden System exprimiert. Ein Beispiel hierfür ist der synthetische Photorezeptor YF1, in dem die sauerstoffsensitive PAS-Domäne der Histidinkinase FixL (*Bradyrhizobium japonicum*) durch eine blaulichtsensitive Photorezeptordomäne aus YtvA (*Bacillus subtilis*) ersetzt wurde. In diesem Fall kann die Aktivität der Kinase durch Blaulichtbestrahlung stark reduziert werden. Beim Design neuartiger optogenetischer Werkzeuge kann der erwähnte modulare Aufbau der Rezeptoren ausgenutzt werden. Im Prinzip können durch Neukombination von Sensor- und Effektdomänen sehr viele, auf spezifische Licht- und Systembedingungen angepasste Photorezeptoren erstellt werden. Eine Übersicht über einige der bisher durch natürliche und synthetische Photorezeptoren beeinflussten zellulären Prozesse zeigt Abbildung 2.



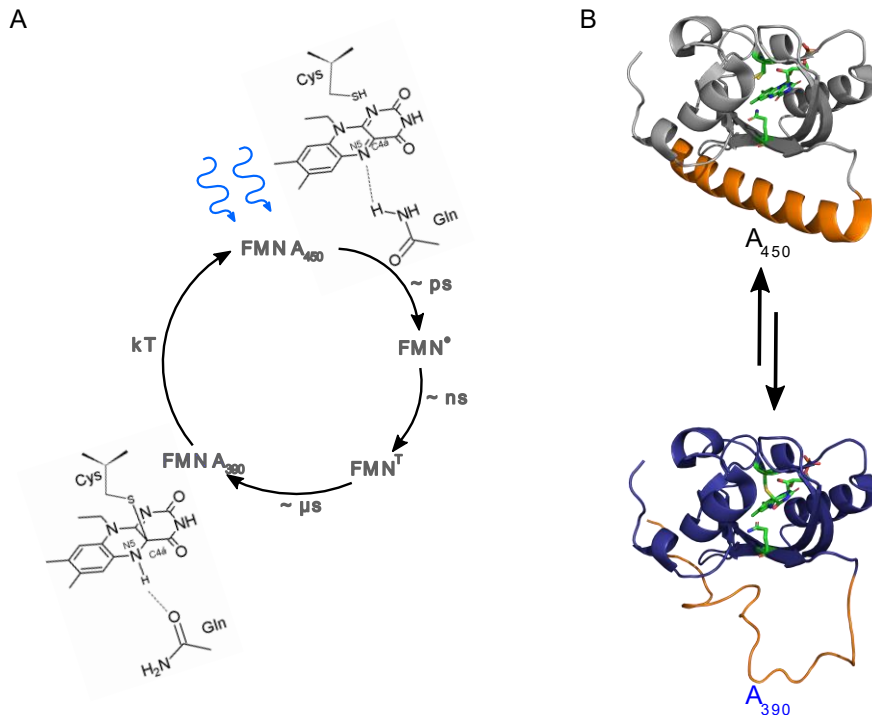
**Abbildung 2 Regulation zellulärer Prozesse durch Photorezeptoren:** A) Die lichtabhängige Assoziation von Photorezeptoren wird auf Fusionsproteine übertragen und bildet z.B. aktive Transkriptionsfaktoren (14) zur Expressionskontrolle. B) Durch die lichtabhängige Entfaltung einzelner Domänen werden nukleare Import- oder Exportsignale demaskiert um die Lokalisation von Proteinen zu beeinflussen (15). C) Das Ausbilden von lichtabhängigen Clustern erlaubt die Kontrolle einer Vielzahl zellulärer Signalkaskaden (16). D) Durch lichtabhängige Entfaltung können Interaktionen zwischen Proteindomänen kontrolliert werden, was zum Beispiel Einfluss auf die Dynamik des Cytoskeletts erlaubt (17). E) Die optogenetische Kontrolle von Phosphodiesterasen und Nukleotidkinasen ermöglichen die Beeinflussung der second messenger Konzentrationen in der Zelle (18). F) Durch lichtabhängige Entfaltung kann der proteolytische Abbau von Proteinen kontrolliert werden (19). Abbildung angepasst und erweitert nach (20).

Das Design neuartiger Photorezeptoren wird dadurch erleichtert, dass die Photorezeptordomänen in den meisten Fällen strukturell deutlich von den Effektordomänen abgetrennt sind. Dadurch können die funktionalen Einheiten der Photorezeptoren, also Sensor- und Effektmotiv voneinander getrennt und neu kombiniert werden. Allerdings ist vor allem das Design der *Linker* zwischen Sensor- und Effektordomäne eine Herausforderung, da dieser sowohl auf das eingehende Signal als auch auf die zu verbindenden Domänen abgestimmt sein muss. Das Bestimmen der Kristallstruktur der Domänen kann die Neukombination stark vereinfachen. Durch das Einführen von Punktmutationen können die Photochemie und die Signaltransduktion der Rezeptoren weiter optimiert werden.

### 1.3 Light-Oxygen-Voltage Photosensormodule

Der in dieser Arbeit behandelte Photorezeptor gehört zur Familie der *Light-Oxygen-Voltage* (LOV)-Rezeptoren, die durch den Einbau eines Flavinmononukleotids als Blaulicht-Sensor fungieren. Sie gehören zur Superfamilie der Per-ARNT-Sim (PAS)-Domänen, die sich durch ein konserviertes fünfsträngiges, zentrales, antiparalleles  $\beta$ -Faltblatt auszeichnen (21). Zwischen dieses Faltblatt und zwei  $\alpha$ -Helices ist in LOV-Domänen der Flavin-Cofaktor eingebettet, der die Lichtrezeption ermöglicht. Die Lichtabsorption führt zur Ausbildung eines angeregten Singulett-Zustands, der innerhalb von Picosekunden durch *Inter-System-Crossing* in einen Triplet-Zustand übergeht. Von diesem Triplet Zustand aus kann eine kovalente Bindung mit einem konservierten Cystein des Proteingerüsts gebildet werden, die zu einem metastabilen Signalzustand führt (Abbildung 3). Gleichzeitig ändert sich der Protonierungszustand des N5-Atoms des Flavins, was als auslösend für nachgelagerte strukturelle Veränderungen der LOV-Domäne gilt (22; 23).

Die Ausbildung der kovalenten Bindung ist dagegen nicht essenziell für die Signalwirkung der Domäne, da die Aktivierung lichtabhängiger Prozesse auch nach Mutation des Cysteins erhalten bleibt. In diesem Fall ist der Signalzustand der Chromophors ein stabiles Radikal, das hauptsächlich am C4 $\alpha$ -Atom lokalisiert (24). Der Signalzustand relaxiert thermisch zurück in den dunkeladaptierten Zustand, was abhängig von der Umgebung des Chromophors Sekunden bis Tage dauern kann (25). Die initialen strukturellen Änderungen in der LOV-Domäne nach Beleuchtung sind nicht abschließend charakterisiert. Die Rotation eines konservierten Glutamins um 180 ° aufgrund der Protonierung des N5 Atoms des Chromophors wird aber als zentral angesehen. Diese Strukturänderung wird an die terminalen Helices der Domäne weitergegeben, die durch Bewegung oder partielle Entfaltung reagieren. Auf diese Weise kann das Signal an gekoppelte Effektoren weitergeleitet werden (26).



**Abbildung 3 Photoreaktion und Struktur der LOV-Photorezeptordomäne AsLOV2:** Der Photozyklus des Flavinchromophors der LOV-Domänen als Reaktion auf Blaulichtbestrahlung (A). Die Proteinstruktur der LOV-Domäne AsLOV2 im Dunkeln (oben) und im Licht (unten) als Reaktion auf die lichtbedingten Änderungen am Chromophor (B). Vermutlich führt das Ausbilden einer kovalenten Bindung zum Flavinmononukleotid und die Konformationsänderung eines konservierten Glutamins zu einer Entfaltung der J $\alpha$ -Helix und A' $\alpha$ -Helix (PDBID: 2V1A und 2V1B).

Dabei ist vor allem die J $\alpha$ -Helix in der Signaltransduktion impliziert (Abbildung 3). Durch LOV-Photorezeption wurden in der Vergangenheit unter anderem Histidinkinasen (12) und Protein-DNA-Interaktion (27) beeinflusst. Vor allem die LOV-Domäne LOV2 aus Hafer (*Avena Sativa*), die lichtabhängig eine partielle Entfaltung aufweist, wurde in der synthetischen Biologie in verschiedenen Strategien verwendet. Während sie im natürlichen System die Kinaseaktivität von Phototropin 1 reguliert (28), können durch die Entfaltung der J $\alpha$ -Helix auch subzelluläre Lokalisation, Proteindegradation und CRISPRCas9 Aktivität einer Lichtregulation zugänglich gemacht werden (15; 29; 30). Dabei wird die lichtabhängige partielle Entfaltung genutzt, um Lokalisationssignale und Degrons im Dunkeln zu maskieren, oder aber die Struktur assoziierter Proteine wird durch die Entfaltung der J $\alpha$ -Helix gestört und diese so in ihrer Aktivität reguliert (15; 30)

### 1.4 Motivation der lichtabhängigen Kontrolle von RNA

Eine zelluläre Komponente, die bisher nicht direkt durch Licht beeinflussbar war, ist die RNA. Eine direkte optogenetische Kontrolle verschiedenen RNA-Spezies wäre aber wünschenswert. Gerade beim Einsatz von Photorezeptoren zur Expressionskontrolle ist die eigentlich schnelle Lichtadaptation in ihrer temporalen Auflösung begrenzt, da die Transkription ein intrinsisch langsamer Prozess ist. Indem die mRNA direkt zum Ziel der Lichtkontrolle gemacht wird, könnte hier schnellere Lichtantworten erreicht werden, um zum Beispiel Untersuchungen zu spezifischen Zeitpunkten des Zellzyklus oder der Embryonalentwicklung durchzuführen.

Auch RNAi basierte Werkzeuge würden durch die Möglichkeit einer räumlichen und zeitlichen Kontrolle durch Licht besser anwendbar, indem *off-target* Wirkung vermieden wird (31). Gerade in der Vorbereitung der klinischen Anwendung RNAi basierter Prozesse werden diese unspezifischen Effekte häufig zum Problem. In den letzten Jahren sind zudem mit *long-non-coding* und *circular*-RNAs immer mehr RNA-Spezies entdeckt worden, deren Funktion entweder kaum oder noch nicht vollständig bekannt ist. Auch diese könnten durch direkte optogenetische Beeinflussung der RNA untersucht werden.

Zusätzlich zeichnet sich ab, dass durch die Interaktion von RNA und RNPs in den Zellen komplexe, membranlose Organellen ausgebildet werden, die weitreichende regulatorische Funktionen wahrnehmen (32), wie zum Beispiel der Nukleolus in eukaryotischen Zellkernen (33). Diese durch Phasenseparation gebildeten Konstrukte regulieren vermutlich durch Diffusionsausschluss bestimmter Stoffe die Verfügbarkeit und Aktivität der beteiligten Komponenten. Auch eine verbesserte Interaktion und erhöhter katalytischer Umsatz durch die räumliche Nähe interagierender Komponenten in den Organellen wird diskutiert und ist im Fall des Nukleolus äußerst wahrscheinlich (34; 35). Außerdem gibt es Hinweise darauf, dass die sogenannten Ribonukleoprotein-Komplexe in einem eng verwandten Mechanismus essentiell sind für den Transport und die posttranskriptionale Modifikation von mRNA (36). So könne die ausgebildeten Komplexe vermutlich von Motorproteinen erkannt und entlang der Mikrotubuli transportiert werden.

Keiner dieser, durch eine Mischung aus spezifischen und unspezifischen Protein-RNA Wechselwirkungen hervorgerufenen Prozessen ist bezüglich seiner Funktion, Bildung und Dynamik abschließend verstanden. Sowohl erhöhte Aggregationstendenz der gebildeten Partikel als auch Fehler bei der Assemblierung, die zu gestörtem Transport, *Splicen* oder Stabilität der RNA führen, werden als ein Faktor für die Entwicklung neurodegenerativer Erkrankungen betrachtet (37). Ein besseres Verständnis der RNA-Protein-Wechselwirkung und der Dynamik der RNA-Proteinkomplexe, wie sie durch eine Lichtregulation der beteiligten Prozesse erreicht werden kann, würde die Forschung in diesem Bereich unterstützen.

### 1.5 PAL Protein zur lichtabhängigen RNA-Bindung

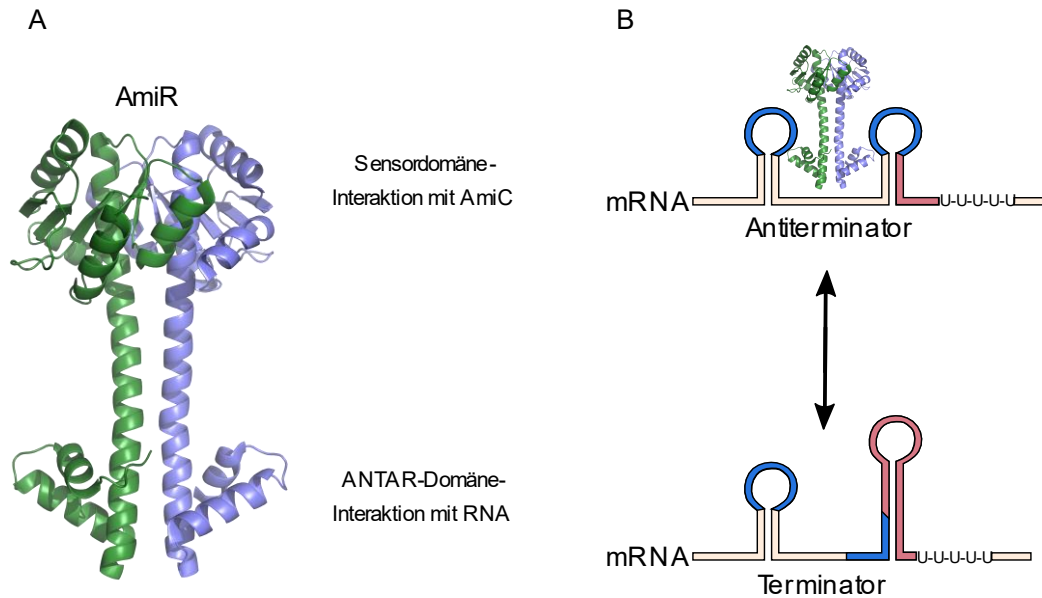
Bei der Abfrage von Domänen, die in Kombination mit LOV-Rezeptoren in Organismen auftreten, wurde genau eine Sequenz identifiziert, die eine LOV-Domäne in Kombination mit einer RNA-bindenden ANTAR-Domäne aufwies. Das hypothetische Protein aus *Nakamurella multipartita* (38) weist laut pfam-Datenbank die Domänenkombination PAS-ANTAR-LOV (PAL) auf. Die Datenbank (39), ordnet durch *Hidden Markov Modelle* anhand von Aminosäuresequenzen unbekannte Proteine bekannten Domänen zu. Die Existenz des Proteins wurde durch PCR-Amplifikation des *open-reading-frames* aus dem Organismus nachgewiesen und eine erfolgreiche Überexpression und Reinigung aus *E. coli* machte es systematischen Untersuchungen zugänglich (40).

Im Vergleich zu den ausführlich charakterisierten LOV-Domänen ist die ANTAR-Domäne noch wenig untersucht. Die gelöste Kristallstruktur von AmiR zeigt ein homodimeres Protein mit einer vorwiegend  $\alpha$ -helicalen Struktur, wobei die C-terminale ANTAR-Domänen aus drei interagierenden Helices und einem langen *coiled-coil Linker* pro Monomer besteht. ANTAR-Domänen wurden durch Sequenzabgleiche in über 600 verschiedenen Bakterienstämmen identifiziert und kommen in Kombination mit vielen verschiedenen Sensordomänen vor (41), wobei die RNA-Bindung durch externe Stimuli reguliert wird (42). Es ist dabei anzumerken, dass in einer Vielzahl der identifizierten Sequenzen die ANTAR-Domäne am C-terminus und nicht, wie in PAL, in der Mitte der hypothetischen Proteine lokalisiert ist.

ANTAR vermittelt durch die RNA-Bindung bakterielle Antitermination und steht für *AmiR and NasR Transcriptional Antiterminator Regulator*. Die Expression von bakteriellen Proteinen kann durch das Ausbilden von Sekundärstrukturen auf der naszierenden mRNA reguliert werden. Dabei bilden sich Haarnadelstrukturen die die Aktivität der RNA-Polymerase inhibieren und zu einem Ablösen der kurzen RNA vom DNA-Strang, also der Termination führen.



ANTAR-Domänen erkennen Sequenzmotive aus zwei degenerierten Haarnadelschleifen und einem Poly-U-Basenabschnitt auf der RNA (41), binden an diese und stabilisieren sie als alternative Struktur gegenüber der Terminator-Schleife (Abbildung 4). Der resultierende RNA-ANTAR-Komplex erlaubt ein weiteres Fortschreiten der RNA-Synthese und hebt die Terminierung auf, bewirkt also Antitermination.

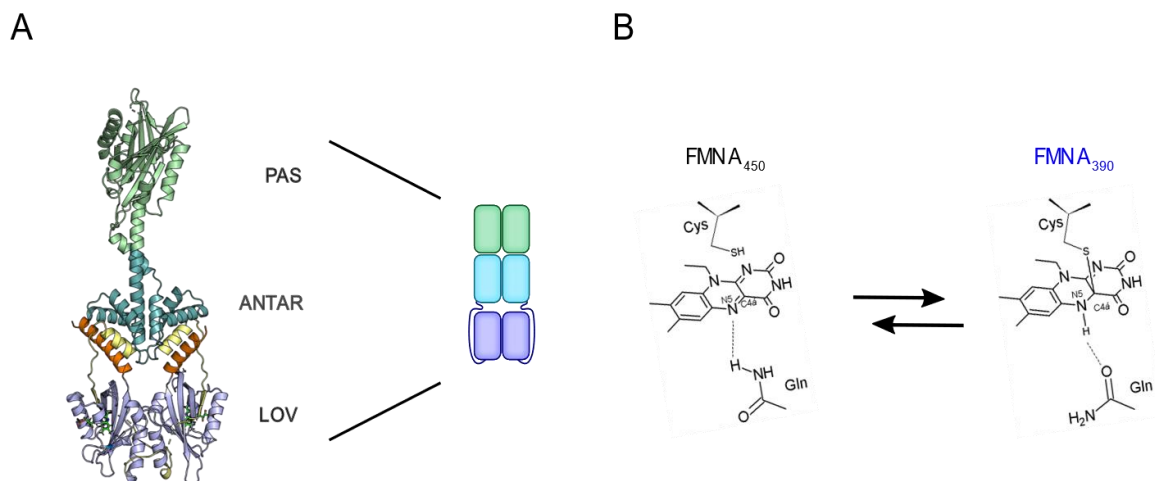


**Abbildung 4 Struktur der ANTAR-Domäne und Mechanismus der Antitermination:** A) Die homodimere Struktur des AmiR ANTAR Proteins aus *Pseudomonas aeruginosa*, das durch die Interaktion mit AmiC reguliert RNA bindet und die Amidase Expression reguliert (PDBid:1QO0; (43)). In B) ist die sich gegenseitig ausschließende Bildung der Terminator- und Antiterminator-Sekundärstrukturen auf der entstehenden mRNA schematisch dargestellt, die ANTAR-Domäne stabilisiert die Antiterminator-Struktur.

Für PAL wurde demnach eine lichtabhängige Regulierung der bakteriellen Antitermination erwartet, wobei der Modus der Signalweiterleitung von LOV zur ANTAR-Domäne aufgrund der ungewöhnlichen Domänenarchitektur unklar war. Initiale *in vitro* -Untersuchungen zu PAL wurden dadurch erschwert, dass die natürliche RNA-Zielsequenz aus *Nakamurella multipartita* unbekannt war. Es wurden daher synthetische RNA-Aptamere entwickelt, deren lichtabhängige Bindung an PAL nachweisbar war (44).

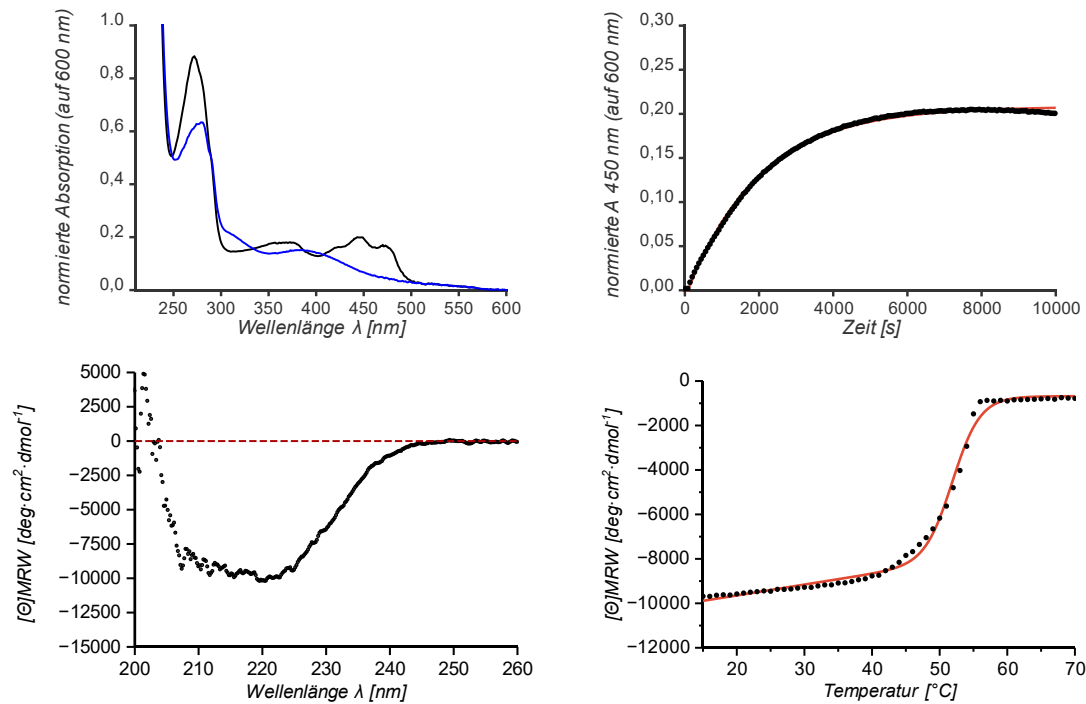
### 1.6 Wissensstand zu Beginn der Arbeit

Vor Aufnahme dieser Arbeit wurde das RNA bindende Protein PAL aus *Nakamurella multipartita* identifiziert, in *E. coli* exprimiert und gereinigt. Das Protein, bestehend aus einer N-terminalen PAS-Domäne, einer anschließenden ANTAR Domäne und C-terminaler LOV-Domäne weist eine homodimere Struktur auf (44). Die für eine LOV-Domäne ungewöhnliche und für die Signaltransduktion via der konservierten  $J\alpha$ -Helix ungünstige C-terminale Position konnte durch das Lösen der dunkeladaptierten Kristallstruktur erklärt werden. Es zeigt sich, dass durch die Insertion jeweils einer weiteren  $\alpha$ -Helix in die LOV-Domäne und ANTAR-Domäne sowie eines prolinreichen Adapters zwischen den Domänen die LOV-Domäne um  $180^\circ$  gedreht wird und somit die  $J\alpha$ -Helix direkt mit der ANTAR-Domäne interagieren kann (Abbildung 5A). Diese Architektur legt eine Regulation der Funktion der ANTAR-Domäne mittels der  $J\alpha$ -Helix nahe, eine Hypothese die im Verlauf dieser Arbeit genauer untersucht wird.



**Abbildung 5 Kristallstruktur und Photozyklus von PAL:** A) Domänenarchitektur von PAL. Die PAS-Domäne ist in hellgrün, die ANTAR-Domäne in petrol und die LOV-Domäne in lila hervorgehoben. Die  $J\alpha$ -Helix ist in orange gekennzeichnet, eine zusätzlich in die ANTAR-Domäne integrierte Helix in gelb (PDB ID PAL 6HMJ). B) Die Konfiguration des Chromophors im Licht- und Dunkelzustand einer LOV-Domäne.

Die Lichtschaltbarkeit der LOV-Domäne (Abbildung 5B) konnte mittels UV-VIS Spektroskopie beobachtet werden. Dabei weist das Flavin-Mononukleotid (FMN) im dunkeladaptierten Zustand des Proteins eine starke, dreigliedrige Absorptionsbande um 450 nm auf. Durch Bestrahlung mit blauem Licht entsteht binnen weniger Sekunden über ein radikalisches Intermediat das Flavin-Cysteinyl-Addukt. Dieses weist keine Absorption bei 450 nm auf, dafür entsteht ein neues Absorptionsmaximum bei 390 nm (Abbildung 6A). Dieser Signalzustand hat im Fall von PAL eine Halbwertszeit von  $2200 \pm 50$  s, was anhand der Rückgewinnung der Absorption des Chromophors bei 450 nm bestimmt wurde (Abbildung 6B).

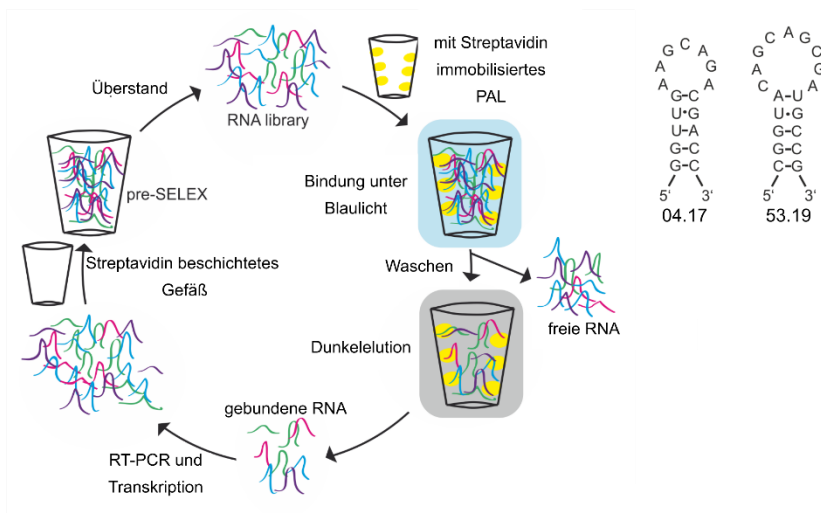


**Abbildung 6 In Vitro Charakterisierung von PAL:** In A werden die die spektroskopischen Unterschiede des dunkeladaptierten (schwarz) und des Signalzustands (blau) von PAL gezeigt. Die Rückkehrkinetik der LOV Domäne von PAL bei 22°C mit einer Halbwertszeit von  $2200 \pm 50$  s in den dunkeladaptierten Zustand sowie das CD-Spektrum bei 22 °C und die thermische Entfaltung des Proteins als CD-Signal bei 220 nm in Abhängigkeit von der Temperatur ( $T_m = 50 \pm 0.2^\circ\text{C}$ ) sind in B, C und D aufgeführt (Daten reproduziert und ausgewertet nach (44)).

Das Circular-Dichroismus-Spektrum zeigt eine Mischung aus Helix und Faltblatt-Anteilen des Proteins, konsistent mit der Proteinstruktur (Abbildung 6C). Der Mittelpunkt der thermischen Entfaltung von PAL wurde mittels einer Schmelzkurve als  $50,2 \pm 0,5$  °C bestimmt (Abbildung 6D). Die Enthalpie wurde mit 430 kJ/mol bestimmt, da das Zweizustandsmodell an den Übergängen jedoch Ungenauigkeiten aufweist, muss dieser Wert vorsichtig interpretiert werden.

In initialen Experimenten zeigte PAL zwar eine bevorzugte Bindung an einzelsträngige RNA im Vergleich zu einzel- und doppelsträngiger DNA sowie doppelsträngiger RNA, allerdings konnte keine Lichtabhängigkeit der Interaktion nachgewiesen werden. Da die natürliche Zielsequenz von PAL jedoch unbekannt ist, wurde vermutet, dass eine spezifisch an PAL bindende RNA auch lichtabhängig binden könnte. Daher wurde die *Systematische Evolution von Liganden durch EXponentielle Anreicherung* (SELEX) (45), eingesetzt um eine spezifisch an PAL bindende RNA Sequenz zu erhalten (Abbildung 7). Dabei wurde PAL mit einer Bibliothek von kurzen RNA-Sequenzen unter Blaulichtbestrahlung inkubiert und nicht-bindende Sequenzen durch Waschen entfernt.

Im Anschluss wurden bindende Sequenzen im Dunkeln eluiert und durch Polymerasekettenreaktion (PCR) vervielfältigt. Über mehrere Selektionsrunden mit zunehmend kürzeren Illuminationszeiten und längeren Waschzyklen wurden anschließend zwei Sequenzen isoliert, die lichtabhängig an PAL binden, Sequenz 04.17 und 53.19. Beide weisen laut Modellvorhersagen eine Haarnadelstruktur auf, unterscheiden sich aber in der Länge der Schleifen.



**Abbildung 7 Entwicklung der RNA Motive:** In der Abbildung wird der Ablauf des Opto-SELEX Prozesses gezeigt, der Selektierung und Anreicherung von PAL bindenden Aptameren unter Einbeziehung von Blaulicht. Indem die Aptamer-Library unter Blaulicht mit PAL inkubiert wird, können die nicht bindenden RNA-Moleküle durch Waschschritte entfernt werden. Die angereicherten Aptamere werden im Dunkeln eluiert, sodass in der nächsten Iteration bindende Aptamere angereichert sind. Rechts sind die zwei resultierenden Aptamer motive abgebildet, wobei 04.17 nach der 9. Iteration und 53.19 nach der 15. Iteration isoliert wurde. Mit zunehmender Zyklenzahl wurden die Waschschritte im Dunkeln verlängert (übernommen aus (44)).

Untersuchungen zeigten, dass die Bindung an PAL viele Variationen im Stamm-Bereich toleriert, im Bereich der Schleifen jedoch die meisten Mutationen zu einem Verlust der lichtaktiven RNA Bindung führen (44). Dies legt nahe, dass die spezifische Bindung an PAL durch die Sequenz der Schleife sowie die Geometrie des RNA-Moleküls definiert wird, die Sequenz des Stamms jedoch nur von untergeordneter Priorität ist. Die identifizierten Aptamere unterscheiden sich von bisher bekannten, natürlichen ANTAR-targets insofern, als dass sie eine kürzere Bindungssequenz aufweisen und nur aus einer Haarnadelschleife bestehen.

In der Vergangenheit waren die natürlichen ANTAR-Bindemotive als Abfolge zweier degenerierter Haarnadelschleifen identifiziert worden, allerdings gibt es wenig Aussagen dazu, ob beide Motive für eine Interaktion notwendig sind. Die identifizierten Zielsequenzen weisen dennoch eine ähnliche Stamm-Länge und eine ähnliche Anreicherung von Purinbasen in der Schleife auf wie bisher identifizierte natürliche ANTAR-Bindemotive.

## 1.6 Zielsetzung der Arbeit

In dieser Arbeit soll die Interaktion zwischen PAL und seinem Aptamer-Zielsequenzen *in vitro* quantitativ analysiert werden, um den Dynamikbereich der Lichtantwort und die Stärke der Interaktion zu definieren. Zudem soll die Funktion des Proteins in Zusammenhang mit der Kristallstruktur analysiert werden. Durch das Einbringen und die Auswertung von gezielten Mutationen kann die untypische Signaltransduktion einer C-terminalen LOV-Domäne auf ihren N-terminalen Rezeptor verstanden werden. Es stellt sich in diesem Zusammenhang auch die Frage, ob diese ungewöhnliche Architektur neue Erkenntnisse über den generellen Mechanismus der Signalweiterleitung in LOV- Domänen ermöglicht.

Gleichzeitig soll durch die Anwendung der lichtschtbaren RNA-Bindung in bakteriellen Systemen erreicht werden, PAL als optogenetisches Werkzeug in rekombinanten Systemen zu etablieren. Die Entdeckung von weiteren PAL-Homologen in verwandten *Nakamurella*-Stämmen im Verlauf der Arbeit brachte die Frage auf, ob diese ebenfalls lichtabhängig RNA binden und ob ihre Eigenschaften die des Original-PALs ergänzen könnten. Zuletzt soll das PAL-Protein für die lichtabhängige Phasenseparation eingesetzt werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Chemikalienliste

Soweit nicht anders angegeben wurden Standardchemikalien für die Pufferherstellung und Bakterienkultur von bekannten Herstellern (Roth, Thermo Scientific, Sigma) bezogen.

#### Liste der verwendeten Puffer und Medien:

##### *Resuspensionspuffer*

50 mM Tris/HCl pH 8,0

1 M NaCl

20 mM Imidazol

##### *Waschpuffer*

50 mM Tris/HCl pH 8,0

250 mM Arginin

##### *Elutionspuffer*

50 mM Tris/HCl pH 8,0

200 mM NaCl

200 mM Imidazol

##### *Dialysepuffer 10 x Vorratslösung*

200 mM Tris/HCl pH 7,7

1350 mM KCl

100 mM NaCl

10 mM MgCl<sub>2</sub>

Vor der Verwendung zu 1 x Puffer verdünnt und mit 10 % w/V Glycerol versetzt

##### *Dialysepuffer IEX*

35 mM Tris/HCl pH 8,0

75 mM NaCl

##### *Elutionspuffer IEX*

35 mM Tris/HCl pH 8,0

750 mM NaCl

*HEPES Puffer für Fluoreszenzanisotropie*

12 mM HEPES pH 7,2

135 mM KCl

10 mM NaCl

1 mM MgCl<sub>2</sub>

*Phosphatpuffer für Fluoreszenzanisotropie*

50 mM Natriumphosphat pH 6,0 - 7,0

135 mM KCl

10 mM NaCl

(± 1 mM MgCl<sub>2</sub>)

*Phosphatpuffer für Größenausschlusschromatographie (SEC-Puffer)*

50 mM Natriumphosphat pH 7,4

150 mM NaCl

Sterilfiltrieren

*LB-Medium für die Bakterienkultur*

LB Broth, Miller (Luria Bertani) von VWR Life Sciences wurde laut Herstellerangaben mit ddH<sub>2</sub>O angesetzt und autoklaviert.

*LB-Agar-Platten für die Bakterienkultur*

500 ml flüssig LB Medium

7,5 g bakteriologischer Agar (VWR Life Sciences)

Autoklavieren und vor dem Gießen der Platten in der Mikrowelle verflüssigen. Nach dem Abkühlen der Masse auf ca. 40-50°C das benötigte Selektionsantibiotikum zugeben und gründlich mischen. Es werden je 20 ml der Lösung in eine Kunststoffpetrischale überführt und durch Schwenken verteilt, die ausgehärteten Platten werden bis zu ihrer Verwendung bei 4 °C gelagert.

*5X Iso Buffer für Gibson Assembly (46)* in 1ml Aliquots bei -20°C gelagert

0,5 M Tris HCl pH 7.5

0,05 M MgCl<sub>2</sub>

je 1mM dGTP/dATP/dTTP/dCTP

0,05 M DTT

2,5 mM NAD

25 % (w/V) PEG 8000

in ddH<sub>2</sub>O

*TAE Puffer*

Rotiphorese<sup>®</sup> 50x TAE Puffer, nach Bedarf in VE-Wasser verdünnt

*SDS Puffer*

Rotiphorese<sup>®</sup> 10x SDS-PAGE, nach Bedarf in VE-Wasser verdünnt

*Schägger Anoden- Puffer (47)*

1 M Tris HCl pH ~8,25

1 M Tricin

1 % (w/V) SDS

*Schägger Kathoden-Puffer 10x*

1 M Tris HCl pH 8,9

*Schägger Gel-Puffer 3x*

3 M Tris HCl pH 8,45

0,3 % (w/V) SDS

*Coomassie-Färbelösung für SDS-Gele*

45 % Methanol

10 % konzentrierte Essigsäure

45 % Wasser

0,25 % (w/V) Coomassie Brilliant Blau R250

0,25 % (w/V) Coomassie Brilliant BlauG250



*Western Blot Transfer-Puffer*

25 mM Tris HCl  
190 mM Glycin  
20 % (V/V) Methanol

*Western Blot TBS-Tween 10x Vorratslösung*

200 mM Tris HCl  
1500 mM NaCl  
1 % (w/V) Tween 20

Vor Verwendung auf 1x Lösung verdünnen und pH auf 7,5 einstellen

*Western Blot Blockierlösung*

1 x TBS Tween mit 3% (w/V) BSA

*Western Blot Alkalische Phosphatase Entwicklungslösung*

100 mM Tris HCl pH 9,5  
100 mM NaCl  
5 mM MgCl<sub>2</sub>

*Western Blot Färbelösung*

50 ml Entwicklerlösung  
100 µl Nitroblautetrazoliumchlorid-Lösung (30 mg/ml in 70 % (w/V) Dimethylformamid)  
100 µl 5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat-Lösung (15 mg/ml in Dimethylformamid)

2.2 Verwendete Bakterienstämme

*E. coli* Xl1blue (Klonierstamm)

*endA1 gyrA96(nal<sup>R</sup>) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F'[::Tn10 proAB<sup>+</sup> lacI<sup>q</sup> Δ(lacZ)M15] hsdR17(r<sub>K</sub>m<sub>K</sub><sup>+</sup>)*

*E. coli* Dh10B (Klonierstamm)

*str. K-12 F<sup>-</sup> Δ(ara-leu)7697[Δ(rapA'-cra' )] Δ(lac)X74[Δ('yahH-mhpE)] duplication(514341-627601)[nmpC-gltI] galK16 galE15 e14<sup>-</sup>(icd<sup>WT</sup> mcrA) φ80dlacZΔM15 recA1 relA1 endA1 Tn10.10 nupG rpsL150(Str<sup>R</sup>) rph<sup>+</sup> spoT1 Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) λ<sup>-</sup> Missense(dnaA glmS glyQ lpxK mreC murA) Nonsense(chiA gatZ fhuA? yigA ygcG) Frameshift(flhC mglA fruB)*

*E. coli* DH 5-α (NEB) (Klonierstamm)

huA2 D(argF-lacZ)U169 phoA glnV44 f80D(lacZ)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17

*E. coli* cmpX13 (Expressions- und Assaystamm)  
*F<sup>-</sup> ompT gal dcm hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) (DE3) manX::ribM*

*E. coli* Arctic Express (Agilent) (Expressionsstamm)  
*B F<sup>-</sup> ompT hsdS(r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) dcm+Tetrgalλ(DE3) endA Hte [cpn10 cpn60 Gentr]*

### 2.3 Liste verwendeter Feinchemikalien, Enzyme und Proteine

Oligonukleotide für die Polymerase-Kettenreaktion wurden von Biolegio und IDT bezogen, RNA Oligonukleotide und fluoreszenzmarkierte DNA- und RNA-Oligonukleotide wurden ausschließlich von IDT bezogen.

Tabelle 1: Feinchemikalien, Enzyme und Proteine

Substanzname	Hersteller und Spezifikationen	Verwendung
Phusion Polymerase	Thermo Scientific # F-530S	PCR
5x Phusion GC-Buffer +7,5 mM MgCl <sub>2</sub>	Thermo Scientific	PCR
100 % DMSO für PCR	Thermo Scientific # F-515	PCR
Phusion Polymerase 2 U/ml	New England Biolabs # M0530S	Gibson Assembly Master Mix
T5 Exonuklease 10000 U/ml	New England Biolabs # M0363S	Gibson Assembly Master Mix
Taq DNA Ligase	New England Biolabs # M0208L	Gibson Assembly Master Mix
DPN1	Thermo Scientific # ER1702	DPNI Verdau
Tango Buffer	Thermo Scientific	DPNI Verdau
Poly-Nukleotid-Kinase	Thermo Scientific # EK0032	<i>Blunt End Ligation</i>
T4 Ligase	Thermo Scientific # EL0011	<i>Blunt End Ligation</i>
T4 Ligase Puffer	Thermo Scientific	<i>Blunt End Ligation</i>
Anti c-Myc Antikörper aus Kaninchen	Sigma-Aldrich # C3956	Western Blot primärer Antikörper
Alkalische Phosphatase gekoppelter Antikörper gegen Kaninchen	Sigma-Aldrich # AP307P	Western Blot sekundärer Antikörper
Glukose Oxidase	Calbiochem	Scavenger System reaktive Sauerstoffspezies
Katalase	Sigma-Aldrich	Scavenger System reaktive Sauerstoffspezies
PAGERuler unstained	Thermo Scientific	Polyacrylamidgelelektrophorese-Molekulargewichtstandard
PAGERuler prestained	Thermo Scientific	Polyacrylamidgelelektrophorese-Molekulargewichtstandard für Western Blots
GeneRuler Plus DNA Ladder 1 kb	Thermo Scientific	Agarosegelelektrophorese-Molekulargewichtstandard

Midori Green	Nippon Genetics EUROPE GmbH	Agarosegelelektrophorese DNA Färbung
RiboRuler High Range RNA Ladder	Thermo Scientific	Agarosegelelektrophorese Molekulargewichtsstandard RNA
Ultrapure™ BSA	Invitrogen # AM 2616	Unterdrückung von unspezifischen Interaktionen bei PAL-RNA Interaktionsstudien
DNase I RNase free	Thermo Scientific # EN0521	DNase Verdau nach RNA Extraktion
MulV RT	New England Biolabs # M0253	Reverse Transkription der RNA
Oligo d(T) Primer	New England Biolabs # S1327	Reverse Transkription der RNA
Master Mix qPCR	Jena Biosciences # PCR-372	qPCR Reaktion

#### 2.4 Verwendete vorgefertigte Kits

NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kit von Macherey-Nagel

Zur Extraktion von PCR-Amplifikationsbanden aus Agarosegelen und zur Reinigung von PCR Reaktionen.

NucleoSpin® Plasmid EasyPure Kit von Macherey Nagel

Zur Extraktion von Plasmiden aus 5 ml *E.coli* Bakterienkulturen

TranscriptAid T7 High Yield Transcription Kit

Zum Umsetzen von Plasmid DNA bzw. PCR-Produkten in RNA zur Synthese von Polyaptamertargets für Interaktionsstudien

Monarch RNA Clean up Kit

Zur Reinigung der Produkte der *in vitro* Transkription der Polyaptamertargets

Quiagen RNeasy Mini Kit

Zur Isolation von RNA aus *E.coli*

### 2.5 Verwendete Säulen für die Proteinreinigung und Analytik

#### Ni-NTA 1 ml Säulen (Macherey-Nagel)

Zur Affinitätschromatografie von Proteinen mit Hexahistidin-*tag* und zur reversen Affinitätschromatographie von Proteinen mit SUMO-*tag*

#### HiTrap™ QFF *Anion Exchange* 1 ml Säulen (GE)

Als zweiter Reinigungsschritt von Proteinen bei starken Verunreinigungen zur Anionenaustauscher-Chromatographie

#### Superdex 200 Increase (GE)

Zur analytischen Gelfiltration von Tetrameren-PAL Varianten und Interaktionen

#### Superdex HiLoad 26/600 (GE)

Zur präparativen Gelfiltration als zweiter Reinigungsschritt bei starken Verunreinigungen von Proteinen

### 2.6 Verwendete Computer-Programme

Sofern nicht weiter spezifiziert wurden die hier angegebenen Programme für die Datenverarbeitung und Auswertung verwendet:

#### Fit-o-mat (48)

Zum Erstellen von Grafiken und Modellberechnung

#### Microsoft Excel

Zur Rohdatenbearbeitung und für Berechnungen

#### Inkscape

Zur Abbildungserstellung

#### Fiji/ImageJ

Zur Bearbeitung von mikroskopischen Aufnahmen

#### JalView

Zur Bearbeitung und Darstellung von Sequenzalignments

#### PyMOL

Zur Darstellung von Proteinstrukturen

#### Serial Cloner® und SnapGene® Viewer

Zum Erstellen von Plasmidkarten

#### RNAfold-Online Tool (49)

Zur Berechnung der theoretischen RNA-Sekundärstrukturen

## 2.7 Methoden

### 2.7.1 Agarosegelelektrophorese

Gele wurden durch Lösen von 1% Agarose in 1x TAE Puffer erhalten, dazu wurde das Gemisch in einer Mikrowelle erhitzt. Zum Färben wurde nach Abkühlen der Agaroselösung auf ca. 50 °C *Midori-Green* laut Herstellerangaben zugegeben. Anschließend wurde die Lösung in Gussformen überführt, um entweder analytische (Taschenvolumen bis 10 µl) oder präparative (Taschenvolumen bis 100 µl) Gele zu erhalten.

### 2.7.2. Polymerasekettenreaktion

Es wurden verschiedenen Strategien verwendet, um Proteinkonstrukte zu erhalten. Um Proteine und Proteindomänen in Plasmide einzubringen wurde Gibson-Assembly verwendet.

Zum Einfügen kürzerer Sequenzen zwischen zwei und 50 Basenpaaren wurden Überhangprimer mit anschließender *blunt end* Ligation und für die Erstellung von Punktmutationen in bestehenden Konstrukte Mutagenese-PCR eingesetzt. Die Amplifikation der Produkte wurde mittels Agarosegelelektrophorese verifiziert.

### Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Für die Amplifikation und Variation von genetischem Material wurden die einzelnen Komponenten wie in Tabelle 2 angegeben gemischt und anschließend unter den in Tabelle 3 angegebenen Bedingungen im *PCR-Cycler* inkubiert.

**Tabelle 2: Komponenten der Polymerase Kettenreaktion**

<b>Komponente</b>	<b>Volumen [µl]</b>
ddH <sub>2</sub> O	34
DMSO	1,5
GC-Puffer	10
Primer Mix [10 µM]	2,5
dNTP Mix [10 µM]	1
Ausgangsplasmid	0,5
Phusion Polymerase	0,5 [2 U/µl]

Dabei wurden die Amplifikationszeiten an die Länge des gewünschten Produkts angepasst sowie die Initiationstemperatur an die Zielsequenz der Primer. In einzelnen Fällen und bei hohem GC-Gehalt der zu amplifizierenden Sequenzen wurde *touchdown* oder *two step* PCR eingesetzt (50).

Im Anschluss an die Bestätigung der Amplifikation wurden die Produkte je nach der Menge der auftretenden Nebenbanden durch präparative Gelelektrophorese, Gelextraktion und Reinigung mittels eines PCR Reinigungs-Kits aufgearbeitet.

**Tabelle 3: Protokoll der Polymerase-Kettenreaktion**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Temperatur [°C]</b>	<b>Zeit [min]</b>	<b>Zyklusanzahl</b>
Initiale Denaturierung	98	2	1
Denaturierung	98	0,5	30-40
Anlagerung	50-68	0,5	
Elongation	72	0,5-3	
Finale Elongation	72	10	1

### Gibson Assembly (46)

Für den Mastermix wurden die Komponenten aus Tabelle 4 zusammengegeben, anschließend wurde der Ansatz gemischt und als 15 µl Aliquots bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

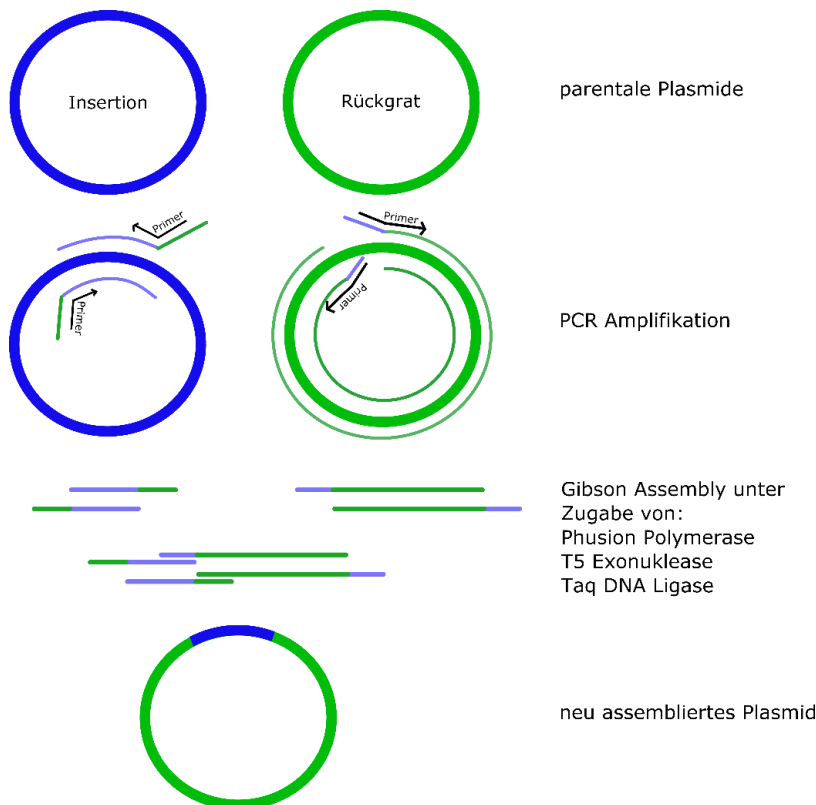
**Tabelle 4: Komponenten des Gibson-Assemblierungs-Master Mix**

<b>Komponente</b>	<b>Volumen [µl]</b>
5x ISO Puffer	320
10 U/µl T5 Exonuklease	0,64
2 U/µl Phusion Polymerase	20
40 U/µl Taq Ligase	160

mit ddH<sub>2</sub>O auf 1,2 ml auffüllen

Das Plasmidrückgrat wurde mittels PCR amplifiziert, dabei überlappen die verwendeten Primer mit einem Teil der einzufügenden Sequenz (Abbildung 8), ebenso wurde mit der kürzeren Sequenz des Einschubs verfahren. Nachdem die Amplifikation der Fragmente durch Agarosegelelektrophorese bestätigt wurde, wurden sie mittels präparativer Gelelektrophorese und des PCR Reinigungs-Kits gereinigt und die Konzentration photometrisch mit einem Plattenlesegerät bestimmt.

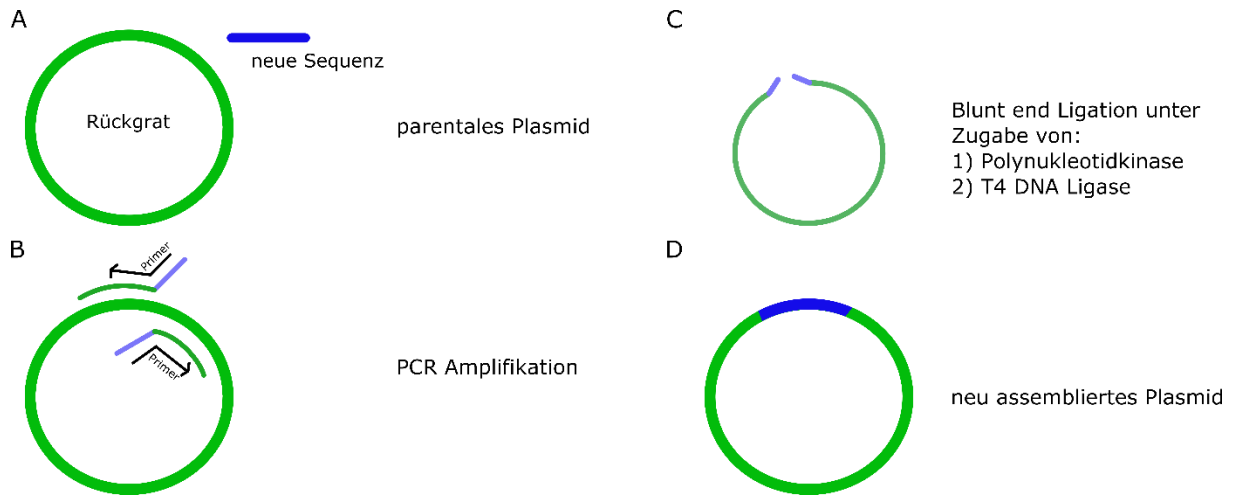
Anschließend wurde *Gibson Assembly* nach dem veröffentlichten Protokoll durchgeführt. Hierfür wurde ein Überschuss des Einschubs von 3:1 eingesetzt. Die gereinigten PCR-Produkte wurden gemischt und im Anschluss 5 µl der Mischung zu 15 µl des *Gibson-Assembly-Master-Mix* gegeben. Der Ansatz wurde eine Stunde bei 50 °C inkubiert und danach in kompetente *E. coli*-Zellen (s. 2.7.4 Transformation von kompetenten ) transformiert.



**Abbildung 8 Überblick über das Gibson-Assemblierungsprotokoll:** Die parentalen Plasmide werden in separaten PCR Reaktionen amplifiziert. Dabei werden die Primer so gewählt, dass an die einzufügende Sequenz Überhänge zum Rückgrat-Plasmid angehängt werden, während an das Rückgrat Überhänge zur Insertionssequenz eingefügt werden. Die entstandenen linearen Fragmente werden mit T5 Exonuklease, Phusion Polymerase und Taq DNA Ligase inkubiert; durch Rückverdau der Exonuklease entstehen freie 3' Termini, die von der Ligase verknüpft werden können. Die Polymerase füllt die Lücken in der Sequenz auf, sodass ein komplettes Plasmid assembliert wird.

### Klonierung mittels Überhangprimern und *Blunt end* Ligation

Für die PCR wurden Primer eingesetzt, welche die einzufügende Sequenz als Überhänge enthalten (Abbildung 9). Dabei wurde die Fusionsstelle möglichst so angepasst, dass im folgenden Schritt zwischen Guanin und Cytosin ligiert werden konnte. Im Anschluss an die Reinigung der PCR Produkte wurden diese zunächst mit Polynukleotidkinase für 30 Minuten bei 37°C inkubiert und anschließend unter Zugabe von 166 nM ATP und 10 % PEG 4000 mittels T4 DNA Ligase verknüpft. Anschließend wurde bei 70 °C für 10 Minuten hitzeinaktiviert und das PCR Produkt in kompetente *E. coli* Zellen transformiert.



**Abbildung 9 Überblick über das Blunt-End Ligations Protokoll:** Eine kurze Sequenz (ca. 5-60 bp) soll in ein Plasmidrückgrat eingefügt werden (A). Dafür wird jeweils die Hälfte der Sequenz mittels eines Primerüberhangs während der PCR Amplifikation eingebracht (B). Durch Phosphorylierung der freien 5' Enden mittels Polynukleotidkinase kann T4 DNA Ligase eingesetzt werden um die blunt ends des Plasmids zusammenzufügen (C und D).

### Klonierung mittels Mutagenese PCR

Für die PCR wurden Primer eingesetzt, die die gewünschten Fehlpaarungen (1 bis 3 Basenpaare) enthalten, beiderseits der Mutation wurde die Sequenz noch um ca. 10 Basen verlängert, wobei darauf geachtet wurde, die Primer mit Guanin oder Cytosin enden zu lassen unter gleichzeitiger Vermeidung von doppelten Basen an den Primerenden.

Nach der Reinigung der PCR-Produkte wurde ein Verdau mit DPN1 für 1,5 – 2 h bei 37 °C durchgeführt um das Originalplasmid zu entfernen\*. Anschließend wurde bei 70 °C für 10 Minuten hitzeinaktiviert und das PCR-Produkt in kompetente *E. coli* Zellen transformiert.

\*Wenn durch Sequenzieren eine Kontamination durch Originalplasmide festgestellt wurde, wurde auch beim Gibson-Klonieren und bei der *Blunt End*-Ligation zusätzlich ein DPN1-Verdau durchgeführt.

### 2.7.3 Restriktionsklonierung

Für die Klonierung der repetitiven polyvalenten Aptamere wurde von einem synthetisierten 4x Aptamer ausgegangen, an dessen Rändern Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *XbaI* (TCTAGA) und *SpeI* (ACTAGT) eingebracht wurden. Diese bilden nach Verdau kompatible Überhänge (Abbildung 10). Dieselben Restriktionsschnittstellen wurden durch PCR-Klonierung und *Blunt end*-Ligation hinter den T7-Promotor des pET28-Vektors eingebracht.

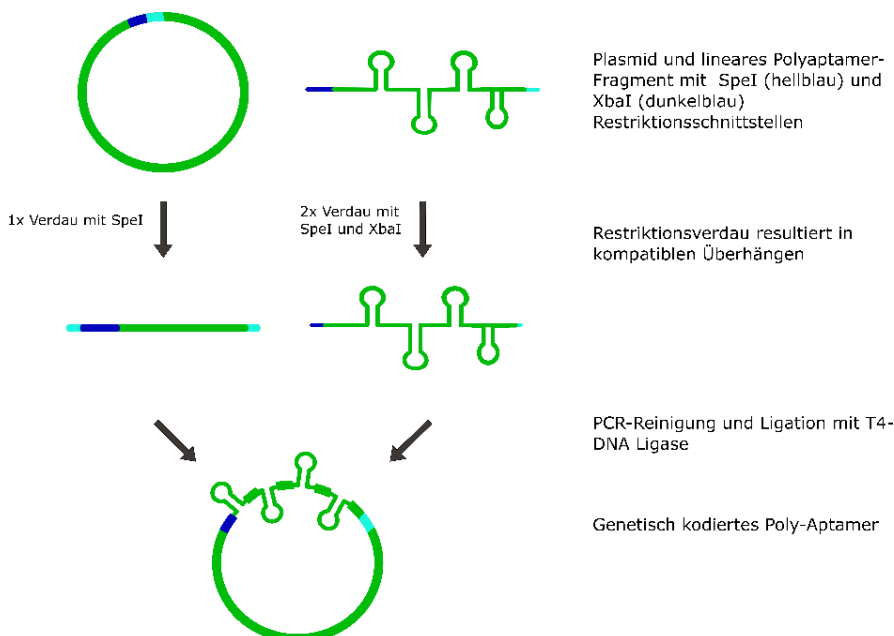


Der isolierte Vektor wurde einfach mit *SpeI* geschnitten, das Fragment zweifach mit *SpeI* und *XbaI*, indem 10 µl DNA mit 1 µl der jeweiligen Enzyme und 2 µl 10x *FastDigest*-Puffer (Enzyme und Puffer von Thermo Scientific) mit sterilem Wasser auf 20 µl aufgefüllt und anschließend für eine Stunde bei 37°C inkubiert wurden. Die Reaktion wurde mittels einer PCR-Reinigung beendet, anschließend wurden die Fragmente mit T4 DNA-Ligase fusioniert. Dazu wurde die Konzentration der linearen Fragmente photometrisch bestimmt und sie für die Ligationsreaktion in einem Verhältnis von Vektor:Insert von 1:3 bis 1:5 eingesetzt. Ein exemplarischer Ansatz ist in Tabelle 5 zu sehen.

**Tabelle 5: Zusammensetzung des Ligationsansatzes für die Restriktionsklonierung**

Komponente	Volumen [µl]
ddH <sub>2</sub> O	8
10 x Ligase Puffer	2
Insert DNA	6 (konzentrationsabhängig)
Vektor DNA	2 (konzentrationsabhängig)
T4 DNA Ligase 5U/µl	2

Anschließend wurde der Ansatz 2 h bei Raumtemperatur inkubiert, 10 Minuten bei 70 °C inaktiviert und anschließend in kompetente X11blue *E. coli* Zellen transformiert. Aus positiv sequenzierten Klonen konnte erneut Plasmid-DNA gewonnen werden.



**Abbildung 10 Überblick über das Restriktionsklonierungsverfahren:** Das Plasmid mit den Schnittstellen *SpeI* und *XbaI* wird mit *SpeI* verdaut, das einzubringende Fragment mit *SpeI* und *XbaI*, sodass 2 lineare Fragmente mit kompatiblen Enden entstehen, die im nächsten Schritt ligiert werden. Das entstandene Plasmid kann durch Transformation in Bakterien amplifiziert und anschließend sequenziert werden. Um längere Polyaptamere zu erhalten kann aus dem entstandenen Plasmid durch Restriktionsverdau sowohl lineares Aptamerfragment als auch neues Ausgangsplasmid gewonnen werden.

Bei der Ligation bleiben die beiden äußeren Restriktionsschnittstellen erhalten, sodass sie verwendet werden können um das Aptamerfragment erneut auszuschneiden und einzufügen, womit längere polyvalente Sequenzen synthetisiert werden können. Ein Überblick über die Strategie ist in Abbildung 10 zu sehen.

### 2.7.4 Transformation von kompetenten *E. coli*

Für die Plasmidamplifikation zur Sequenzierung wurden die Stämme Dh10b und X11blue (bei Streptomycin Resistenz der verwendeten Plasmide), für die Expression von Proteinen die Stämme Cmpx13 und Arctic Express (Agilent) verwendet. Cmpx13 ist ein adaptierter BL21 Stamm (51), in dem ein Riboflavin-Importer ins Genom integriert ist, sodass durch Zugabe von Riboflavin ins Medium die Menge an gebildetem Flavin-Chromophor und die Chromophorintegration in die LOV-Domäne gesteigert werden kann. Arctic Express Zellen sind auch bei niedrigen Temperaturen in der Lage dazu, hohe Proteinkonzentrationen zu erreichen und wurden eingesetzt, um schwer lösliche oder zur Aggregation neigenden Proteine zu exprimieren.

Für die Transformation chemisch kompetenter Zellen wurden diese auf Eis aufgetaut, 5-15 µl des PCR Produkts bzw. Plasmids zugegeben und anschließend 15-20 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen einem Hitzeschock bei 42 °C für 35 Sekunden ausgesetzt.

Nach erneuter Inkubation auf Eis für 2 Minuten wurden 300 µl frisches LB-Medium zugegeben und die Zellen eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden 5 Minuten bei 4000 g pelletiert, das Medium bis auf 50 µl abgenommen, das Pellet resuspendiert und auf einer LB-Agar Platte mit dem gewünschten Antibiotikum ausgestrichen. Danach wurden die Platten über Nacht bei 37 °C inkubiert, bis einzelne Kolonien sichtbar waren.

Elektrisch kompetente Arctic Express wurden transformiert, indem zu den Zellen 5 µl Plasmid DNA gegeben wurden, anschließend wurde die Mischung zwischen die Metallplatte einer Elektroporationsküvette pipettiert und in einem Eporator<sup>®</sup> von Eppendorf bei einer Leistung von 1700 V transformiert. Danach wurden 300 µl frisches LB-Medium zugegeben und die Zellen in der Küvette noch 1 h bei 37°C inkubiert, bevor 10 µl des Ansatzes auf LB-Agarplatten mit den gewünschten Selektionsmarkern ausgestrichen wurden. Danach wurden die Platten über Nacht bei 37 °C inkubiert bis einzelne Kolonien sichtbar waren.

### 2.7.5 Plasmidpräparation für die Sequenzierung

Einzelkolonien der transformierten *E. coli* Zellen wurden mit einer sterilen Mini-Nadel in 5 ml LB-Medium, das mit dem benötigten Antibiotikum versetzt war, überimpft. Die Kulturen wurden über Nacht bei 37 °C (oder über 3 Tage bei 29 °C) im Drehrad inkubiert und anschließend mit dem *Plasmid Clean-up*-Kit anhand der Herstellerangaben präpariert.

Die Konzentration der erhaltenen Plasmide wurde photometrisch bestimmt, die Sequenzierung der DNA erfolgte entweder bei Eurofins, GATC oder Microsynth.

### 2.7.6. Vorbereitung von Kryostocks

Zur Lagerung der Konstrukte wurden 5 ml *E. coli* Kulturen auf eine optische Dichte bei 600 nm von ca. 0,1 angezogen und anschließend 1000 µl der Kultur mit 500 µl einer 50 %igen, sterilen Glycerol-Lösung versetzt. Die so gewonnenen Kryostocks wurden in einem Cryo-Röhrchen (Labsolute) bei – 80 °C gelagert.

### 2.7.7 Proteinexpression

Die für die Reinigung vorgesehenen Proteine wurden während der Klonierung mit einem Hexahistidin Marker versehen. Für die Expression in *E. coli* cmpX13 wurden die Zellen in LB-Medium mit den benötigten Selektionsantibiotika (50 µg/ml Kanamycin oder 100 µg/ml Ampicillin/Streptomycin) bei 37 °C und 225 rpm inkubiert, bis sich eine optische Dichte von 0,6-0,8 einstellte.

Anschließend wurden die Kolben eine halbe Stunde bei 16 °C weitergeschüttelt, bevor 1 mM IPTG zur Induktion zugegeben wurde. Die Kolben wurden für weitere 16 h bei 16 °C inkubiert und die Kulturen am nächsten Morgen geerntet.

Für die Expression in *E. coli* Arctic Express wurden die Zellen in LB-Medium mit dem benötigten Selektionsantibiotikum (50 µg/mL Kanamycin) bei 29 °C und 225 rpm inkubiert, bis sich eine optische Dichte von 0,6-0,8 einstellte. Anschließend wurden die Kolben eine halbe Stunde bei 12 °C weitergeschüttelt, bevor 1 mM IPTG zur Induktion zugegeben wurde. Die Kolben wurden für weitere 48-72 h bei 12 °C inkubiert bevor die Kulturen geerntet wurden.

### 2.7.8 Proteinreinigung

*E. coli* Zellen wurden durch Zentrifugation für 7 Minuten bei 4 °C und 7000 rpm (Beckman Coulter, Avanti J-E Centrifuge) geerntet und anschließend in Resuspensionspuffer mit Protease Inhibitor überführt. Der anschließende Zellaufschluss erfolgte durch Ultraschall (G.Heinemann Ultraschall und Labortechnik - Sonifier). Das Zelllysat wurde durch Zentrifugation bei 4 °C und 16000 rpm (Beckman Coulter, Avanti J-E Centrifuge) geklärt und der Überstand durch einen 5 µM Filter von Partikeln befreit, bevor er mittels eines ÄKTA pure® Chromatographiesystems via Nickel-NTA-Affinitätschromatographie gereinigt wurde.

Hierzu wurde nach Äquilibrierung des Systems mit Resuspensionspuffer zunächst der Überstand auf die Säule aufgebracht und anschließend mit Waschpuffer ungebundene Proteine entfernt. Das System wurde reäquilibriert und das Zielprotein dann mit einem Imidazolgradienten von 20 bis 200 mM, der aus Resuspensionspuffer und Elutionspuffer erstellt wurde, von der Säule verdrängt. Die gesammelten Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE auf Reinheit und Proteingehalt überprüft und dementsprechend vereinigt. Die vereinigten Fraktionen wurden in den Dialysepuffer überführt, dabei wurde gegen insgesamt 2 l Puffer in 2 Schritten dialysiert. Am Folgetag wurde das dialysierte Protein durch wiederholtes Zentrifugieren in einem Konzentratoren angereichert. Anschließend wurde die Konzentration des Proteins durch UV-Vis Absorptionsspektroskopie bestimmt.

Bei unzureichender Reinheit der Proteinfractionen wurde über Nacht in Anionenaustauscher Puffer dialysiert und am Folgetag das Dialysat mittels einer HiTrap®-Säule weiter aufgereinigt. Dabei wurde das ÄKTA-System mit Anionenaustauscher Puffer äquilibriert und das Protein aufgetragen, anschließend wurde mit Anionenaustauscher Elutionspuffer eluiert. Im Anschluss wurde eine zweite SDS-PAGE durchgeführt und reine Fraktionen vereinigt, die in Dialysepuffer überführt und nach der Dialyse aufkonzentriert wurden.

### 2.7.9 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Aus wässriger Polyacrylamidlösung (Rotiphorese® Gel 40; Carl Roth), 1,5 M Tris/HCl pH 8,8, 10 % SDS Lösung und 1 M Tris HCl pH 6,8 wurden die in Tabelle 6 beschriebenen Lösungen angesetzt. Aus diesen Lösungen wurden durch Mischen zunächst 5 ml der gewünschten Trenngelkonzentration erhalten.

**Tabelle 6: Zusammensetzung der Stammlösungen für SDS-Polyacrylamid Gele**

	<b>Trenngel 40 ml</b>		<b>Sammelgel 40 ml</b>
Konzentration des Gels [%]	<b>20</b>	<b>0</b>	<b>4</b>
Rotiphorese 40 (37,5:1)	20 ml	-	4 ml
Tris/HCl 1,5 M pH 8,8	10 ml	10 ml	-
Tris HCl 1 M pH 6,8	-	-	5 ml
SDS	0,4 ml	0,4 ml	0,4 ml
H <sub>2</sub> O	9,6 ml	29,6 ml	30,6 ml

Die Polymerisation wurde durch Zugabe von 12,5  $\mu\text{L}$  TEMED und 35  $\mu\text{l}$  30 % APS gestartet. Die Lösung wurde durch Invertieren gemischt, zügig in eine BioRad Gießhilfe überführt und mit Isopropanol überschichtet. Nach dem Auspolymerisieren wurde das Isopropanol abgossen, die Polymerisation von 5 ml Sammelgel-Lösung durch Zugabe von 12,5  $\mu\text{l}$  TEMED und 35  $\mu\text{l}$  30 % APS gestartet, das Trenngel überschichtet und der Kamm eingesetzt. Gele wurden bis zu Ihrer Verwendung in feuchten Tüchern eingeschlagen bei 4 °C gelagert.

Um besonders kleine Proteine (< 20kDa) auf dem Polyacrylamidgel abzubilden, wurde die Methode nach Schägger (47) abgewandelt und eingesetzt. In der untenstehenden Tabelle 7 sind die eingesetzten Lösungen aufgeführt.

**Tabelle 7: Zusammensetzung der SDS-Gele für Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Schägger**

	<b>Trenngel 40 ml</b>	<b>Sammelgel 40 ml</b>
Konzentration des Gels [%]	<b>16</b>	<b>4</b>
Rotiphorese 40 (37,5:1)	16 ml	4 ml
Gelpuffer (3x)	8 ml	8 ml
SDS	0,4 ml	0,4 ml
H <sub>2</sub> O	16 ml	28 ml

Als Gelproben wurden entweder Zellsuspension, Zellpellets oder Reinigungsfraktionen verwendet. Zur Vorbereitung wurden 100  $\mu\text{l}$  Proben von Zellsuspension für 5 Minuten bei 1400  $\times g$  zentrifugiert, der Überstand verworfen und das erhaltene Pellet in 20  $\mu\text{l}$  4x SDS-Probenpuffer aufgenommen. Proben von Zellpellets oder Reinigungsfraktion wurden direkt in 4x SDS-Probenpuffer aufgenommen. Die Proben wurden für 10 Minuten bei 95 °C im Heizblock denaturiert und anschließend abzentrifugiert, danach wurden sie entweder direkt auf das Polyacrylamidgel aufgetragen oder bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert. Die Gelproben wurden in Rotiphorese® Laufpuffer bei 50 mA für 50-75 Minuten aufgetrennt, als Molekulargewichtsstandard wurde PAGERuler unstained verwendet (oder PAGERuler prestained bei Western Blots, beide von Thermo).

Zum Färben wurde das Gel in Coomassie Färbelösung aufgeköcht und anschließend durch Aufkochen in 6 % Essigsäure für mehrere Minuten entfärbt. Zur Dokumentation wurden Bilder mit dem INTAS Fotobox/GDS System aufgenommen, die weitere Bildaufarbeitung wurde mit der *Inkscape*-Software durchgeführt.

Die Probenvorbereitung für Schägger-Gele erfolgte wie oben beschrieben, der Lauf erfolgte unter Verwendung von Anoden- und Kathodenpuffer zunächst bei 20 Volt für 25 Minuten und anschließend bei 180 V für weitere 30 Minuten. Das Gel wurde wie oben beschrieben gefärbt und dokumentiert.

### 2.7.10 UV-Vis Spektroskopie

Sowohl zur Konzentrationsbestimmung der gereinigten Proteine als auch zur Überprüfung der Chromophorintegration der Photorezeptoren und der Bestimmung ihrer Dunkel-Rückkehr-Kinetiken wurde ein Agilent 8435 diode-array Spektralphotometer verwendet. Dabei wurde zunächst in einer Quarzküvette eine Referenzmessung des verwendeten Puffers aufgenommen und anschließend das Absorptionsspektrum der betreffenden Probe vor und nach Beleuchtung mit Blaulicht. Um die Rückkehrkinetik zu bestimmen, wurde im Kinetik-Modus des Geräts nach Beleuchtung die Absorption bei 450 nm über einen Zeitraum von bis zu 30000 Sekunden mit Messintervallen von 30 Sekunden verfolgt.

Die Konzentrationsbestimmung der gereinigten Proteine erfolgte über das Lambert Beer Gesetz (Gleichung 1), wobei für Photorezeptoren ein Extinktionskoeffizient des Flavinchromophors von  $12500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  bei 450 nm angenommen wurde. Für Proteine ohne integriertes Chromophor wurde der theoretische Extinktionskoeffizient bei 280 nm über Expasy ProtParam ermittelt, um die Konzentration zu berechnen.

Bei LOV-Photorezeptoren mit geringer Chromophorintegration (abgeschätzt aus dem Quotienten  $A_{450}/A_{280}$ ) wurde die Absorption bei 280 nm um den Beitrag des Flavins korrigiert (Gleichung 2) und der theoretische Extinktionskoeffizient bei 280 nm zur Konzentrationsbestimmung herangezogen.

$$E(\lambda) = \varepsilon_{\lambda} \times c \times d \quad (1)$$

$$c = \frac{E(\lambda)}{\varepsilon_{\lambda} \times d}$$

Mit  $E(\lambda)$  = Extinktion bei Wellenlänge  $\lambda = 450 \text{ nm}$   
 $\varepsilon_{\lambda}$  = Extinktionskoeffizient FMN bei 450 nm =  $12500 \text{ m}^2/\text{mol}$   
 $c$  = Konzentration in mol  
 $d$  = Schichtdicke in m

$$c = \frac{E(280\text{nm}) - (2,3 \times E(\lambda))}{\varepsilon_{280\text{nm}} \times d} \quad (2)$$

Mit  $E_{280}$  = Extinktion bei Wellenlänge  $\lambda = 280 \text{ nm}$   
 $\varepsilon_{\lambda 280}$  = theoretischer Extinktionskoeffizient d. Proteins bei 280 nm in  $\text{m}^2/\text{mol}$

Um die Halbwertszeit des Photozyklus der Proteine zu ermitteln wurden die Absorptionswerte bei 450 nm mit einer Exponentialfunktion erster Ordnung (Gleichung 3) ausgedrückt.

$$A(450\text{nm}) = A_0 + A_1 \times e^{(-t/\tau_1)} \quad (3)$$

Mit  $t$  als Zeitpunkt nach Beleuchtung und  $\tau_1$  als der Halbwertszeit der Rückkehrkinetik im Dunkeln.

### 2.7.11 Circular Dichroismus

Um die Zusammensetzung der Sekundärstruktur von PAL zu überprüfen wurde *Circular-Dichroismus*-(CD) Spektroskopie an einem JASCO J710 Spektralphotometer durchgeführt. Als Puffer wurde abhängig von der Stabilität der Proteine entweder 100 mM Natriumphosphat pH 7 mit 300 mM NaCl oder aber der Dialysepuffer der Reinigung verwendet. Spektren wurden im Dunkeln und nach Beleuchtung mit Licht einer Wellenlänge von 450 nm gemessen. Die Stabilität der Proteine wurde durch das Verfolgen der thermischen Denaturierung bei 220 nm bestimmt. Die Daten wurden auf Proteinkonzentration und -größe normiert ( $\theta_{MRW}$ ) und durch nicht lineare Regression an ein Zwei-Zustands-Entfaltungsmodell ausgewertet (Gleichung 4-7)

$$\Delta G = \Delta H - \frac{T}{T_m * \Delta H} + \Delta Cp * (T - T_m - T \times \log(\frac{T}{T_m})) \quad (4)$$

$$K = e^{\frac{-\Delta G}{R/T}} \quad (5)$$

$$fN = \frac{1}{1+K} \quad (6)$$

$$\theta_{MRW} = fN(SN + slopeN(T - T_m)) + (1 - fN)(SU + slopeU(T - T_m)) \quad (7)$$

Mit:

R = Gaskonstante 8.3145 J\*K<sup>-1</sup>\*mol<sup>-1</sup>

T<sub>m</sub> = Schmelzpunkt (K)

G = freie Enthalpie

H = Reaktionsenthalpie

C<sub>p</sub> = Wärmekapazität

fN = Fraktion natives Protein

slopeN/U = Steigung der Geraden für das native und entfaltete Protein

SN/SU = Achsenabschnitt der Geraden für das native und entfaltete Protein

### 2.7.12 Fluoreszenzspektren

Zur Charakterisierung der Fluoreszenzeigenschaften wurden Emissionsspektren von PAL, EYFP und TAMRA-markierter RNA aufgenommen. Dazu wurde die zu messende Substanz entsprechend in Phosphatpuffer oder ddH<sub>2</sub>O verdünnt und die Fluoreszenz bei 450, 484 und 550 nm angeregt. Die Emissionsspektren wurden dann jeweils ab 20 nm oberhalb der Anregungswellenlänge an einem Tecan M200 Plattenlesegerät gemessen.

### 2.7.13 Synthese von Polyaptamer RNAs

Für Untersuchungen zur lichtabhängigen Phasenseparation wurden polyvalente Aptamere durch *in vitro* Transkription erhalten. Hierfür wurde die benötigte, vervielfältigte Sequenz auf ein Plasmid hinter einen T7 Promotor kloniert (s. 2.4.3), und die gewonnene Plasmid-DNA für eine PCR eingesetzt, welche Promotor und gewünschte Sequenz amplifizierte. Dieses PCR Produkt wurde mittels einer *in vitro* Transkription nach Herstellerangaben mit dem TranscriptAid T7 High Yield Transcription Kit (Thermo Scientific) direkt weiterverarbeitet. Dabei wurden die Ansätze aufgrund der teilweise geringen Größe mindestens für vier Stunden bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die erhaltenen Produkte mit einem Monarch<sup>®</sup> RNA Clean up Kit (New England Biolabs) gereinigt und mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert. Die Konzentration der gereinigten RNA wurde mit einem Tecan Spark bei geeigneter Verdünnung bestimmt.

### 2.7.14 Fluoreszenzanisotropie

Zur Charakterisierung der Interaktion zwischen RNA und Aptamer wurden 5'-TAMRA markierte 04.17 und 53.19 Aptamere von IDT synthetisiert. Die Interaktionsmessungen wurden mit 4 nM RNA in Anisotropie-Puffer, der mit 100 µg ml<sup>-1</sup> BSA versetzt war, durchgeführt. Die RNA wurde mit ansteigenden Konzentrationen von PAL versetzt und die Anisotropie bei 22 °C in einem CLARIOstar (BMG labtech) Mikroplatten-Lesegerät unter Verwendung eines 540 nm Anregungs- und eines 590 nm Emissionsfilters bestimmt. Nach 30-sekündiger Beleuchtung mit Blaulicht bei 470 nm wurde die Anisotropie erneut gemessen. Die gewonnenen Daten wurden durch nichtlineare Regression an die Formel einer Bindungsisotherme ausgewertet (Gleichung 8):

$$r = r_0 + r_1 \cdot \left[ \frac{PAL}{[PAL] + K_D} \right] \quad (8)$$



Mit:

$r$  = Anisotropie des Messpunkts

$r_0$  = Anisotropie des ungebundenen Aptamers

$r_1$  = Anisotropie des gebundenen Aptamer

$k_D$  = Dissoziationskonstante

Um die Stöchiometrie der TAMRA-Aptamer:PAL Interaktion zu bestimmen, wurde eine hohe RNA Konzentration von 200 nM (weit über dem  $K_D$ ) gewählt und für verschiedene PAL Konzentrationen die Anisotropie gemessen, um den Sättigungspunkt zu bestimmen.

Die Kompetition der Aptamere um dieselbe Bindungstasche wurde nachgewiesen, indem zu einem bestehenden Verhältnis PAL:TAMRA-Aptamer von 2:1 (100 nM PAL und 50 nM Aptamer) steigende Konzentrationen einer nicht markierten Kompetitor RNA titriert und die Anisotropie im Dunkeln und nach Beleuchtung aufgenommen wurde. Anschließend wurde überprüft, ob die Abnahme der Verdrängung durch ein Modell der Bindestellenkompetition ausgedrückt werden kann (Gleichung 9):

$$r = r_0 + r_1 \cdot [\text{Aptamer}] / ([\text{Aptamer}] + [\text{Kompetitor}]) \quad (9)$$

Assoziationskinetiken wurden bei PAL Konzentrationen von 400, 600 und 1000 nM PAL und 4 nM Aptamer bestimmt. Dazu wurde die Änderung der Anisotropie nach Beleuchtung über die Zeit hinweg bis zur Sättigung aufgenommen und aus den gewonnenen Daten die Assoziationsgeschwindigkeitskonstante  $k_I$  bestimmt. Diese wurden gegen die Konzentration von PAL aufgetragen um  $k_{bi}$  zu erhalten. Die Dissoziationsrate konnte dann durch Multiplikation von  $k_{bi}$  und dem zuvor berechneten  $K_D$  erhalten werden.

Um die Interaktion der TAMRA-Aptamere mit dem EYFP-PAL Fusionsprotein zu bestimmen, wurden die Filtereinstellungen verändert, sodass die Fluoreszenz von EYFP nicht in den Kanal streuen konnte: Anregungswellenlänge: 590 nm; Emissionswellenlänge: 675 nm. Die Durchführung des Experiments wurde nicht verändert.

### 2.7.15 Elektronenspinresonanz-Spektroskopie

Die PAL-Variante C284A wurde wie der Wildtyp exprimiert, gereinigt und auf eine Konzentration von 45  $\mu$ M eingestellt. Nachdem initiale spektroskopische Untersuchungen nur eine geringe Populierung des NSQ Zustands nach Illumination aufzeigten, wurden 10 mM TCEP als Reduktionsmittel zugegeben. Zudem wurde ein System zum Abfangen von reaktiven Sauerstoff-Spezies eingesetzt (24).

Das so gewonnene Gemisch wurde in Kapillare überführt und 5 Minuten lang mit Blaulicht bei 450 nm und 30 mW beleuchtet, bevor es durch Überführung in stickstoffgekühlten Ethanol und anschließend in flüssigen Stickstoff schnell eingefroren wurde. Auf einem 9,7 GHz Bruker BioSpin Elexys E680 X-Band Spektrometer mit einer Bruker E580-400U Mikrowellen Quelle, einer Bruker Tera Spec pulsed X-Band Mikrowellenbrücke und einem Bruker ER 4118X-MD5 Resonator wurden X-Band Daten aufgenommen, wobei die benötigte Verstärkung der Mikrowellen für das gepulste Experiment durch eine Applied Systems Engineering 117X Wanderfeldröhre erreicht wurde (52). Eine Pulssequenz wie bei Martin *et al.* (53) mit einer Pulslänge von 32 ns bei -233 K wurde eingesetzt, wobei die Amplituden angepasst wurden (54). Die durch Tikhonov Regularisierung gewonnenen Abstandsdaten wurden als die Distanz zwischen den C4a Atomen des Flavins behandelt.

### 2.7.16 Gelfiltrationsanalyse

Zur Bestimmung der Größe und des Assoziationsgrades von Proteinen wurde eine Superdex 200 Increase Säule von GE Healthcare in Kombination mit einem ÄKTA System verwendet. Die Experimente wurden bei 4 °C in 1x SEC Puffer durchgeführt. Die gemessenen Retentionsvolumen wurden im Vergleich mit einer Standardgerade ausgewertet, die die Proteine Conalbumin (75 kDa), Ovalbumin (43 kDa) und Carboanhydrase (29kDa) für die Analyse von PAL Tetramer oder Conalbumin (75 kDa), Ovalbumin (43 kDa) und Ribonuklease A (13,9 kDa) für die Analyse von EYFP und EYFP-*nanobody* berücksichtigt. Durch *Blue Dextran* wurde das Ausschlussvolumen  $V_0$  der Säule bestimmt, das Säulenvolumen  $V_c$  betrug 24 ml.

Zusammen mit den Retentionsvolumina der Standardproteine konnten somit die  $K_{av}$  Werte erhalten werden, die zum Erstellen einer Standardgerade über den Logarithmus des Molekulargewichts aufgetragen wurden. Somit konnten aus den Retentionsvolumina der Proteinproben die Logarithmen der Molekulargewichte und anschließend die Größe der Proteine in Lösung berechnet werden.

### 2.7.17 Gelfiltration mit Vielwinkel-Lichtstreuung

Zur Analyse der absoluten Größen der Interaktionsspezies von EYFP und EYFP-*nanobody* wurde auf Gelfiltration in Kombination mit Vielwinkel-Lichtstreuung (Multi-Angle-Light-Scattering, MALS) zurückgegriffen. Die Proben wurden auf einer Superose 6 (GE Healthcare) Säule bei 22°C aufgetrennt und anschließend mit einem Dawn Heleos Gerät von Wyatt mittels eines Brechungsindex-Detektors (Waters) analysiert.

### 2.7.18 Fluoreszenzkreuzkorrelationsspektroskopie (FCCS)

Um die Interaktion von EYFP-PAL mit EYFP-*nanobody* und verschiedenen Polyaptameren zu detektieren wurde auf FCCS zurückgegriffen. 200  $\mu$ l einer 212 nM EYFP-PAL Lösung wurden mit verschiedenen *nanobody* und Aptamer Konzentrationen in eine 8-well Glasplatte (ibidi GmbH) gegeben und mit einem Konfokalmikroskop (Leica TCS SP5 II) lichtabhängig vermessen. Dabei wurde ein 514 nm Argon Laser bei einer Laserintensität von 10 % verwendet. Die Detektion des Fluoreszenzsignals erfolgte bei 535-585 nm. Dabei kam ein 50:50 Strahlteiler zum Einsatz, um Korrelationseffekte der Photodetektoren über die Berechnung der Kreuzkorrelationsfunktion auszugleichen. Fluktuationen der Fluoreszenzintensität wurden für jede Probe 15-25 Mal gemessen, dabei wurden Messzeiträume von 10 s gewählt (30 s für EYFP-PAL für eine vergleichbare Anzahl detektierter Photonen). Zur Erstellung der Kreuzkorrelationskurven wurden die Signale der beiden Detektoren miteinander um den Faktor  $\tau$  verschoben verglichen, dabei wird die Kreuzkorrelationsfunktion beschrieben als:

$$G(\tau) = 1 + \frac{\langle \delta I(t) * \delta I(t+\tau) \rangle}{\langle I(t) \rangle^2} \quad (10)$$

Mit  $\delta I(t)$  als der Abweichung von der Durchschnittsfluoreszenzintensität zum Zeitpunkt  $t$  und  $\delta I(t + \tau)$  der Abweichung von der Durchschnittsfluoreszenzintensität zum Zeitpunkt  $t + \tau$ .

Die Kreuzkorrelationskurven wurden erhalten indem  $G(\tau)$  als Funktion der Korrelationszeit  $\tau$  aufgetragen wurde. Zur Analyse der Anzahl der fluoreszierenden Partikel und ihrer charakteristischen Diffusionszeit werden die erhaltenen Kurven mit theoretisch berechneten Korrelationsfunktionen verschiedener Modellsysteme verglichen. Für die Messungen in dieser Arbeit eignete sich ein Modell, dass eine freie, dreidimensionale Diffusion zweier Komponenten beschreibt: einem schnellen Anteil, der den ungebundenen fluoreszierenden Molekülen charakterisiert, und einem langsamen, der den interagierenden Proteinen entspricht.

$$G(\tau) = \frac{\alpha}{N} * \frac{1}{1 + \frac{\tau}{\tau_{D,1}}} * \frac{1}{\sqrt{1 + \frac{\tau}{\kappa^2 \tau_{D,1}}}} + \frac{1-\alpha}{N} * \frac{1}{1 + \frac{\tau}{\tau_{D,2}}} + \frac{1}{\sqrt{1 + \frac{\tau}{\kappa^2 \tau_{D,2}}}} \quad (11)$$

Mit  $\kappa = 5$

$\tau_{D,1} = 0,1$  ms

$\tau_{D,2} = 1,0$  ms

$N$  = durchschnittliche Teilchenzahl im Konfokalvolumen

$\alpha$  = Fraktion der Teilchen mit schneller Diffusionszeit

$\tau_{D,1}$  konnte anhand Messungen des EYFP-PAL Systems ohne zusätzliche Faktoren bestimmt werden, da dieses hinreichend durch eine Einkomponenten-Beschreibung ausgedrückt wurde ( $\alpha > 95\%$ ).  $\tau_{D,2}$  wurde als maximal erreichbarer Wert der Diffusionskonstante festgelegt.  $\kappa$  als Faktor der Dimensionen des Konfokalvolumens wurde durch Kalibrierungsmessungen des Alexa 532 Fluorophors angenähert, das eine Diffusionskonstante von  $D \sim 550\text{-}650 \mu\text{m}^2/\text{s}$  aufweist.

### 2.7.19 Bakterieller Reporterassay für die Aktivität von PAL – 2 Plasmiensystem

Zum Test der Aktivität von PAL und PAL-Varianten wurde ein fluoreszenzbasiertes Reporter-system entwickelt. Im Verlauf der Etablierung wurde es zunächst im 5 ml Maßstab, später auf einer Deepwellplatte mit 300  $\mu\text{l}$  Kulturvolumen getestet. Für beide Systeme wurden *E. coli* cmpX13 Zellen mit dem, durch Arabinose induzierbaren, pCDF-PALopt Plasmid und dem IPTG induzierbaren pET-28c-DsRed-SP Reporterplasmid transformiert, wobei das Reporterplasmid eine abgewandelte Variante des 04.17 Aptamers vor der *Shine Dalgarno*-Sequenz trägt, um die Bindung an PAL zu gewährleisten.

Im Fall der 5 ml Kultur wurde am Vorabend eine Starterkultur aus einem Einzelkolonieausstrich in ein 14 ml Kulturröhrchen angeimpft und über Nacht bei 37 °C kultiviert. Am Folgetag wurde die optische Dichte bei 600 nm mit frischen LB Medium auf 0,5 eingestellt und die PAL Expression mit 1 mM Arabinose induziert.

4 ml der Kultur wurden für 2 Stunden im Dunkeln bei 37 °C und 600 rpm inkubiert bevor die Expression von DsRed durch Zugabe von 1 ml IPTG induziert wurde. Anschließend wurde die Kultur auf zwei frische Kulturröhrchen verteilt und 16 h bei 29 °C entweder im Dunkeln oder bei 100  $\mu\text{W}/\text{cm}^2$  470 nm Licht inkubiert. Nach der Inkubation wurde die optische Dichte bei 600 nm und die DsRed Fluoreszenz mit einem Tecan M200 Plattenlesegerät gemessen. Für die Messung wurde eine Anregungswellenlänge von 554 nm und eine Emissionswellenlänge von 591 nm gewählt. Dazu wurden die Kulturen in Millipore-Wasser entweder 5x (optische Dichte) oder 30x (Fluoreszenzmessung) verdünnt. Die Fluoreszenz wurde in einer Z-Position von 19651 und bei einer Verstärkung von 137 gemessen, die Anregung erfolgte bei einer Wellenlänge von 554 nm, die Emission wurde bei 591 nm gemessen. Die Auswertung erfolgte durch die Berechnung der relativen Fluoreszenz, also dem Verhältnis von DsRed Fluoreszenz zur optischen Dichte.

Für die Messung in 96 Deepwellplatten wurden Volumina und Lichtintensität angepasst, zudem wurden die Platten vor der Inkubation für 5 h mit 1 %-iger BSA Lösung beschichtet, um ungleichmäßiges Kulturwachstum zu vermeiden.

Aus den eingestellten Starterkulturen wurden 50  $\mu\text{l}$  entnommen und mit 700  $\mu\text{l}$  LB-Medium gemischt, das mit Kanamycin, Streptomycin und 1 mM Arabinose versetzt wurde. Anschließend erfolgte eine zweistündige Inkubation bei 37 °C und 600 rpm im Dunkeln, bevor je 297  $\mu\text{l}$  der Kulturen auf zwei neue Platten übertragen und mit 33  $\mu\text{l}$  LB mit 10 mM IPTG versetzt wurden (finale IPTG Konzentration 1 mM). Die Platten wurden 16 h bei 29 °C entweder im Dunkeln oder bei 40  $\mu\text{W}/\text{cm}^2$  470 nm Licht inkubiert. Fluoreszenz und optische Dichte wurden wie oben beschrieben gemessen.

### 2.7.20 Bakterieller Reporterassay für die Aktivität von PAL – 1 Plasmidsystem

Das Reportersystem wurde auf ein Plasmid verschlankt und mit konstitutiven Promotoren ausgestattet (Masterthesis Marc Juraschitz, Universität Bayreuth, 2019). Zum Testen der Aktivität von PAL und Aptamervarianten in diesem System wurden am Vortag Einzelkolonien in 5 ml LB mit 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Streptomycin angeimpft und für 20 h bei 37 °C unter 100  $\mu\text{W}/\text{cm}^2$  Blaulicht angezogen. Mit diesen Starterkulturen wurde anschließend eine BSA – behandelte (Vgl. 2.4.19) 96-Deepwellplatte inokuliert, indem zu 700  $\mu\text{l}$  Medium mit 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Streptomycin 50  $\mu\text{l}$  Bakterienkultur gegeben wurde. Die Platte wurde für zwei Stunden bei 37 °C unter 40  $\mu\text{W}/\text{cm}^2$  Blaulicht inkubiert, anschließend wurden je 300  $\mu\text{l}$  der Kultur auf zwei frische, ebenfalls beschichtete Platten aufgeteilt, von denen eine für 16 Stunden bei 29 °C im Dunkeln, die andere unter 40  $\mu\text{W}/\text{cm}^2$  Blaulicht inkubiert wurde. Am Folgetag wurden die Fluoreszenz und optische Dichte wie unter 2.6.19 beschrieben gemessen.

### 2.7.21 Western Blot zur Expressionsanalyse

Zur Überprüfung der Expression von PAL-Varianten im Assay-System wurden die Varianten mit einem C-terminalem Myc-tag versehen. Dieser kann durch einen spezifischen Western Blot nachgewiesen werden. Dazu wurden Proben von ca.  $0,5 \times 10^9$  Zellen aus den Assay Ansätzen gewonnen und, wie in 2.6.9 beschrieben, eine diskontinuierliche Polyacrylamidgelelektrophorese durchgeführt. Das Gel wurde anschließend zusammen mit Filterpapier und aktivierter PVDF-Membran für 15 Minuten in Western Blot Transferpuffer getränkt, bevor die Banden mittels *semi-dry-blotting* in einem Transblot Turbo Gerät von BioRad auf die Membran übertragen wurden. Dazu wurde eine Spannung von 25 V bei 1 A über 20 Minuten angelegt. Die Membran wurde anschließend für zwei Stunden in Blockierlösung inkubiert um unspezifische Wechselwirkungen zu vermeiden.

Die Membran wurde dreimal für 5 Minuten in TBS-Tween gewaschen, bevor sie mit Anti-*Myc* Antikörper für 16 Stunden bei 4 °C geschüttelt wurde. Anschließend wurde viermal mit TBS-Tween gewaschen bevor der sekundäre Antikörper, der mit Alkalischer Phosphatase gekoppelt ist, für 2 h bei Raumtemperatur und weitere 3 Stunden bei 4 °C mit der Membran inkubiert wurde. Nach erneutem 5-maligem Waschen wurde eine Färbelösung aus 50 µl 30 mg/ml Nitroblautetrazoliumchlorid in 70 % w/v Dimethylformamid und 50 µl 15 mg/ml 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl Phosphat in Dimethylformamid in 50 ml Alkalische Phosphatase-Entwicklungspuffer zur Membran gegeben und diese solange inkubiert, bis sich deutliche Banden entwickelten (ca. 5 Minuten).

### 2.7.22 qRT-PCR zur Assay-Analyse

Um Schwankungen in der mRNA Menge von DsRed im Assay zu detektieren, wurde quantitative reverse Transkriptions-PCR verwendet. Hierfür wurde zunächst aus den *E. coli* Kulturen der Assay-Ansätze eine definierte Menge an Zellen entnommen (auf OD normiert). Die Zellen wurden mithilfe von 212-300 nm Glaskügelchen (SIGMA # 1277) und 5-minütigem Vortexen aufgeschlossen und mithilfe des Quiagen RNeasy Kits wurde die RNA von Dunkel- und Lichtansätzen isoliert. Nach Konzentrationsbestimmung der RNA wurden die Ansätze mit DNase I behandelt, um Kontaminationen mit genomischer RNA auszuschließen. Maximal 1 µg RNA in 30 µl wurden mit 3 µl DNase I 10 x Puffer und 1 µl DNase I versetzt. Der Ansatz wurde für 1 h bei 37 °C und 600 rpm in einem Thermocycler inkubiert und anschließend durch Zugabe von 3 µl EDTA und Inkubation bei 65 °C für 10 Minuten inaktiviert.

Der Ansatz wurde auf 4 °C heruntergekühlt. Die RNA-Proben und der *Primer Mix* d(T)<sub>23</sub>VN wurden für die Reverse Transkription wie in Tabelle 8 angegeben gemischt.

**Tabelle 8: Komponenten der Reversen Transkriptionsreaktion - 1**

Substanz	Volumen [µl]
RNA	bis 1 µg
d(T) <sub>23</sub> VN (50 µM)	2
10 mM dNTP	1
MgCl <sub>2</sub>	1
Nuclease-freies H <sub>2</sub> O	auf 10

In einem ersten Schritt wurden die RNA und die Primer für 5 Minuten bei 65 °C denaturiert, anschließend wurde der Ansatz kurz zentrifugiert und wieder auf 4 °C heruntergekühlt. Die folgenden Komponenten wurden auf Eis hinzu pipettiert (Tabelle 9):

**Tabelle 9: Komponenten der Reversen Transkriptionsreaktion - 2**

Substanz	Volumen [ $\mu$ l]
10X M-MuLV Puffer	2
M-MuLV RT (200 U/ $\mu$ l)	1
Nuclease-freies H <sub>2</sub> O	7

Die Reaktion wurde zunächst für 5 Minuten bei 25 °C und anschließend für eine Stunde bei 42 °C inkubiert, anschließend wurde das Enzym durch Inkubation bei 65 °C für 20 Minuten inaktiviert. Die so gewonnene cDNA konnte für die qPCR eingesetzt werden. Dazu wurden Primer für DsRed und das Referenzgen rnpB (55) eingesetzt.

DsRed

FW 5'- CCG ACT ACA AGA AGC TGT C -3'

RV 5'- GTA GAT GAA GGT GCC GTC CTG -3'

rnpB

fw: 5'- CGG GCG GAG GGG AGG AAA G -3'

rv: 5'- ATC GGC GGT TTG CTC TCT GTT G -3'

Die gewonnene cDNA wurde gemäß der Herstellerangaben des verwendeten Kits von Jena Biosciences (Tabelle 10) für eine q-PCR eingesetzt, dabei wurde das Tabelle 11 spezifizierte Protokoll verwendet, um die Amplifikation der Zielsequenzen zu verfolgen.

**Tabelle 10: Zusammensetzung der q-PCR Ansätze**

Substanz	Volumen [ $\mu$ l]
2x qPCR S'Green BlueMix	10
Forward Primer (10 $\mu$ M)	2
Reverse Primer (10 $\mu$ M)	2
Template	< 5 ng/ $\mu$ l
Nuclease-freies H <sub>2</sub> O	auf 20

Für Kontrollreaktionen wurde entweder RNA aus der Isolation (NRT) oder die gleiche Menge Wasser (NT) eingesetzt.

**Tabelle 11: Protokoll der q-PCR-Reaktion**

Bezeichnung	Temperatur [°C]	Zeit [s]	Zyklenanzahl
Initiale Denaturierung	95	120	1
Denaturierung	95	15	40
Anlagerung und Elongation	60	30	
Messung der Fluoreszenz	60	-	
Schmelzkurve	72 → 95	600	1

Indem die Ct-Werte der Proben im Dunkeln und im Licht mit der jeweiligen Referenz verrechnet wurden, konnte die relative Änderung der Expression im Licht im Vergleich zur Dunkelprobe bestimmt werden.

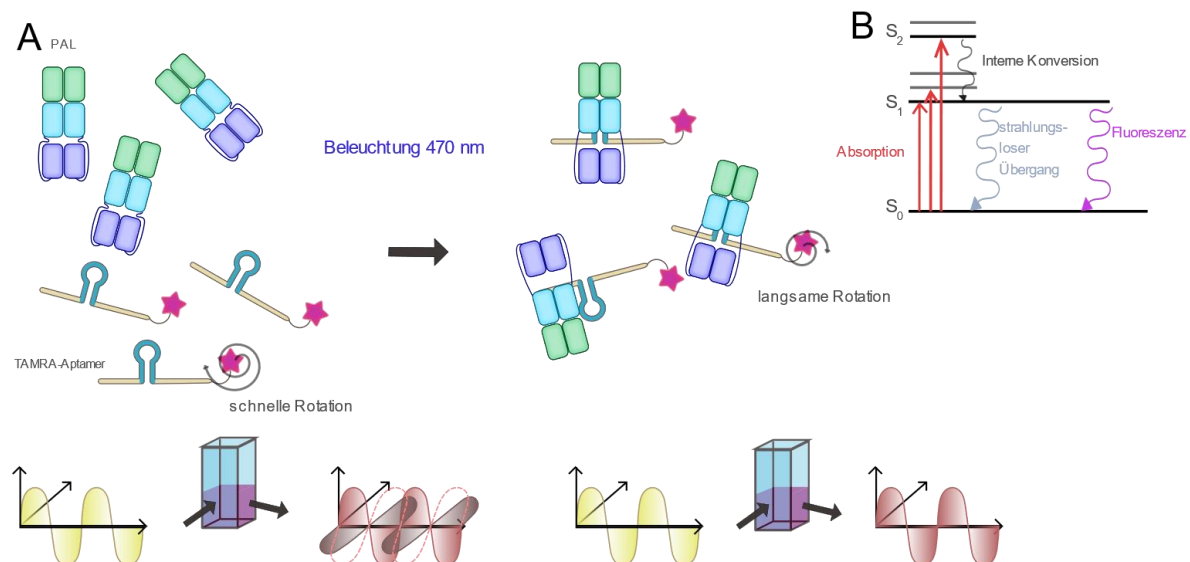


## 3. Ergebnisse

### 3.1 Analyse der Interaktion zwischen PAL und den selektierten Aptameren

Im ersten Teil dieser Arbeit soll die Interaktion zwischen PAL und beiden RNA-Aptameren 04.17 und 53.19 quantitativ ausgewertet werden. Zum einen dient dies dem Verständnis der Stärke der Bindung und der Dynamik der Schaltbarkeit des Systems und zum anderen zum Definieren der Unterschiede der Interaktion mit den zwei Haarnadelstrukturen.

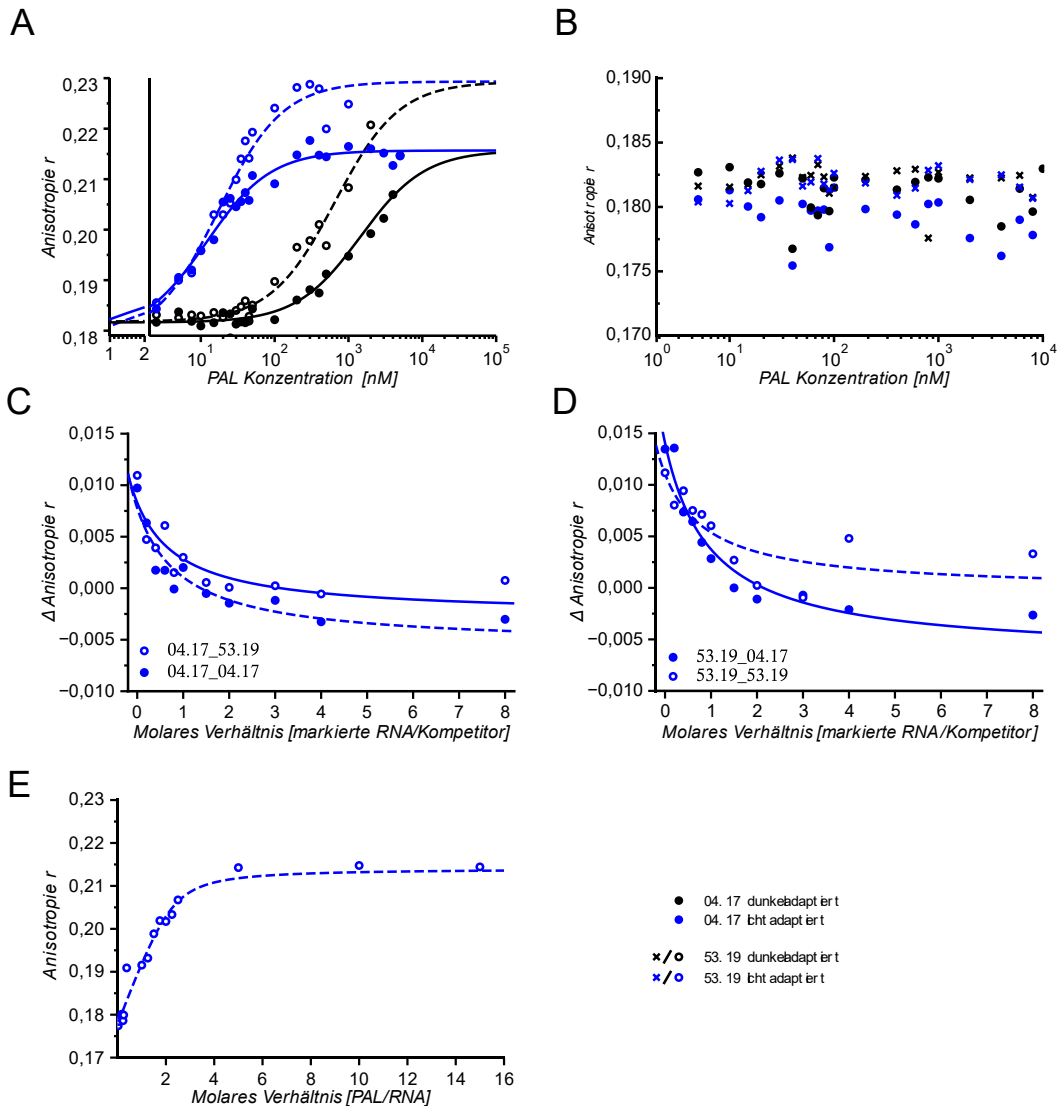
Um die Interaktion der RNA-Aptamere mit PAL zu quantifizieren, wurde Fluoreszenzanisotropie eingesetzt. Die Messung beruht darauf, dass die Lebensdauer des angeregten Zustands groß oder ungefähr gleichzusetzen ist mit der Rotationsgeschwindigkeit des Proteins. Nach der Beleuchtung einer fluoreszierenden Substanz mit der Anregungswellenlänge wird ein angeregter elektronischer Zustand  $S_1$  populiert, der eine gewissen Lebensdauer hat, bevor er unter anderem durch Abgabe von Fluoreszenz zurück in den Grundzustand  $S_0$  relaxiert (Abbildung 11B).



**Abbildung 11 Prinzip der Anisotropie Messung:** Linear polarisiertes Licht wird auf die Mischung aus TAMRA-markierter RNA und PAL gestrahlt. Durch die schnelle Rotation der RNA-Aptamere im Dunkeln nimmt die Polarisation des Lichts durch die Anregung von Fluoreszenz ab. Durch Beleuchtung mit Blaulicht wird die Aptamer-PAL Bindung induziert, was zu einer Verlangsamung der Rotation der Partikel und höherer Anisotropie des fluoreszierten Lichts führt (A). Fluoreszenz entsteht durch die Anregung von energiereichen elektronischen Zuständen, die durch interne Konversion auf den  $S_1$  Zustand relaxieren. Von dort aus können sie unter anderem durch strahlungslosen Übergang zurück in den Grundzustand fallen, oder aber sie geben die zugeführte Energie unter Fluoreszenzentwicklung ab.

Wird in eine Richtung polarisiertes Licht auf die fluoreszierende Probe gestrahlt, ist die abgegebene Fluoreszenz in diese Richtung weniger polarisiert. Das Teilchen hat während der Lebensdauer des angeregten Zustands seine Ausrichtung gegenüber der Anregungsorientierung verändert. Die Fluoreszenzemission ist daher anisotrop, weist also, im Gegensatz zur Anregungswellenlänge, unterschiedliche Anteile von vertikal und horizontal polarisiertem Licht auf.

Die gemessene Anisotropie hängt von der Geschwindigkeit der Rotation und damit der Größe des beobachteten Teilchens ab (Abbildung 11A). Untersucht wurde zunächst die Interaktion der Tetramethylrhodamin- (TAMRA-) markierten RNA-Aptamere mit PAL bei konstanter Aptamer- und steigender Proteinkonzentration. Unter Lichtausschluss zeigte sich für beide Aptamere nur eine geringe Bindung (Abbildung 12A). Die berechneten  $K_D$ -Werte lagen über  $1,5 \mu\text{M}$  und konnten durch Anpassung der Messdaten an eine Bindungsisotherme nicht absolut bestimmt werden, da die einsetzbare Menge des PAL-Proteins beschränkt war. Nach Beleuchtung der Proben zeigte sich auch bei geringen PAL-Konzentrationen ein starker Anstieg der Anisotropie (Abbildung 12A), Dissoziationskonstanten von  $12 \pm 1 \text{ nM}$  für Motiv 04.17 und  $17 \pm 2 \text{ nM}$  für Motiv 53.19 wurden bestimmt. Die gemessenen Anisotropie-Werte für Motiv 53.19 waren höher, was entweder den Größenunterschied der Aptamere oder durch eine geringere Beweglichkeit des Fluorophors im Protein-RNA-Komplex erklärt werden kann. Motiv 53.19 besitzt außerdem eine höhere Affinität für PAL im dunkeladaptierten Zustand als Motiv 04.17, was zu einer insgesamt verringerten Schaltbarkeit führt. Diese höhere Bindungsrate im Dunkeln korreliert mit den härteren Selektions- und Waschbedingungen in späteren SELEX-Zyklen, insbesondere mit den verlängerten Dunkelaktionen. Vermutlich wurden dadurch auch Aptamere, die ohne Beleuchtung eine Affinität für PAL aufweisen in den Ansätzen angereichert. Es ist also möglich durch Variation der Selektionsbedingungen Aptamere mit unterschiedlichen Bindungseigenschaften zu erhalten. Wie ein Kontrollexperiment zeigt, interagierten die TAMRA-markierten DNA-Haarnadelstrukturen derselben Sequenz überhaupt nicht mit PAL, was die RNA-Spezifität von PAL verifiziert. Für spätere Anwendungen kann der *crossstalk* zwischen kodierender DNA-Sequenz und Ziel RNA-Sequenz somit ausgeschlossen werden. Zudem wird so die unspezifische Interaktion zwischen PAL und dem TAMRA-Fluoreszenzmarker widerlegt (Abbildung 12B). Anschließend wurde überprüft, ob die unterschiedlichen Bindungseigenschaften der Aptamere sich auch durch Wechselwirkung mit unterschiedlichen Bindestellen an der PAL-Oberfläche erklären lassen. Zu einem konstanten Verhältnis von markiertem Aptamer zu PAL wurden ansteigende Konzentrationen der unmarkierten Aptamere titriert. Die Anisotropie im dunkeladaptierten und lichtadaptierten Zustand wurde gemessen. Es zeigte sich, dass beide Aptamere sich sowohl selbst als auch gegenseitig aus dem Komplex mit PAL verdrängen konnten (Abbildung 12 C und D).



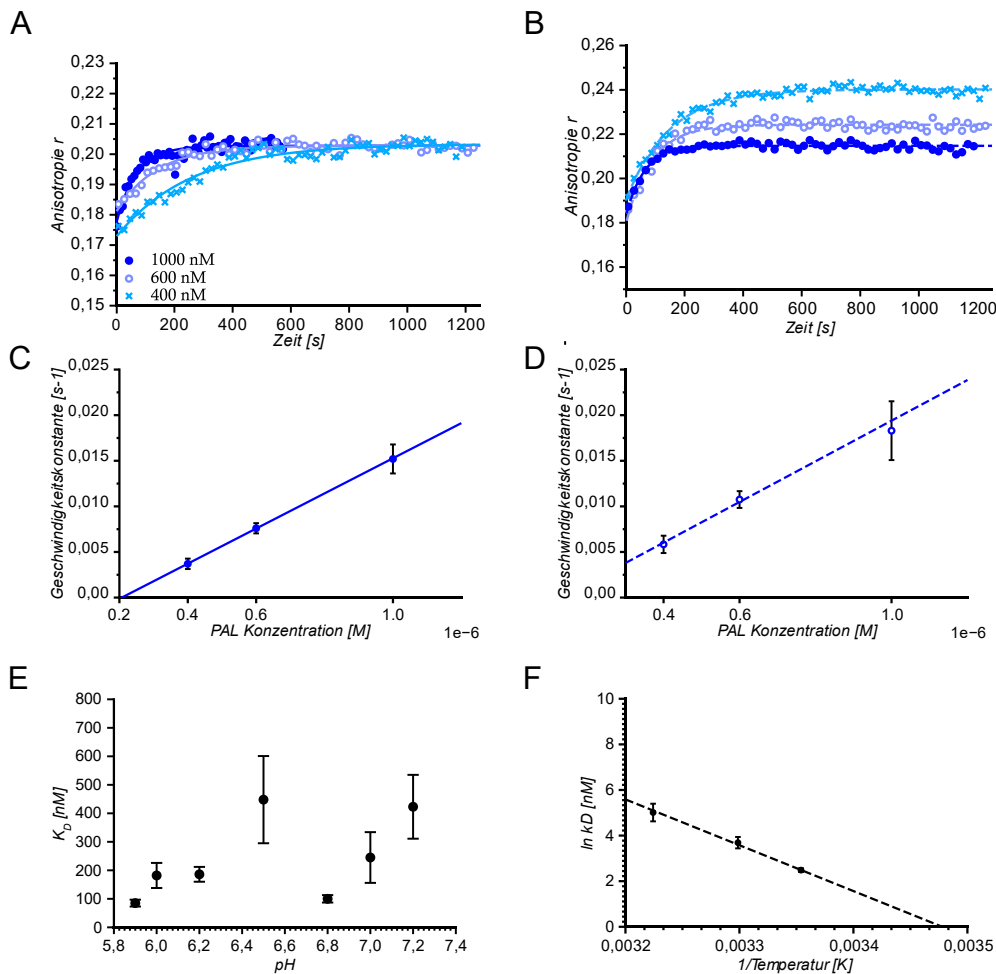
**Abbildung 12 PAL-Aptamer Interaktion - Dissoziationskonstanten, Konkurrenz und Stöchiometrie:** Die lichtabhängige Änderung der Anisotropie nach Beleuchtung (blau) für die Interaktion von RNA-Aptameren (A) und DNA-Aptameren (B) mit PAL im Vergleich zur Dunkelmessung (schwarz) wird dargestellt. Die Grafiken C und D zeigen die Änderung der Anisotropie im Licht bei zunehmender Konzentration von unmarkierten Konkurrenz-Aptameren sowohl für markiertes 04.17 als auch für markiertes 53.19 Aptamer. Durch Titration von PAL zu einer Aptamerkonzentration von Motiv 53.19 von 200 nM kann anhand der Sättigung der Anisotropie die Stöchiometrie der Interaktion von PAL und den Aptameren bestimmt werden (E).

Somit ist davon auszugehen, dass die Interaktionsoberfläche der beiden Aptamere zumindest überlappt oder identisch ist. Die Stöchiometrie der Interaktion wurde bestimmt, indem Bindungsisothermen im Licht bei Aptamer-Konzentrationen von 200 nM, also weit über dem  $K_D$ -Wert, aufgenommen wurden (Abbildung 12E). Die Messung zeigte eine Sättigung der Anisotropie bei einem molaren Verhältnis von PAL zu RNA von 2 zu 1, was einer Interaktion von einem Aptamer pro PAL-Dimer entspricht. Die homodimere Struktur von PAL bedingt also nicht eine Bindung von zwei Aptameren.

Es ist denkbar, dass erst die Interaktion der zwei PAL-Monomere die benötigte Interaktionsoberfläche bereitstellt. Ebenso vorstellbar ist jedoch das Maskieren einer möglichen zweiten Interaktionsfläche durch das Binden eines ersten Aptamers.

Um das unterschiedliche Interaktionsverhalten der Aptamere weiter zu charakterisieren, wurden Interaktionskinetiken bei verschiedenen PAL-Konzentrationen aufgenommen (Abbildung 13A (04.17) und B (53.19)). Durch lineare Auftragung der Anfangsgeschwindigkeiten bei den jeweiligen Konzentrationen konnten die bimolekularen Assoziationsraten für 04.17 mit  $2,0 \pm 0,1 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  und 53.19 mit  $2,2 \pm 0,2 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  bestimmt werden, die sich kaum unterscheiden (Abbildung 13C (04.17) und D (53.19)). Unter Einbeziehung der zuvor berechneten Dissoziationskonstanten ergeben sich Dissoziationsraten von  $2,4 \pm 0,2 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  für Motiv 04.17 und  $3,8 \pm 0,6 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  für Motiv 53.19. Diese unterscheiden sich signifikant und erklären die gemessenen Unterschiede der Aptamer-PAL-Interaktionen. Die pH- und Temperaturabhängigkeit der PAL-RNA-Interaktion wurden anhand des 04.17 Motivs analysiert (Abbildung 13E und F). Dabei korrelierte die Stärke der Interaktion mit dem pH-Wert, bei sinkendem pH-Wert verringerten sich auch die Dissoziationskonstanten. Hierbei ist anzumerken, dass die geringe gemessene Interaktion bei einem pH von 6,5 mit dem isoelektrischen Punkt zusammenfällt und vermutlich mit Löslichkeitsproblemen des Proteins zusammenhängt. Die gemessenen  $K_D$ -Werte sind höher als die in den Interaktionsstudien bestimmten Größen, da in dieser Studie zugunsten eines möglichst einfachen Puffersystems auf die Zugabe von Magnesiumchlorid verzichtet wurde, was nicht physiologischen Bedingungen entspricht.

Zusätzlich beeinflusst die Temperatur die Interaktion von PAL und den Aptameren. Messungen bei höheren Temperaturen ergaben höhere Dissoziationskonstanten, was sich durch die Interaktionsenthalpie ausdrücken lässt. Durch die lineare Auftragung der Konstanten nach van't Hoff (Abbildung 13F) wurde diese als  $-167 \pm 9 \text{ kJ/mol}$  bestimmt. Sowohl die pH- als auch die Temperatursensitivität der Wechselwirkung kann durch die LOV-Domäne vermittelt werden, wie in der Vergangenheit gezeigt wurde (30; 56). Aber auch ein direkter Einfluss auf die ANTAR-Domäne kann nicht ausgeschlossen werden.



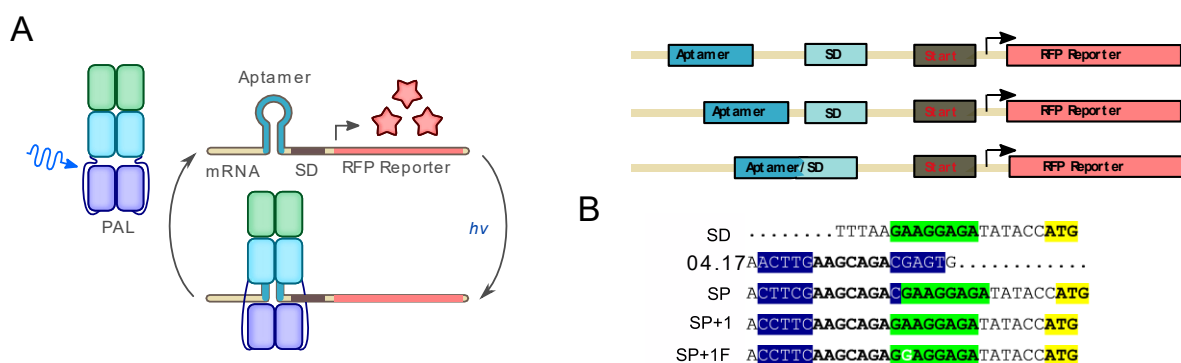
**Abbildung 13 PAL Aptamer Interaktion - Kinetik, pH- und Temperaturabhängigkeit:** Die Entwicklung der Anisotropie der Interaktion im Licht von TAMRA markierten Aptameren mit den aufgeführten PAL Konzentrationen (A (04.17) und B (53.19)). Aus den Startgeschwindigkeiten dieser Kinetiken ergeben sich die in C (04.17) und D (53.19) dargestellten linearen Auftragnungen, aus denen die bimolekularen Assoziationsraten berechnet wurden. E) Die gemessenen Dissoziationskonstanten in Abhängigkeit vom pH Wert, wobei zu beachten ist, dass diese Messungen in 50 mM Phosphatpuffer mit 100 mM NaCl durchgeführt wurde, um die gewünschten pH Werte einstellen zu können (Vergleich: Phosphatpuffer für die Fluoreszenzanisotropie). F) Die van't-Hoff-Auftragung der Temperaturabhängigkeit der Dissoziationskonstanten wurde für die Berechnung der Interaktionsenthalpie herangezogen.

Zusammenfassend bindet PAL spezifisch und kompetitiv an die zwei entwickelten RNA-Aptamere 04.17 und 53.19, wobei eine 100-fache lichtabhängige Steigerung der Affinität festgestellt wurde. Die unterschiedlichen Affinitäten der beiden Aptamere sind vor allem von der Dissoziationsrate und nicht von der Assoziationsrate beeinflusst. Pro Proteindimer wird ein Aptamer gebunden, wobei die zwei Aptamere 04.17 und 53.19 überlappende oder identische Bindungsstellen besetzen. Vor allem der hohe Dynamikbereich der Interaktion ist eine gute Voraussetzung für die spätere Anwendung des Proteins in verschiedenen Systemen, die pH- und Temperaturabhängigkeit der Interaktion kann die hohe Schaltbarkeit in der Anwendung jedoch negativ beeinflussen.

### 3.2 Etablierung eines bakteriellen Reportersystems und Struktur-Funktionsanalyse von PAL

Wie zuvor berichtet ist die Domänenanordnung des PAL-Proteins insofern ungewöhnlich, als dass die LOV-Domäne am C-Terminus des Proteins lokalisiert ist (44; 57). Da in den meisten bekannten LOV-Domänen die Signalweiterleitung von der C-terminalen  $\alpha$ -Helix vermittelt wird, war der Modus der Signalweiterleitung zunächst unklar. Die Kristallstruktur (Vergleich Abbildung 5) zeigt eine durch den langen Linker umgekehrte LOV-Domäne und direkt mit der ANTAR-Domäne interagierende  $\alpha$ -Helix. Mutationsstudien sollten eine Signalweiterleitung von der lichtsensitiven LOV-Domäne zur ANTAR Domäne genauer charakterisieren. Da eine Reinigung und *in vitro* Charakterisierung aller relevanten Mutanten äußerst aufwändig wäre, wurde ein *E. coli* basiertes Reportersystem entwickelt. Dieses kann genutzt werden um eine große Anzahl von PAL-Varianten in kurzer Zeit zu testen; gleichzeitig demonstriert es die Übertragbarkeit der PAL-RNA-Interaktion in ein heterologes System.

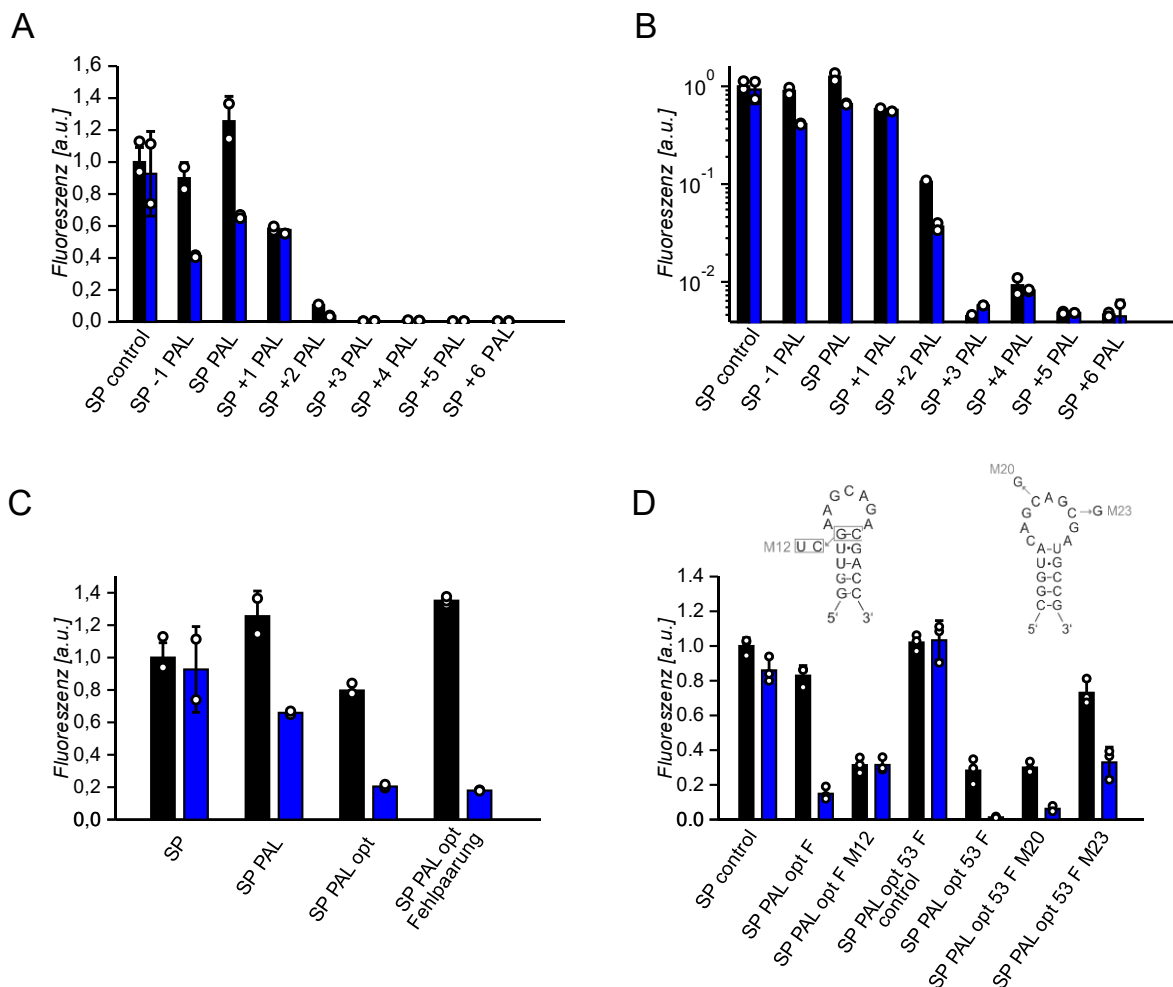
Das Reportersystem basiert auf der Messung der Konzentration des rot fluoreszierenden Proteins DsRed, dessen Expression durch PAL lichtabhängig reguliert wird. Dabei ermöglicht das fluoreszierende Reporterprotein eine einfache und schnelle Quantifizierung der Expression. Der Aufbau des Reportersystems wurde dem Mechanismus des mRNA-bindenden Proteins CsrA aus *E. coli* nachempfunden, das durch Bindung an die *Shine-Dalgarno*-Sequenz der mRNA die Translation und damit die Expression seines Zielgens reguliert (58).



**Abbildung 14 Aufbau des PAL-Reporterassays:** A) Schematischer Überblick über den Reporterassay. Die Expression des rot-fluoreszierenden Reporterproteins wird durch Ausbildung einer Haarnadelschleifen-Struktur und lichtabhängige Interaktion mit PAL reprimiert indem das 04.17 Aptamer vor oder überlappend mit der Shine-Dalgarno-Sequenz kloniert wurde. B) Der schematische Aufbau des Reporterkonstrukts und die DNA-Sequenzen von Shine-Dalgarno-Sequenz, des 04.17 Aptamers, des original eingesetzten Shine-PALgarno Konstrukts und den optimierten Varianten, wobei F für die eingeführte Fehlpaarung im Aptamer-Stamm steht.

Zunächst wurde das System auf zwei separaten, induzierbaren Plasmiden realisiert, von denen eines für das Arabinose-induzierbare PAL-Protein, das andere für das IPTG-induzierbare Reporterprotein kodierte.

Indem die Haarnadel-Struktur des Aptamers direkt vor oder im Stamm überlappend mit der *Shine-Dalgarno*-Sequenz des Reportergens positioniert wurde (Abbildung 14), konnte bei drei Positionen eine lichtabhängige Reduktion der Expression erreicht werden (Abbildung 15 A,B, Konstrukte SP, SP-1, SP +2). Auffällig ist die starke Abnahme der Fluoreszenz bei Konstrukten, in denen das Aptamer weit mit der *Shine-Dalgarno*-Sequenz überlappt. Hier reduziert die Manipulation der Ribosomenbindestelle die Expression von DsRed so stark, dass keine Lichtschaltbarkeit mehr messbar ist. Als Negativkontrolle für den Assay wurde ein Leervektor, der nicht für PAL kodiert, verwendet.



**Abbildung 15 Erstellung und Optimierung des bakteriellen Reporterassays:** Die relative DsRed-Fluoreszenz von *E. coli* Kulturen nach 16-stündiger Inkubation im Dunkeln (schwarz) oder unter Blaulichtbestrahlung (450 nm,  $40 \mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$ , blau). A und B zeigen die Fluoreszenz der Konstrukte für verschiedene Positionen des Aptamers in Relation zur SD Sequenz von DsRed, in B wurde eine logarithmische Darstellung gewählt um die gering fluoreszierenden Konstrukte besser darstellen zu können. C zeigt die Optimierung des Systems durch das Einführen der codonoptimierten PAL-Variante und einer Fehlpaarung in der Haarnadelschleifen-Struktur des Aptamers (Vgl.: Abbildung 14). In D ist die Analyse weiterer Aptamer Varianten im Optimierten Assay-Kontext gezeigt. Die verwendeten 04.17 (links) und 53.19 (rechts) Aptamere sind im oberen Bereich des Panels abgebildet. Als Kontrollkonstrukte dienen jeweils Systeme die ein Plasmid, das nicht für das PAL-Protein kodiert, enthalten.

Das System wies zunächst nur eine zweifache Reduktion der Fluoreszenz durch Beleuchtung auf, weshalb das Aptamerkonstrukt weiter optimiert wurde. Das Einführen einer für *E. coli* codonangepassten Gensequenz für PAL führte zu einer Fluoreszenzreduktion im dunkel- und lichtadaptierten Zustand verbunden mit einer Steigerung der Schaltbarkeit. Dies ist auf die gesteigerte Expression von PAL zurückzuführen (Abbildung 16). Die Dunkelfluoreszenz konnte durch das Einbringen einer Fehlpaarung im Stamm des Aptamers wieder erhöht werden, was in einer ungefähr 10-fachen lichtabhängigen Fluoreszenzreduktion des Systems resultierte (Abbildung 15C). Dass die Fehlpaarung im Stamm die Interaktion im Dunkeln verringert, wurde auch in *in vitro* Analysen der Interaktion von Aptamervarianten mit PAL beobachtet (44). Vermutlich ist der Effekt auf die Destabilisierung der RNA-Haarnadelstruktur im Dunkeln zurückzuführen. Die weniger stabile Struktur sorgt für eine bessere Erkennung der Ribosomenbindestelle im Dunkeln und verringert die Bindung an das dunkeladaptierte PAL, sodass eine höhere Expression erreicht wird. Die aktivierte PAL-Variante bindet dennoch mit hoher Affinität an die, durch die Interaktion mit PAL stabilisierte Haarnadelstruktur, sodass eine hohe Schaltbarkeit erreicht wird.

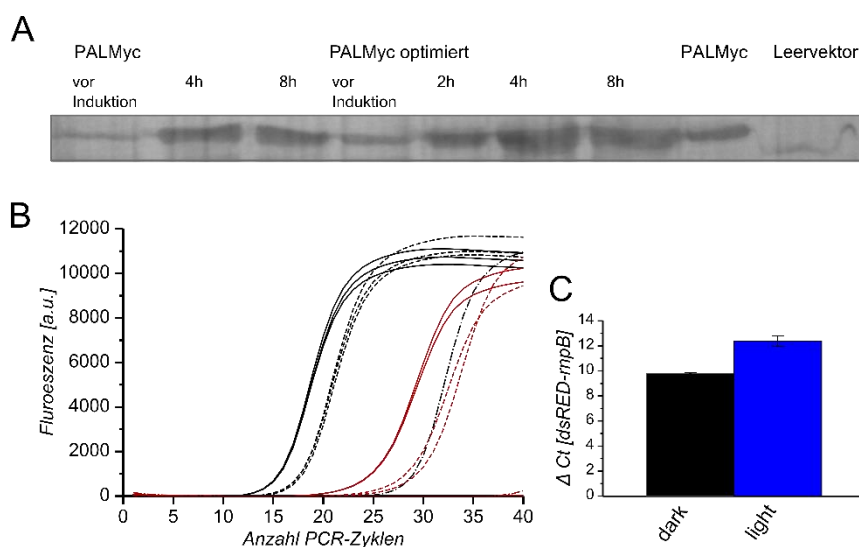
Weitere Variationen des Systems durch das Einbringen von Aptamer-Varianten, die in *in vitro* Experimenten ebenfalls eine hohe Schaltbarkeit aufwiesen, führten zu keiner weiteren Verbesserung des Systems (Abbildung 15D), einbringen einer Mutation in das 04.17 Aptamer unterband sogar die Lichtantwort. Dies zeigt auf, dass *in vitro* gewonnene Daten nicht direkt in zellulären Kontexten anwendbar sind. Es steht zu vermuten, dass die Sekundärstruktur der M12-Aptamervariante die Translation des Reportergens stark einschränkt.

Verwenden des 53.19-Aptamers resultierte in einem schaltbaren System, dieses wies jedoch im Vergleich zum 04.17-Aptamer eine geringere Fluoreszenz auf, was vermutlich auf eine hohe Bindung des PAL-Proteins an die Aptamersequenz auch im Dunkeln zurückzuführen ist. Diese konnte durch Einführen von Punktmutationen in die Aptamersequenz verringert werden, was an den steigenden Fluoreszenzwerten für die Varianten M20 und M23 zu sehen ist. Gleichzeitig verringerte sich jedoch auch die Schaltbarkeit des Systems. Es zeigt sich deutlich, dass die gewonnenen *in vitro* Daten nicht direkt auf die Anwendung übertragbar sind. Dafür verantwortlich sind wahrscheinlich die Wechselwirkung zwischen dem Aptamer und der RNA-Sequenz in die es integriert wird, die in den *in vitro* Experimenten nicht zum Tragen kommt. Auch die Stabilität der Haarnadelstruktur der verwendeten Aptamere dürfte für die Effizienz des Systems entscheidend sein. Wenn die ursprüngliche Funktion der modifizierten RNA durch diese beeinträchtigt wird, verringert sich die Schaltbarkeit der Lichtregulation.



Es wurde argumentiert, dass das 04.17 basierte System durch die insgesamt höhere Fluoreszenz für eine differenzierte Analyse besser geeignet ist, weshalb die weiteren Experimente in diesem System durchgeführt wurden.

Das Durchführen eines *Western-Blots* für den C-terminalen *Myc-tag* des PAL-Konstrukts erlaubte einen Nachweis der Expression (Abbildung 16A) der verwendeten Konstrukte. Es ist zu erkennen, dass sowohl das ursprüngliche als auch das codonoptimierte Konstrukt auch vor der Induktion exprimieren. Eine starke Steigerung der Expression in den ersten vier Stunden nach Induktion ist jedoch nachweisbar. Das optimierte Konstrukt weist eine höhere Expression, aber auch eine größere Durchlässigkeit auf.



**Abbildung 16 Analyse des bakteriellen Reporterassays:** A zeigt die durch alkalische Phosphatase-Reaktion gefärbten Banden eines Western-Blots gegen den C-terminalen Myc-tag des PAL Konstrukts. Die Amplifikationskurven eines qPCR Ansatzes für DsRed (rot) und das Referenzgen rnpB (schwarz) im Dunkeln (durchgezogene Linien), nach Blaulichtbestrahlung (durchbrochene Linien) und der NRT Kontrollen (punktstrich Linien) werden in B gezeigt, C zeigt die quantitative Auswertung der mRNA Konzentration von DsRed in Relation zum Referenzgen rnpB im Dunkeln und im Licht für zwei unterschiedliche Assay-Ansätze.

Die Designstrategie des Assays legt eine Regulation des Reportergens auf der Translationsebene, vermittelt durch die lichtabhängige Interaktion zwischen PAL und RNA, nahe. Um diesen Regulationsmechanismus zu untersuchen, wurde die mRNA-Menge des Reportergens im dunkel- und lichtadaptierten Zustand mittels qRT-PCR quantifiziert. Im Falle einer reinen translationalen Regulation sollte die Menge der mRNA über beide Bedingungen hinweg konstant bleiben. Für die Experimente wurde RNA aus *E. coli*-Kulturen extrahiert, deren Fluoreszenzverhalten zuvor im Rahmen des Reporterassays untersucht wurde, wo sie einen zehnfachen Unterschied zwischen der Reportergenexpression im Dunkeln und im Licht zeigten. Dieselben Kulturen wurden für die *Western-Blot* Analyse verwendet. Die Amplifikationskurven der Proben zeigen, dass auch die Gesamt-mRNA Menge des Referenzgens im lichtadaptierten System geringer war (Abbildung 16B).

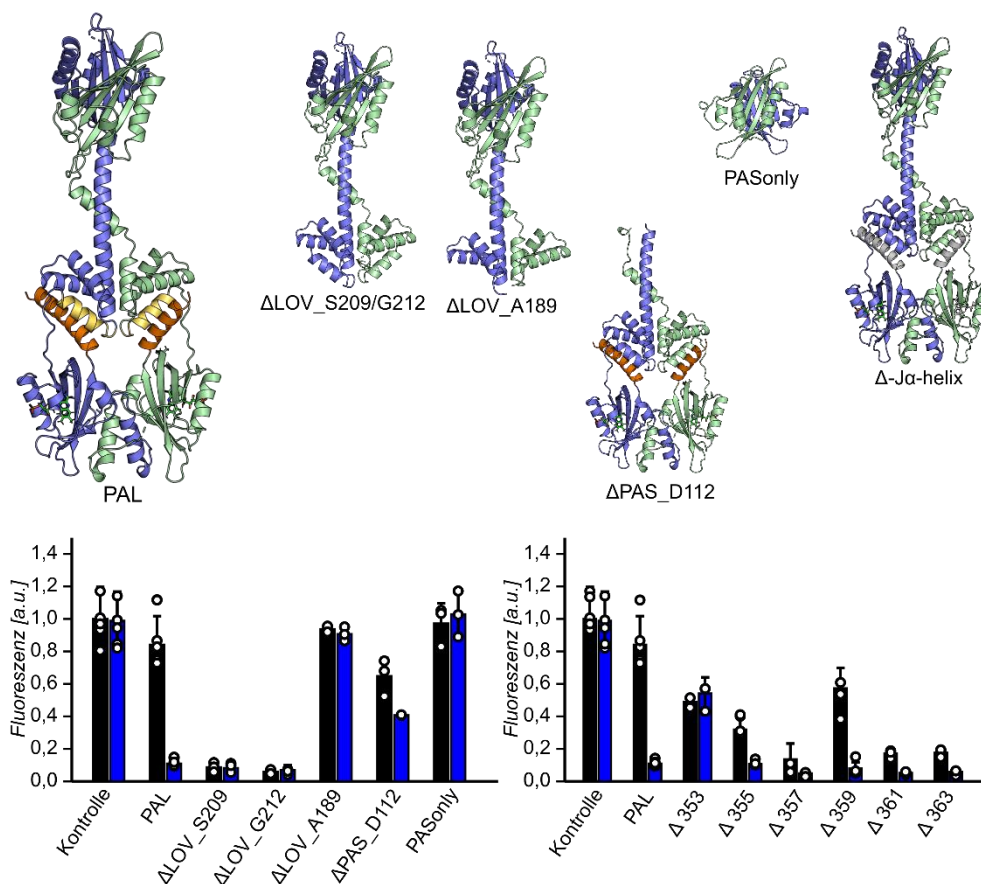
Durch Normierung der Ct-Werte (Abbildung 16C) ist zu erkennen, dass der Unterschied zwischen der RNA Konzentration von DsRed und des Referenzgens im lichtadaptierten Zustand höher ist. Das belegt eine im Vergleich zum Referenzgen spätere Amplifikation der DNA im PCR-Ansatz, also eine geringere DsRed-mRNA-Menge in der Ausgangsprobe. Dieses Ergebnis würde einer rein translationalen Regulation widersprechen. Da in *E. coli* jedoch Transkription und Translation räumlich nicht klar voneinander getrennt sind, kann ein Einfluss einer gehemmten Translation auf die Transkription nicht ausgeschlossen werden. Nur eine konstante mRNA Menge im Dunkeln und im Licht hätte hier eine klare Aussage ermöglicht.

Da der Unterschied der mRNA-Level jedoch nicht sehr ausgeprägt ist, ist es unwahrscheinlich, dass die 10-fache Regulation des Systems allein darin begründet liegt, sodass von einer zumindest teilweise translationalen Regulation ausgegangen werden kann. Die Interaktion von PAL mit seiner RNA kann auch einen Einfluss auf die Stabilität des RNA-Spezies in der Zelle haben, was sich unabhängig von transkriptionellen Effekten ebenfalls auf die isolierte mRNA-Menge auswirken kann.

Während rein transkriptionell vermittelte Regulationssysteme häufig eine sehr hohe Schaltbarkeit aufweisen, ist das PAL-basierte System mit anderen RNA-basierten Schaltern zur Kontrolle der Proteinexpression, den sogenannten *riboswitches*, durchaus vergleichbar (59; 60; 61). Diese weisen ebenfalls Dynamikbereiche zwischen zwei und zehnfach auf, die je nach verwendetem Promotor und Sequenzhintergrund variieren können. Sie unterscheiden sich vom PAL-basierten System vor allem dahingehend, dass keine Proteine, sondern kleine Metabolite wie beispielsweise Riboflavin oder Lysin als Liganden auf RNA-Aptamere wirken.

Die PAL-vermittelte Regulation der Reporterexpression durch Blaulicht bildete die Grundlage für die durchgeführte Mutationsstudie. Dabei sollten zunächst die einzelnen Domänen in ihrer Funktion bestätigt werden. Das heißt zum einen sollte die Implementierung der Lichtschaltbarkeit durch die LOV-Domäne, zum anderen die Bindung der RNA durch die ANTAR-Domäne untersucht werden. Da das Aptamer keine natürliche Zielsequenz des Proteins ist, könnten im Verlauf des SELEX-Verfahrens theoretisch auch andere Interaktionsoberflächen selektiert worden sein. Zusätzlich wurde bisher vermutet, dass die PAS-Domäne für die Stabilisierung der Proteinstruktur und die effiziente Dimerisierung eine Rolle spielt, sie könnte aber auch relevant für die lichtabhängige Funktion von PAL sein. Daher wurden zunächst Deletionsvarianten des PAL-Proteins im Assay Kontext erstellt, um die Funktion der einzelnen Strukturbereiche zu definieren (Abbildung 17).

Die Deletion des Adapters und der LOV-Domäne in Konstrukten  $\Delta$ LOV\_S209 und \_G212 führte zu konstitutiv niedriger Fluoreszenz und keinen messbaren Unterschieden zwischen den Beleuchtungsbedingungen. Das beweist zum einen, dass die Lichtregulation tatsächlich durch die LOV-Domäne vermittelt wird. Zum anderen zeigt es, dass der Bindemodus der ANTAR-Domäne in Abwesenheit des LOV-Photosensors aktiv ist, *i.e.* ohne Regulation eine konstitutive Bindung an die RNA-Zielsequenz vorliegt. Es steht zu vermuten, dass die LOV-Domäne die Bindestelle maskiert oder bindungsrelevante Aminosäuren durch Wechselwirkungen beeinflusst



**Abbildung 17 Mutationsanalyse - Deletionen:** Im oberen Bereich der Abbildung ist das Ursprungprotein und die verschiedenen Deletionsvarianten dargestellt, im unteren Bereich die relative DsRed-Fluoreszenz von *E. coli*-Kulturen der einzelnen Varianten nach 16-stündiger Inkubation im Dunkeln (schwarz) oder unter Blaulichtbestrahlung (450 nm, 40  $\mu$ W·cm<sup>-2</sup>, blau). Die Expression der Konstrukte wurde durch Western-Blots bestätigt. Als Kontrollkonstrukt dient ein System das ein Plasmid, das nicht für das PAL-Protein kodiert, enthält.

Eine zusätzliche Deletion der nicht-konservierten Adapterhelix der ANTAR-Domäne in Konstrukt  $\Delta$ LOV\_A189 führte im Vergleich dazu zu einer Umkehr der PAL-Aktivität. Die gleichbleibend hohe Fluoreszenz zeigte ein Ausbleiben der Interaktion zwischen PAL und RNA. Es steht zu vermuten, dass die deletierten Reste entweder von struktureller Relevanz für die Faltung der ANTAR-Domäne sind oder aber direkt für die Interaktion mit der RNA verantwortlich.

Da die Helix nicht konserviert in den wenigen bekannten ANTAR-Domänen ist, scheint die Relevanz für die Faltung wahrscheinlicher. Durch die Verwendung eines synthetischen RNA-*targets* im Assay kann eine Beteiligung an der Bindung anhand der vorliegenden Daten aber nicht ausgeschlossen werden.

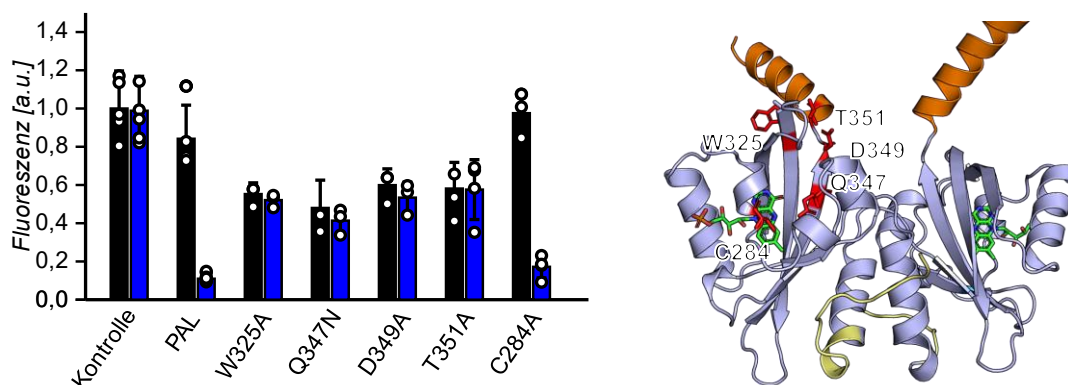
Die Deletion der PAS-Domäne in Konstrukt  $\Delta$ PAS\_D112 führte zu einer Abnahme der lichtabhängigen Regulation durch eine Verminderung der Bindung an die RNA im Licht, bei gleichzeitiger Zunahme der Interaktion im Dunkeln. Diese gegenläufigen Effekte weisen auf eine Abnahme der strukturellen Integrität des Proteins hin. Die RNA-Bindung ist noch vorhanden, kann aber nur noch geringfügig durch die LOV-Domäne reguliert werden – gegebenenfalls aufgrund der Destabilisierung der dimeren Struktur. Eine weitere Erklärung wäre die direkte Interaktion der PAS-Domäne mit der RNA. Diese Hypothese wird allerdings dadurch widerlegt, dass die PAS-Domäne alleine keine Interaktion mit der RNA aufweist, was durch eine konstant hohe Fluoreszenz im Assay-Kontext gezeigt wurde (PASonly-Konstrukt).

Die serielle Deletion der C-terminalen  $J\alpha$ -Helix zeigte die Relevanz dieses Strukturelements für die Signaltransduktion des Proteins. Die Deletion von Resten direkt in der Scharnier-Region zwischen LOV-Domäne und Helix, die sich in enger räumlicher Nachbarschaft zur ANTAR-Domäne befinden, führte zu einem Verlust der Schaltbarkeit und zu intermediärer Fluoreszenz. Das indiziert, dass die Signalweiterleitung verhindert wird und die RNA-Bindung nur noch teilweise möglich ist. Die beobachtete, intermediäre RNA-Bindung spricht für einen direkten Effekt auf die RNA-Interaktion. Wie zuvor bemerkt, inhibiert die dunkeladaptierte LOV-Domäne die RNA-Interaktion sterisch. Die hier präsentierten Ergebnisse legen nahe, dass diese Inhibition zumindest teilweise durch die  $J\alpha$ -Helix ausgelöst wird. Weitere Deletionen von kürzeren Helixfragmenten zeigten vorwiegend konstitutive RNA-Bindung bei niedriger Fluoreszenz.

Dies zeigt, dass die intakte Helix benötigt wird um die Interaktion mit RNA effektiv zu unterbinden. Zusammen mit den Ergebnissen der Variante  $\Delta$ 353 zeigt dies auch, dass die Aufhebung der sterischen Inhibition nicht hinreichend ist für eine effiziente Bindung von RNA. Die Variante zeigt eine verringerte Bindung der RNA durch intermediäre Fluoreszenz, obwohl die komplette Helix entfernt wurde. Vermutlich werden über den Scharnier-Bereich der Helix noch weitere strukturelle Änderungen auf die ANTAR-Domäne übertragen. Ungewöhnlich sind die Ergebnisse für die Variante  $\Delta$ 359, die beinahe die ursprüngliche Schaltbarkeit aufwies. Dies ist vermutlich durch den C-terminalen *Myc-tag*, der direkt an die  $J\alpha$ -Helix anschließt, zu erklären. Der *tag* bildet potentiell ebenfalls eine  $\alpha$ -helicale Struktur aus und kann die Struktur der  $J\alpha$ -Helix ergänzen, wenn er in der richtigen Periodizität angefügt wird.

Eine Interpretation der Ergebnisse wird dadurch erschwert, es wird jedoch deutlich, dass die proximalen Elemente der Helix für die Signaltransduktion und die distalen Bereiche eher für die sterische Hemmung der RNA-Interaktion von Bedeutung sind.

Um die Signaltransduktion von LOV-Domäne zu ANTAR-Domäne genauer zu untersuchen, wurden spezifische Aminosäuren mutiert und die Effekte auf die PAL Aktivität im Assay bestimmt (Abbildung 18). Mutationen der LOV-Domäne bestätigten die Vermutung, dass die Scharnier-Region der  $J\alpha$ -Helix für die Signaltransduktion relevant ist.

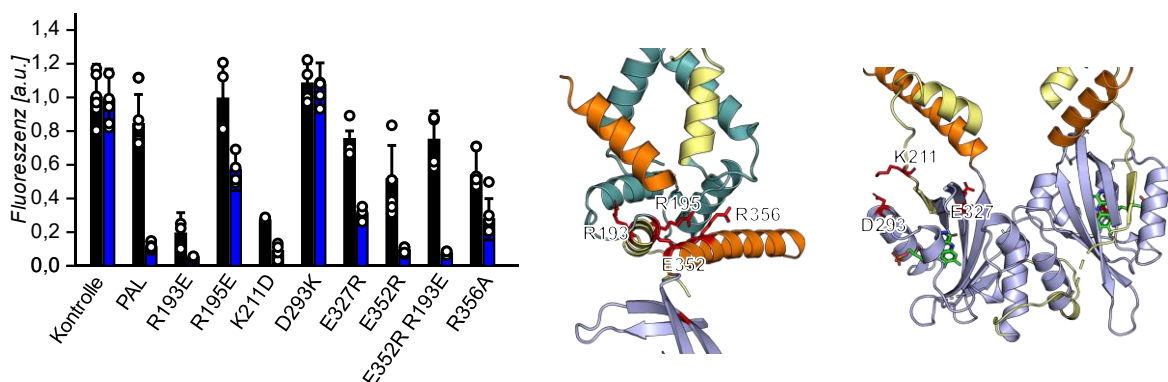


**Abbildung 18 Mutationsanalyse der PAL-LOV Domäne:** Links ist die relative DsRed-Fluoreszenz von *E. coli*-Kulturen der einzelnen Mutationen nach 16-stündiger Inkubation im Dunkeln (schwarz) oder unter Blaulichtbestrahlung (450 nm, 40  $\mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$ , blau) gezeigt. Die Expression der Konstrukte wurde durch Western-Blots bestätigt. Rechts sind die betreffenden Mutationen in der PAL-Struktur eingezeichnet. Als Kontrollkonstrukt dient ein System das ein Plasmid, das nicht für das PAL-Protein kodiert, enthält.

Sowohl eine Mutation von W325, das mit den für die Signaltransduktion wichtigen Resten des DVT-Motivs interagiert, als auch von Q347-, D349- und T351-Resten, die in anderen LOV-Domänen ebenfalls in der Signaltransduktion beteiligt sind, führten zum Verlust der Schaltbarkeit und einer intermediären Fluoreszenz (26; 62). Während W325, D349 und T351 vermutlich die Signalfunktion der  $J\alpha$ -Helix beeinträchtigen, ist veröffentlicht, dass Q347 direkt mit dem Chromophor interagiert (63), dies erkennt man auch in der dunkeladaptierten Kristallstruktur von PAL. Durch die lichtabhängige Protonierung des N5 Atoms des Flavins erfährt es eine Konformationsänderung, die dann die weitere Signaltransduktion innerhalb der LOV-Domäne auslöst (Vergleich Abbildung 5B). Die Mutation des Rests zu Asparagin scheint das Protein in einem halb-aktiven Zustand festzusetzen. Die Mutation des konservierten Cysteins an Position 284 führte überraschenderweise nicht zu einem Effekt auf die Aktivität des Proteins, obwohl es im lichtaktivierten Zustand eine kovalente Bindung mit dem Flavinmononukleotid eingeht (Vergleich Abbildung 5B). Auch für andere LOV-Domänen konnte intakte Signaltransduktion bei fehlendem Bindungspartner des Chromophors festgestellt werden (24).

Der Chromophor kann durch Lichteinstrahlung ein meta-stabiles Radikal an der C4a Position ausbilden (Vergleich Abbildung 21), welches oftmals ausreicht, die nötigen konformationellen Änderungen in der LOV-Domäne auszulösen. Die geringe Effizienz dieser Reaktion kam im Assay-Aufbau nicht zu tragen.

Bei der Untersuchung der Interaktion von LOV- und ANTAR-Domäne wurden sowohl in der Scharnier-Region als auch im Adapter zwischen den Domänen relevante Reste bestimmt (Abbildung 19). Die Reste R193 und R195 bilden zusammen mit R194 ein dreifaches Arginin-Motiv, das in die Interaktionsfläche der Monomere und die Domänenschnittstelle hineinragt.

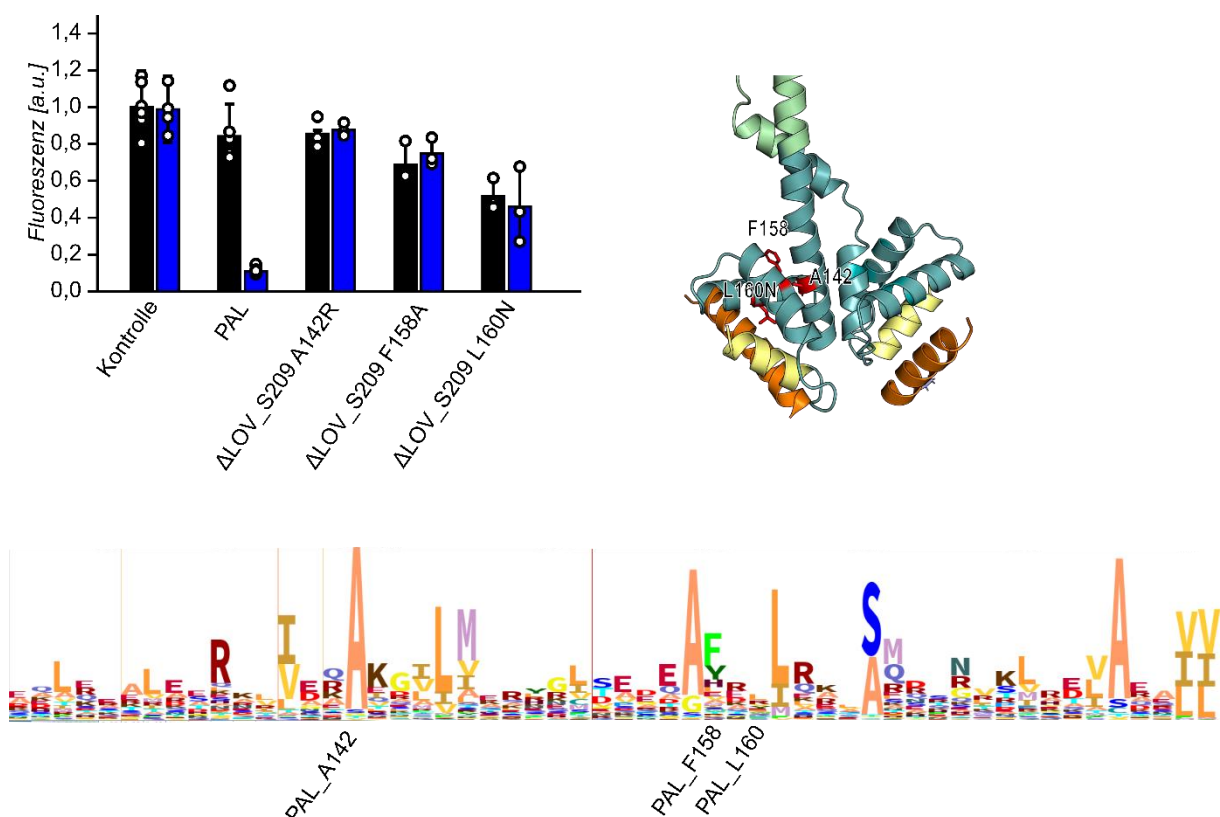


**Abbildung 19 Mutationsanalyse der PAL-Signaltransduktion:** Links ist die relative DsRed-Fluoreszenz von *E. coli*-Kulturen der einzelnen Mutationen nach 16-stündiger Inkubation im Dunkeln (schwarz) oder unter Blaulichtbestrahlung (450 nm, 40  $\mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$ , blau) gezeigt. Die Expression der Konstrukte wurde durch Western-Blots bestätigt. Rechts sind die betreffenden Mutationen in der PAL-Struktur eingezeichnet. Als Kontrollkonstrukt dient ein System das ein Plasmid, das nicht für das PAL-Protein kodiert, enthält.

Das zur  $\alpha$ -Helix hin ausgerichtete R193 interagiert mit E352 und stabilisiert vermutlich die Dunkelposition der Helix, sodass Mutation zu konstitutiv niedriger Fluoreszenz und damit konstitutiver RNA-Bindung führt. Hingegen führt die Mutation von R195 zu einer starken Abnahme der RNA-Bindung, da die ANTAR-Domänen destabilisiert werden. R195 interagiert vermutlich über polare Wechselwirkungen mit D151 der Nachbardomäne und trägt zur Struktur der ANTAR Domäne bei. Die Mutation des nach außen gerichtete R194 hatte keine Auswirkung auf die Aktivität des Proteins. Die Mutation von E352 hatte einen geringeren Effekt als der des interagierenden R193, was darauf hinweist, dass auch andere Reste mit R193 interagieren könnten. Eine Doppelmutante R193E-E352R führt jedoch zu wildtypischer PAL-Aktivität, was die Rolle dieser Salzbrücke in der Signaltransduktion unterstreicht. Auch zwischen K211 im *Linker* und D293 in der LOV-Domäne besteht die Möglichkeit von polaren Interaktionen, die Mutation dieser Reste führt entweder zur konstitutiven RNA-Bindung oder verhindert die RNA-Bindung.

Das legt eine Rolle des Adapters nicht nur für die Struktur, sondern auch für die Signalweiterleitung nahe. Mutationen von E327 und R356 wirken sich auf die Funktion der  $\alpha$ -Helix aus und zeigen eine verringerte Lichtschaltbarkeit.

Es sollten relevante Aminosäuren für die Funktion der ANTAR Domäne identifiziert werden, da nur wenig über die RNA-Bindung dieser Domänen bekannt ist. Um nur Bindungsrelevante Reste zu identifizieren und Auswirkungen der Mutationen auf die Signalweiterleitung ausschließen zu können, wurden die Mutationen im Hintergrund der  $\Delta$ LOV\_S209 Variante eingebracht, die konstitutive RNA-Bindung aufweist (Vergleich Abbildung 17). Es konnten drei Varianten identifiziert werden, die RNA nur noch mit geringer Affinität binden (Abbildung 20).



**Abbildung 20 Mutationsanalyse der PAL-RNA Bindung:** Links ist die relative dsRed Fluoreszenz von *E. coli* Kulturen der einzelnen Mutationen nach 16-stündiger Inkubation im Dunkeln (schwarz) oder unter Blaulichtbestrahlung (450 nm,  $40 \mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$ , blau) gezeigt. Die Expression der Konstrukte wurde durch Western-Blots bestätigt. Rechts sind die betreffenden Mutationen in der PAL-Struktur eingezeichnet. Als Kontrollkonstrukt dient ein System das ein Plasmid, das nicht für das PAL-Protein kodiert, enthält. Im unteren Bereich ist die Sequenzkonservierung der Aminosäuren in den ANTAR-Domänen gezeigt (pfam-Alignment).



Während die ins Domäneninnere gerichteten Reste von A142 und L160 die Stabilität der ANTAR Domäne beeinflussen, könnte F158 direkt an der RNA-Interaktion beteiligt sein. Während polare Aminosäuren wie Arginin und Lysin unspezifische Interaktionen mit dem RNA-Rückgrat eingehen können, wurde gezeigt dass Phenylalanin bevorzugt unpolare  $\pi$ - $\pi$  Wechselwirkungen mit Uracil ausbildet (64). Dabei interagieren die aromatischen Aminosäurereste über sogenannte Stapelwechselwirkungen (65) mit den Basen der RNA.

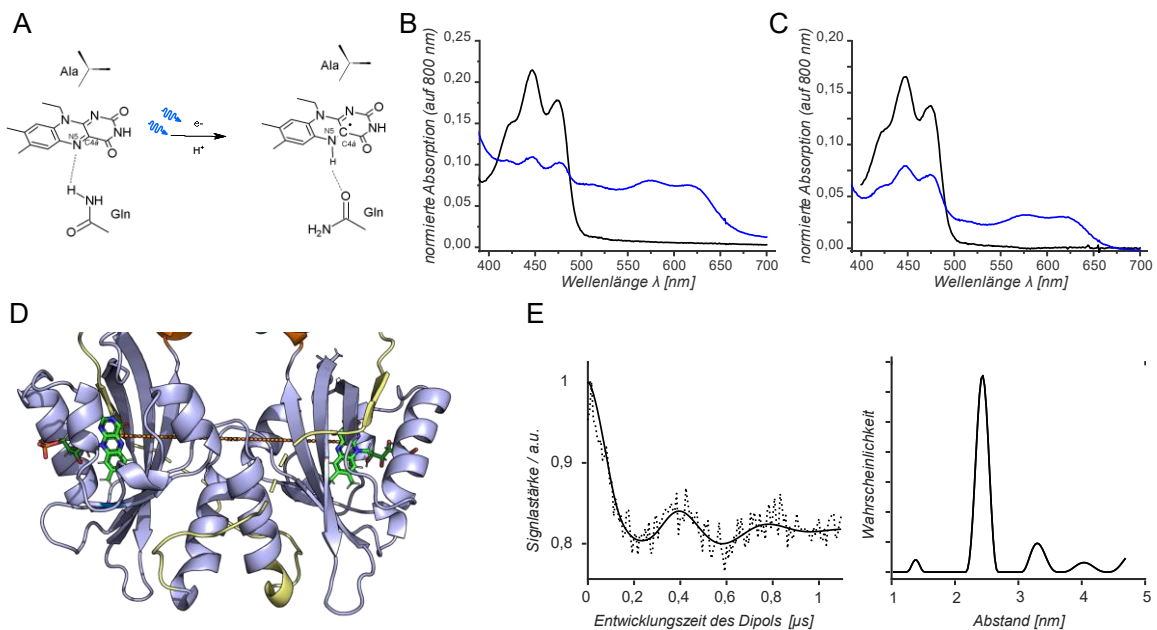
Alle hier identifizierten Reste sind nach einem *pfam*-Alignment der bekannten ANTAR-Domänen hochkonserviert und scheinen somit zur allgemeinen Funktion der Domäne beizutragen. Dass die Mutationen einen Einfluss auf die Sequenzspezifität des PAL-Proteins haben, ist daher unwahrscheinlich. Es ist allerdings unklar ob der Assay sensitiv genug wäre, um geringe Unterschiede in der Affinität der Bindung des Aptamers an die ANTAR-Domäne zu detektieren. Da die Fluoreszenz sich über einen Zeitraum von 16 Stunden hin entwickelt, fallen kleine Stabilitätsverluste des PAL-Aptamer Komplexes nicht ins Gewicht.

Die Mutation von Cystein 284 zu Alanin führt nach Blaulichtabsorption bei konservierter Signalwirkung der LOV-Domäne zur Ausbildung eines metastabilen Radikals innerhalb des Chromophors (Abbildung 21A). Dieses ist durch die strukturellen Gegebenheiten mit hoher Wahrscheinlichkeit auf der C4a Position des Chromophors lokalisiert (24). Die Ausbildung von stabilen Radikalen an einer definierten Position im Protein ist die Voraussetzung für die Abstandsbestimmung zweier Radikale mittels Elektronenspinresonanz-Spektroskopie. Mittels DEER/PELDOR (*pulsed electron electron double resonance*) Experimenten konnte die Distanz zwischen den zwei Chromophoren im PAL-Dimer nach Beleuchtung bestimmt werden, was Aufschluss über die Dynamik der LOV-Domäne während der Aktivierung gibt.

Im Rahmen einer Masterarbeit wurde die PAL-Variante C284A gereinigt und charakterisiert (Masterthesis Marc Juraschitz, Universität Bayreuth, 2019). Im UV-VIS Spektrum zeigte sich die erwartete Bildung des neutralen Semichinon-Zustands des Chromophors durch eine Zunahme der Absorption um 600 nm. Wie erwartet musste das Protein auch nach Zugabe von Tris(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP) als Elektronendonator dazu sehr viel länger als die gewöhnlich ausreichenden 10 Sekunden beleuchtet werden, da die Effizienz der NSQ-Bildung gering ist (Abbildung 21A). Ein großer Anteil des eingestrahlt Lichts wird als Fluoreszenz abgegeben und nicht in strukturelle Änderungen umgesetzt (22). Zudem wurde eine zunehmende Aggregation des Proteins anhand der steigenden Basislinie der Messung festgestellt werden. Die Akkumulierung von reaktiven Sauerstoffspezies, deren Entstehung durch die Radikalbildung am Chromophor begünstigt werden, könnte die Proteinaggregation auslösen (66).



Daher wurde ein Abfangsystem bestehend aus Glukose, Glukose Oxidase und Katalase für die Experimente eingesetzt, wobei Glukose und Wasser zusammen mit Sauerstoff von Glukose Oxidase zu Wasserstoffperoxid und Glukonsäure umgesetzt werden. Das Wasserstoffperoxid wird mithilfe von Katalase zu Wasser und pro Reaktionszyklus einem halben Sauerstoffmolekül umgesetzt, sodass jeweils ein durch das Chromophor gebildetes Radikal abgefangen und zu molekularem Sauerstoff reagieren kann (24). Der Einsatz des Systems erlaubte eine effizientere Generierung der stabilen Radikale auf den Chromophoren ohne einen Abbau des Proteins auszulösen (Abbildung 21B und C).

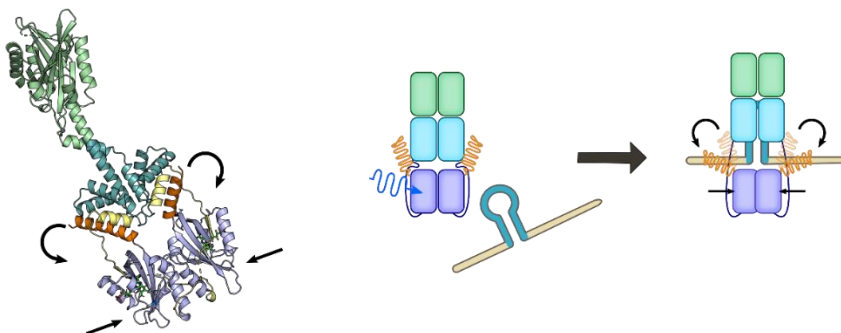


**Abbildung 21 PAL C284 A und Elektronenspinresonanz Spektroskopie:** A zeigt den vereinfachten Photozyklus von cysteinfreien LOV-Domänen. B und C zeigen Absorptionsspektren des gereinigten Proteins im Dunkeln (schwarz) und nach Blaulichtillumination bei 450 nm für 7 Minuten (B) und 4 Minuten (C) jeweils mit Zugabe von TCEP (B) und unter Verwendung des Abfangsystems (C). (D) zeigt den Abstand zwischen den stabilen Radikalen in der Dunkelstruktur von 3,2 nm. Das pELDOR-Signal der beiden Radikale im lichtadaptierten PAL-Dimer und die durch Tikhonov-Regularisierung gewonnene Abstandsverteilung sind in (E) gezeigt (Marc Jura-schitz, Universität Bayreuth (2019)).

Die Probe wurde für fünf Minuten bei geringen Lichtintensitäten von  $30 \text{ mW/cm}^2$  beleuchtet, um den lichtadaptierten NSQ-Zustand zu populieren. Durch Schockfrieren zunächst in stickstoffgekühltem Ethanol und anschließend in flüssigen Stickstoff wurde das Protein im lichtadaptierten Zustand festgehalten. Durch gepulste Messungen wurde die Interaktion der beiden Radikale über die Zeit hinweg aufgenommen. Es konnte ein schwaches, aber tief moduliertes Signal für aufgenommen werden, das durch Tikhonov-Regularisierung zu einer klar abgegrenzten Abstandsverteilung der Radikale mit einem Maximum bei 2,6 nm führte (Abbildung 21E).

Die Schwäche des Signals ist auf die Tatsache zurückzuführen, dass nur Dimere, in denen beide Chromophore ein Radikal tragen, zur Messung beitragen. Eine Abschätzung des Anteils der lichtadaptierten Chromophore anhand der Absorption bei 450 nm ergibt aber nur einen Aktivierungsgrad von 50 %, d.h. dass statistisch gesehen nur 25 % der Proteine in der Messlösung zum Signal beitragen. Die Daten zeigen eine Annäherung der beiden Chromophore im lichtaktivierten Zustand im Vergleich zur aus der dunkeladaptierten Kristallstruktur gewonnenen Distanz zwischen den C4a-Atomen der Flavine von 3,22 nm (Abbildung 21D). Diese Bewegung kann auf die LOV-Domänen und die J $\alpha$ -Helix übertragen werden, um die sterische Inhibition der RNA-Interaktion mit der ANTAR-Domäne aufzuheben.

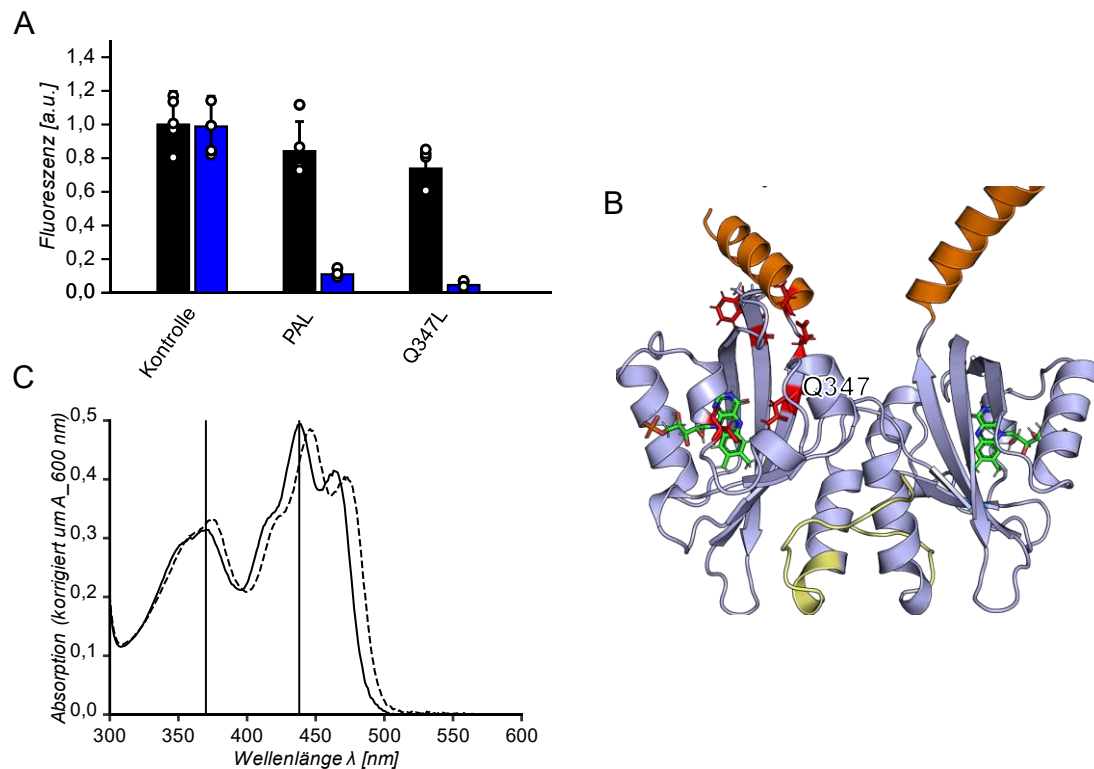
Die Erkenntnisse aus Mutationsanalysen zeigen, dass die Anwesenheit der LOV-Domäne eine Bindung der RNA an PAL im Dunkeln verhindert und dass Aminosäuren in der Scharnierregion zwischen LOV-Domäne, J $\alpha$ -Helix und ANTAR Domäne die Interaktion zwischen Protein und Zielsequenz stark beeinflussen. Für den Dunkelzustand des Proteins ergibt sich die Hypothese einer durch Interaktionen der Scharnier-Region mit der ANTAR-Domäne stabilisierten sterischen Autoinhibition der ANTAR-Domäne durch die J $\alpha$ -Helix. Die durch die Spinresonanz-Experimente gezeigte Annäherung der Chromophore nach Beleuchtung weist auf eine starke Dynamik des Proteins im Verlauf der Lichtantwort hin. Die Annäherung der LOV-Domänen hebt -vermutlich vermittelt über die J $\alpha$ -Helix - die Autoinhibition auf und macht die Bindestelle der ANTAR-Domäne für die Zielsequenz zugänglich. Zusätzlich zur Aufhebung der sterischen Inhibition werden noch weitere Veränderungen in der ANTAR-Domäne ausgelöst, die ebenfalls durch die Scharnier-Region weitergegeben werden (Abbildung 22). Dies ist vor allem daraus zu schließen, dass eine komplette Entfernung der J $\alpha$ -Helix nicht zu konstitutiver RNA-Bindung führt (Vgl. Abbildung 17), wie sie für die Deletion der gesamten LOV-Domäne beobachtet wurde.



**Abbildung 22 Schema des PAL-Mechanismus:** Die lichtabhängigen Veränderungen die das PAL-Dimer unterläuft um eine Anbindung an RNA zu ermöglichen sind anhand der Kristallstruktur und eines Schemas verdeutlicht.

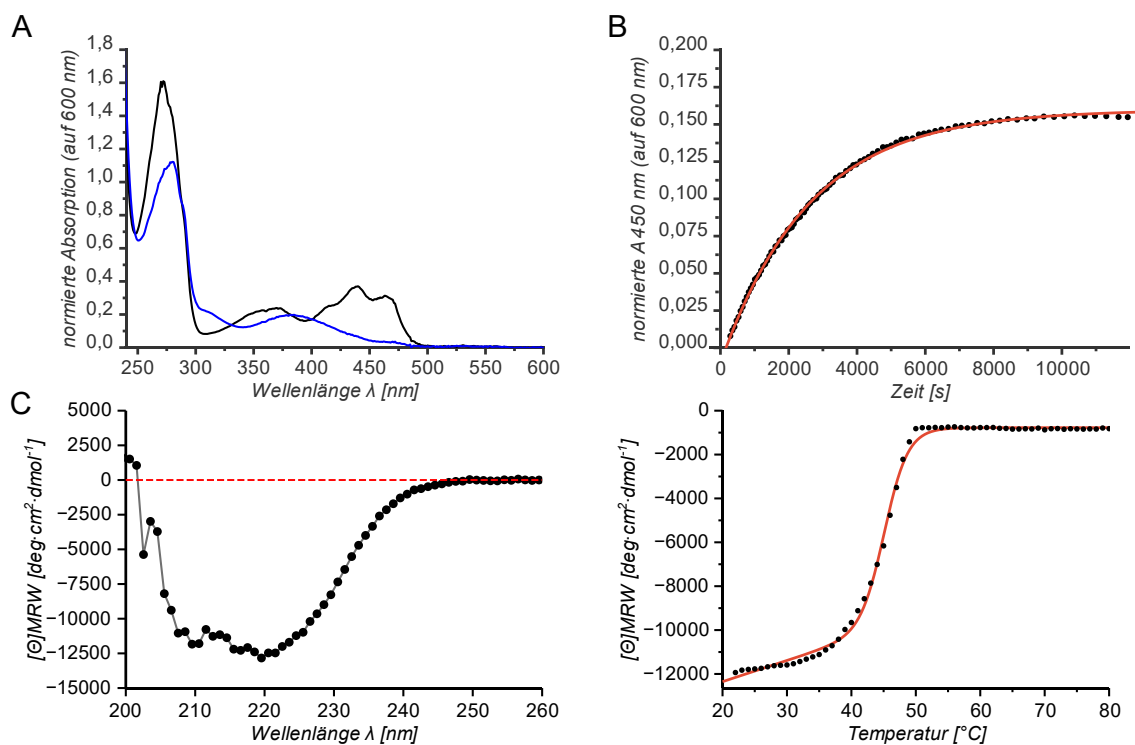
### 3.3 Einfluss von Glutamin 347 auf die Signaltransduktion der LOV-Domäne

Eine weitere Variante, die im bakteriellen Assay unerwartetes Verhalten zeigte war die Mutation von Glutamin 347 zu Leucin. Da Q347 wie beschrieben direkt an der Interaktion mit dem Chromophor beteiligt ist und die meisten Mechanismusmodelle davon ausgehen, dass die Rotationsbewegung der Seitengruppe auslösend ist für nachgelagerte strukturelle Veränderung, wurde ein starker Effekt erwartet. Tatsächlich ist die Aktivität von PAL im bakteriellen Assay kaum beeinträchtigt (Abbildung 23A). Dieses ungewöhnliche Ergebnis sollte genauer untersucht werden. Vergleicht man die Absorptionsspektren von PAL und PAL Q347L, fällt die Blauverschiebung der Absorptionsmaxima bei 450 nm um ca. 5 nm auf, die durch die Änderung der Chromophorumgebung ausgelöst wird (Abbildung 23B und C).



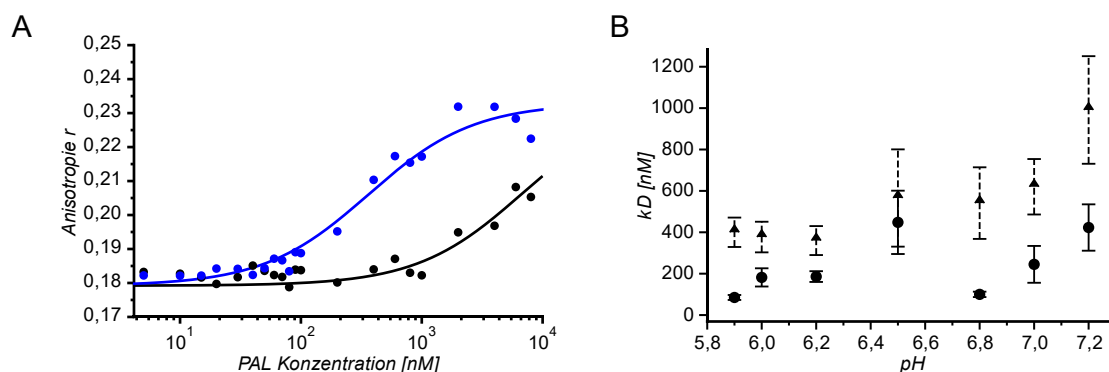
**Abbildung 23 PAL Q347L im Reportersystem:** A zeigt die relative DsRed Fluoreszenz von *E. coli* Kulturen der PALQ347L Mutation und Kontrollen nach 16-stündiger Inkubation im Dunkeln (schwarz) oder unter Blaulichtbestrahlung (450 nm,  $40 \mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$ , blau) gezeigt. Die Expression der Konstrukte wurde durch Western-Blots bestätigt. B verdeutlicht die Position des mutierten Rests innerhalb der LOV-Domäne in der Nachbarschaft des Chromophors, was die in C verdeutlichte Blauverschiebung des Absorptionsspektrums auslöst (durchgezogene Linie: Dunkelspektrum PALQ347L, durchgezogene Linie: Dunkelspektrum PAL).

Die Verschiebung des Absorptionsmaximums hatte keine Auswirkung auf den Photozyklus des Proteins, wie sich an der Halbwertszeit des lichtadaptierten Zustands von  $2615 \pm 35$  s zeigte (Abbildung 24A und B). Diese unterscheidet sich somit nicht sonderlich von der des ursprünglichen PALs. Während die Faltung des Proteins nicht sichtbar beeinträchtigt ist (Abbildung 24C) verringert sich die thermische Stabilität mit  $45^\circ\text{C}$  um ungefähr  $5^\circ\text{C}$  (Abbildung 24D). Da ein Einfluss der Mutation auf das Chromophor durch die Absorptionsspektren evident ist, könnte eine Ursache hierfür schlechtere Inkorporation des Flavins sein, was zu einer geringeren Stabilität der LOV-Domäne führt. Die gewonnenen Daten belegen die strukturelle Integrität und den ungehinderten Ablauf des Photozyklus, erlauben aber keine Aussage über die Signaltransduktion des Proteins. Auch in anderen LOV-Domänen konnte eine funktionale Photochemie in glutaminfreien LOV-Domänen nachgewiesen werden, allerdings wurde bisher davon ausgegangen, dass die Signaltransduktion in diesen Varianten gestört ist (63). Die Daten des bakteriellen PAL-Assays lassen jedoch auf eine funktionale Signaltransduktion des Proteins schließen. Eine intakte Signaltransduktion kann durch den Nachweis der lichtabhängigen RNA Interaktion mit *in vitro* Experimenten direkt demonstriert werden.



**Abbildung 24 Spektrale Untersuchung von PAL Q347L:** Die Absorptionsspektren von PALQ347L im Dunkeln (schwarz) und im Licht (blau) und die Rückkehrkinetik des lichtadaptierten Zustands anhand der Absorption bei 450 nm bei  $22^\circ\text{C}$  sind in A und B gezeigt. Das CD-Spektrum bei  $22^\circ\text{C}$  (C) und die Schmelzkurve anhand der Temperaturabhängigkeit des CD-Signals bei 220 nm (D), zeigen die strukturelle Intaktheit des Proteins.

Zunächst war im etablierten Anisotropie-Assay keine lichtverstärkte Interaktion mit den Aptameren nachweisbar. Im Verlauf weiterer Experimente zeigte sich, dass die RNA-Interaktion mit einer verringerten Affinität, aber dennoch durch Blaulichtbestrahlung aktiviert, stattfindet (Abbildung 25A). Dabei konnte eine effiziente Lichtschaltbarkeit des Proteins bei einem pH von 6,2 in Phosphatpuffer gemessen werden ( $K_D = 360 \pm 70$  nM), während der Wert für das dunkeladaptierte Protein über zehnmal höher bei ungefähr 6000 nM lag. Aufgrund von Konzentrationsbeschränkungen war der Wert für das dunkeladaptierte Protein nicht absolut bestimmbar. Die Betrachtung der pH Abhängigkeit der Dissoziationskonstanten demonstriert, dass bei einem pH von 7,2 unter den zuvor etablierten Messbedingungen keine Lichtaktivierung nachweisbar ist. Hier ist der  $K_D$ -Wert auch im Licht so hoch, dass unter den Messbedingungen kein Unterschied zwischen Dunkel- und Lichtadaption von PAL zu erkennen ist. Der Effekt der geringen Effizienz der Signaltransduktion scheint im Assay-System vernachlässigbar zu sein. Dies kann am langen Zeitraum, über den der bakterielle Assay inkubiert wird, liegen. Gegebenenfalls ist durch die Einbettung der RNA-Zielsequenz in das Expressionsplasmid die Affinität des Aptamers für PAL auch grundsätzlich verringert, sodass die viel größere Affinität des wildtypischen PALs für das Aptamer nicht zu einer Verbesserung der Schaltbarkeit des Assays führt.



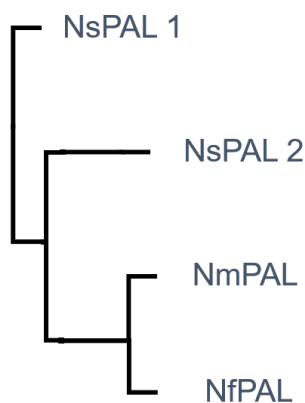
**Abbildung 25 Anisotropie Messung von PAL Q347L:** Die Messung der Anisotropie bei konstanter Konzentration von TAMRA markiertem 04.17 Aptamer und steigender PALQ347L Konzentration im Dunkeln (schwarz) und nach Blaulichtbestrahlung (blau) ergab einen  $K_D$ -Wert von  $360 \pm 70$  nM (A). In B ist die pH- Abhängigkeit der experimentell bestimmten Dissoziationskonstanten für PALQ347L (▲) im Vergleich zu den für PAL (●) bestimmten gezeigt.

Die gemessenen Daten zeigen klar, dass Signaltransduktion in LOV-Domänen auch ohne das konservierte Glutamin möglich ist, wenn auch mit verringerter Effizienz. Dies stellt zum einen etablierten Mechanismusmodelle in Frage, die bisher die Konformationsänderung des Glutamins als essentiell für nachgelagerte strukturelle Veränderungen ansahen (67).

Zum anderen wird die Mutation des Glutamins in vielen Studien als Negativkontrolle für LOV-basierte Systeme verwendet. Da in dieser Arbeit im biologischen System PAL Q347N eine intermediäre Aktivität, wenn auch keine Schaltbarkeit, und PAL Q347L eine wildtypische Aktivität aufweisen, sollten Aussagen dieser Studien, gerade zur Effizienz der Systeme im Vergleich zu Negativkontrollen, vorsichtig interpretiert werden (68).

### 3.4 Entdeckung und Analyse von PAL-Homologen

Zu Beginn des Projekts wurde im Rahmen einer Datenbankabfrage PAL als einziges Protein mit der markanten PAS-ANTAR-LOV Domänenarchitektur identifiziert (44). Dies erschwerte die Einordnung der biologischen Funktion des Proteins, da biologische Prozesse in *Nakamurella multipartita* fast vollständig unbekannt sind. Auch die Identifikation möglicher natürlicher Interaktionspartner wird erschwert, da keine weiteren RNA-basierten Prozesse bekannt sind, die natürlicherweise durch Licht reguliert werden. Während ein ‚einzigartiges‘ Protein zunächst sehr unwahrscheinlich erscheint, ist miteinzubeziehen, dass nur sehr wenige *Nakamurella*-Spezies charakterisiert oder sequenziert wurden. Bei der Sequenzierung zweier weiterer *Nakamurella*-Genome im Herbst 2018 (*Nakamurella deserti* (69)) und 2019 (*Nakamurella flava* (70)), wurden dann jeweils weitere PAL-Homologe identifiziert (Abbildung 26). Zwei davon, aus *Nakamurella deserti* (zum Zeitpunkt der Entdeckung *Nakamurella sp.*), benannt NsPAL1 und NsPAL2 weisen sowohl am N- als auch am C-terminus lange Zusatzsequenzen auf (Abbildung 27), während NfPAL dem ursprünglich charakterisierten NmPAL ähnlicher scheint, was sich auch in einer Verwandtschaftsuntersuchung der Proteinsequenzen zeigt (Abbildung 26).

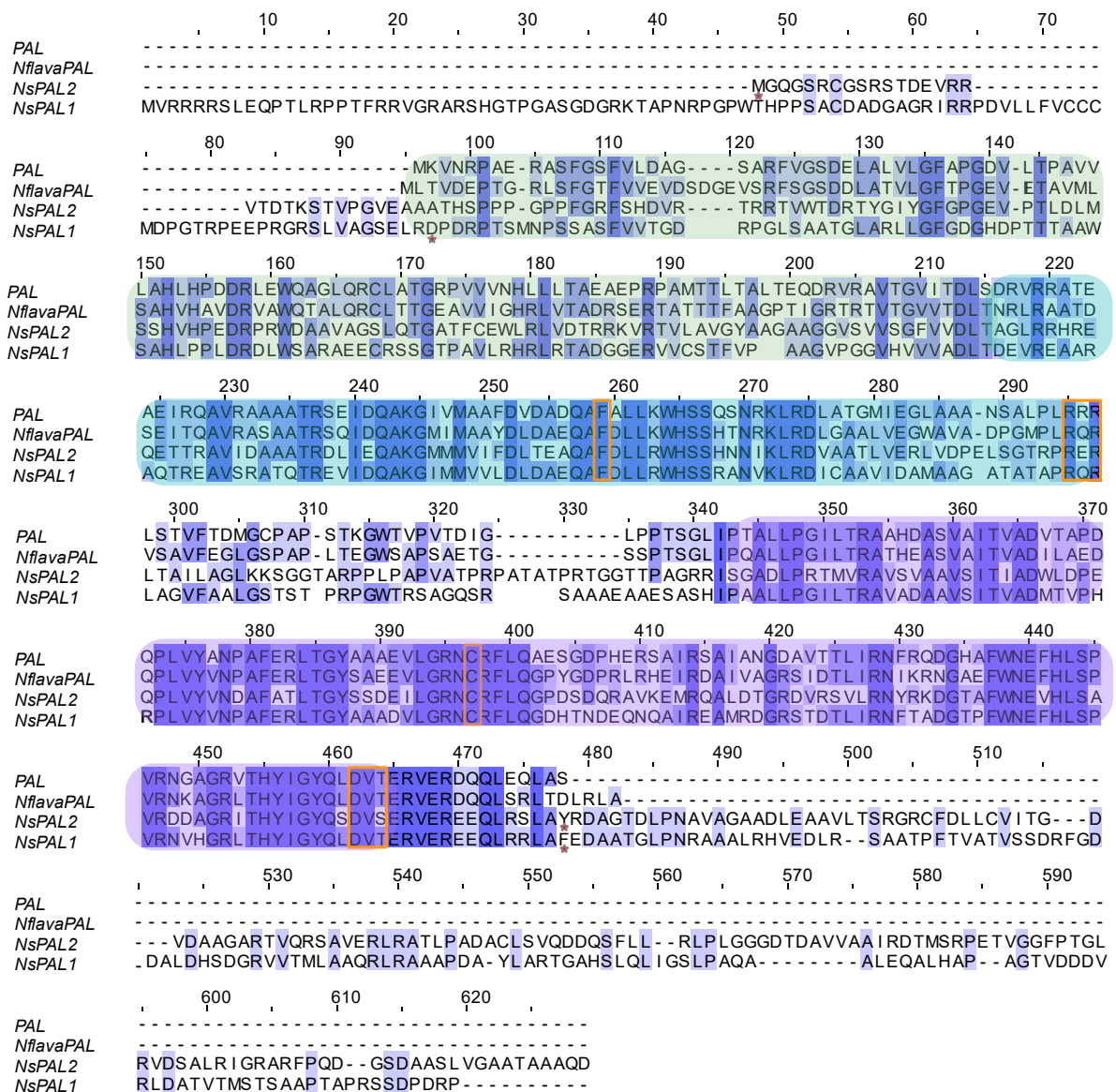


**Abbildung 26 Verwandtschaft der verschiedenen PAL- Homologen anhand der Proteinsequenz:** Das Zugrunde liegende Multiple Sequence Alignment wurde mit der MUltiple Sequence Comparison by Log- Expectation Software (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>) erstellt und mit JalView bearbeitet.

Die LOV-Domäne ist in allen vier Proteinen sehr hoch konserviert, der Adapter zwischen LOV- und ANTAR-Domäne bzw. die in der LOV-Domäne eingefügte Helix weicht aber zwischen NmPAL/NfPAL und den NsPAL Varianten ab, hier weisen die NsPAL Proteine Insertionen auf. Da aus den Mutationsanalysen hervorgeht, dass der Linker für die Signaltransduktion von Bedeutung ist, kann das auf eine Anpassung der Funktion hinweisen. Die in den Mutationsanalysen als funktionsentscheidend identifizierten Arginine (Abbildung 27 Position 295 und 297, orangene Markierung) sind in allen PAL Varianten konserviert, eine Signalübertragung von LOV- zur ANTAR-Domäne wäre also möglich.



Die ANTAR-Domäne ist größtenteils konserviert, die in PAL als zusätzlich identifizierte Adapter-Helix (Abbildung 27 Position 275-297) weist allerdings einige Abweichungen auf. Da diese Helix in NmPAL als essentiell für die RNA-Bindung identifiziert wurde (Vergleich Abbildung 17), kann eine abweichende Zielsequenz der verschiedenen PAL-Varianten vermutet werden. Von den drei Domänen ist die PAS-Domäne zwischen den Homologen am wenigsten konserviert, was mit der unklaren Funktion der PAS-Domäne für die PAL-RNA Interaktion korreliert.

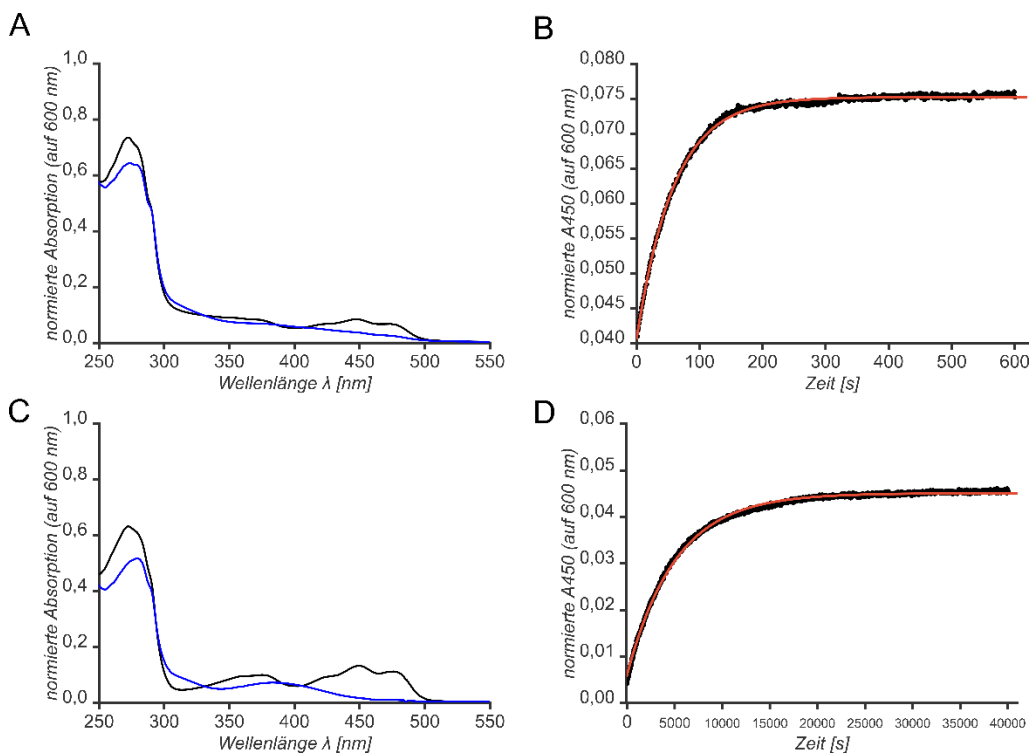


**Abbildung 27 Multiples Sequenzalignment der verschiedenen PAL-Varianten:** Das Multiple Sequenz Alignment wurde mit der Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation Software (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>) erstellt und mit JalView bearbeitet. Die PAS-Domäne ist in hellgrün, die ANTAR-Domäne in petrol und die LOV-Domäne in lila unterlegt. Konservierte Aminosäuren mit funktioneller Relevanz wurden in orange hervorgehoben. \* markieren die Enden der für die in vitro Analyse verwendeten verkürzten NsPAL-Varianten.



Der Nachweis weiterer PAL-Varianten belegt die Existenz einer neuartigen Proteinklasse innerhalb der *Nakamurellaceae*, die lichtabhängig RNA bindet und, im Falle der NsPAL-Varianten, gegebenenfalls weitere Funktionen wahrnimmt. Die C-terminal verlängerten Sequenzen der NsPAL-Varianten weisen eine hohe Sequenzübereinstimmung mit Teilen von Di-Guanylat-Cyclasen auf, aufgrund der geringen Länge der Aminosäuresequenz erscheint ein Einfluss auf die cyclischen-di-GMP Konzentration von Zellen aber unwahrscheinlich (71).

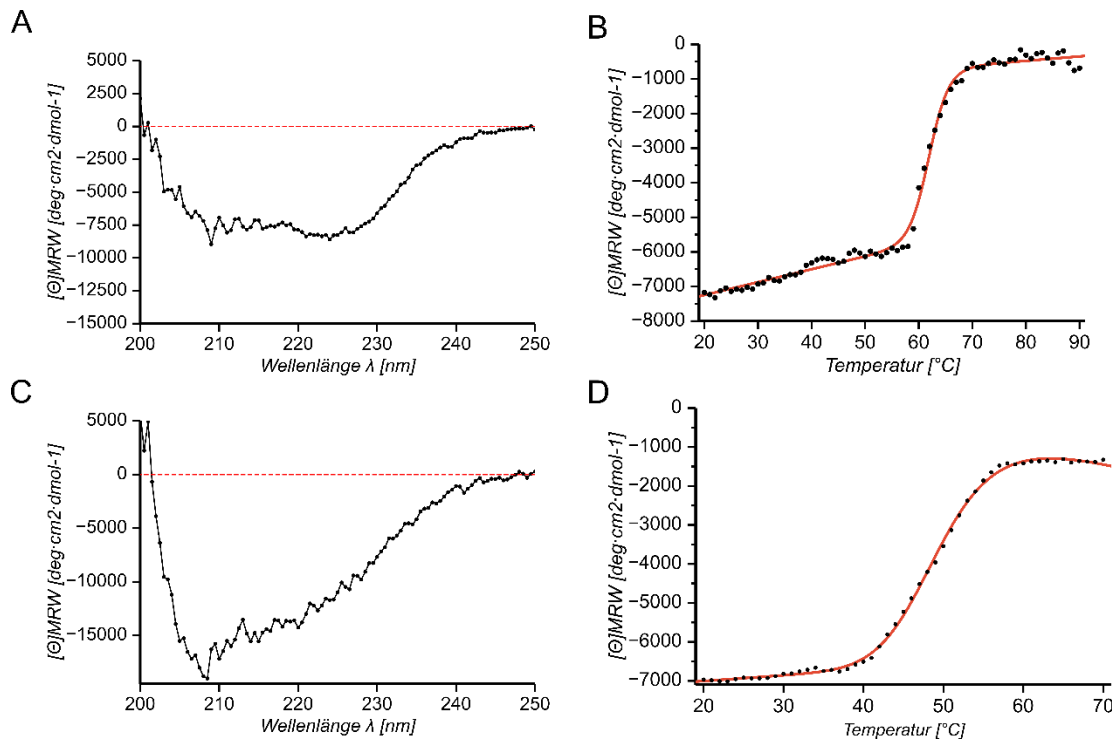
Die Eigenschaften und Aktivitäten der NsPAL Proteine wurden im Rahmen einer Bachelorarbeit genauer charakterisiert (Bachelorthesis Paul Müller, Universität Bayreuth, 2019). Dabei wurde argumentiert, dass die Vollängenproteine eine aufwändige Optimierung der Reinigungsprotokolle erfordern und den direkten Vergleich mit NmPAL erschweren könnten, sodass die in Abbildung 27 markierten trunkierten Varianten für die Analyse eingesetzt wurden. Aus zeitlichen Gründen war eine Analyse der erst Ende 2019 identifizierten NfPAL-Variante nicht möglich. Während die Reinigung von NsPAL2 analog zu der von NmPAL erfolgreich durchgeführt wurde, erforderte die Reinigung von NsPAL1 eine höhere Salzkonzentration zur Stabilisierung des Proteins.



**Abbildung 28 Analyse der Photochemie von NsPAL1 und NsPAL2:** In A ist das Absorptionsspektrum von NsPAL1 im Dunkeln (schwarz) und im Licht (blau) bei 22 °C dargestellt, die Rückkehrkinetik des Proteins bei 22 °C mit einer Halbwertszeit von  $59 \pm 2$  s in B. C und D zeigen die gleichen Daten für NsPAL2 bei 16 °C mit einer Halbwertszeit von  $5077 \pm 184$  st.

Beide Proteine wiesen nach der Reinigung eine gelbe Farbe auf, was für die Integration des Chromophors in die Proteinstruktur spricht. Dies wurde durch die Aufnahme von Absorptionsspektren, die die typische Signatur des Flavinmononukleotids tragen, bestätigt (Abbildung 28A,C). Beide Proteine durchlaufen einen intakten Photozyklus, überraschenderweise kehrt NsPAL1 um ein Vielfaches schneller in den Dunkelzustand zurück als NmPAL, die Halbwertszeit des lichtadaptierten Zustands beträgt bei 22 °C nur  $59 \pm 2$  s (Abbildung 28B). NsPAL 2 zeigt hingegen eine sehr viel langsamere Rückkehrkinetik, die bei 16 °C mit  $5077 \pm 184$  s eine höhere Halbwertszeit als PAL mit  $2200 \pm 50$  s aufweist (Abbildung 28D). Die Bestimmung der Halbwertszeit bei 22 °C scheiterte an der geringen Stabilität von NsPAL2 bei höheren Temperaturen über den langen Messzeitraum, es wird von einem Wert zwischen 2000 s und 5000 s ausgegangen. Die unterschiedlichen Halbwertszeiten sind insofern von Interesse, dass sie eine andere Lichtsensitivität der PAL Homologe aufzeigen. Das nur langsam in den Dunkelzustand zurückkehrende NsPAL2 kann mit einer viel kürzeren und weniger intensiven Beleuchtung zur Signalweiterleitung angeregt werden als NmPAL oder NsPAL1, wobei letzteres aufgrund seiner schnellen Rückkehrkinetik nur durch kontinuierliche Beleuchtung zur stabilen Signaltransduktion angeregt werden kann. Diese Eigenschaften würde die Anwendung der Kombination der Proteine in einem einzigen System erlauben, in dem durch Variation der Lichtdosis dennoch definierte Varianten gezielt angeregt werden können (72).

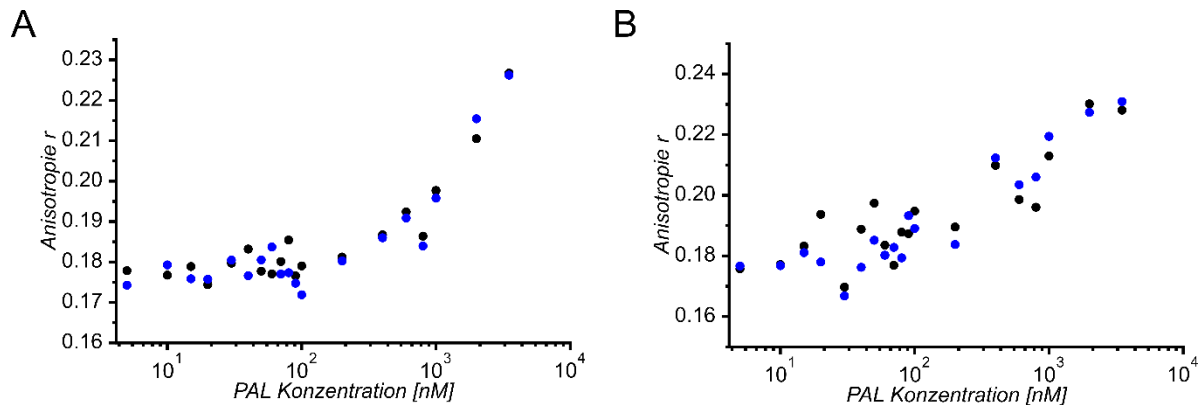
Zur Untersuchung des Faltungszustands und der Stabilität der Proteine wurden CD-Spektren und Schmelzkurven aufgenommen (Abbildung 29). Das CD-Spektrum von NsPAL2 zeigt schon bei 22 °C einen reduzierten helikalen Anteil, was mit den Problemen der Messung der Rückkehrkinetik bei 22 °C korreliert. Der Schmelzpunkt von NsPAL1 ist mit  $61 \pm 0,18$  °C höher als der von NmPAL (50 °C), was auf eine erhöhte thermische Stabilität hinweist. Ein Einfluss der erhöhten Salzkonzentration auf die Stabilität ist aber nicht auszuschließen. Die thermische Stabilität von NsPAL2 ist mit  $50,3 \pm 0,17$  °C nicht geringer als die des NmPAL. Die Aggregation im Verlauf der UV/Vis-Messung sowie die Abweichungen im CD-Spektrum sind also nicht von globalen Entfaltungsprozessen abhängig, könnten aber durch die partielle Entfaltung einzelner Domänen entstehen. Gegebenenfalls wird durch das Entfernen der C-terminalen Sequenz die Stabilität der LOV-Domäne beeinflusst. Indem Proteinkonstrukte mit längeren, C-terminalen Sequenzen getestet werden, könnte die Stabilität des Proteins erhöht werden.



**Abbildung 29 Analyse der Faltung und Stabilität von NsPAL1 und NsPAL2:** In A und B ist das CD-Spektrum bei 22 °C sowie die thermische Entfaltung anhand des CD-Signals bei 220 nm in Abhängigkeit von der Temperatur für NsPAL1 gezeigt. C und D zeigen dieselben Daten für NsPAL2.

Beide PAL-Homologe konnten stabil exprimiert und isoliert werden und durchlaufen einen intakten Photozyklus. Es steht zu vermuten, dass die Proteine ebenfalls zur lichtabhängigen RNA-Bindung fähig sind. Der Sequenzvergleich mit Variationen in der erweiterten ANTAR-Domäne und dem Adapter zwischen ANTAR- und LOV-Domäne deutet aber auf die Anpassung an eine andere Zielsequenz hin.

Dies wurde durch Anisotropie-Experimente bestätigt. Weder NsPAL1 noch NsPAL2 zeigen eine lichtabhängige Interaktion mit dem TAMRA-markierten 04.17 Aptamer (Abbildung 30). Eine schwache, lichtunabhängige Interaktion wird durch die mit zunehmender NsPAL Konzentration zunehmenden Anisotropiewerte belegt, die  $K_D$ -Werte sind jedoch zu hoch um in diesem Experiment sicher bestimmt zu werden. Die spezifische Interaktion mit dem identifizierten NmPAL-Aptamer 04.17 ist daher auszuschließen. Nicht nur aufgrund der oben erwähnten parallelen Anwendung der PAL-Homologen in einem System ist die Identifizierung von RNA-Bindepartnern für die NsPALs von großem Interesse. Durch den Vergleich der RNA-Sequenzen miteinander und mit den Genomen der Bakterien können auch Hinweise auf die Voraussetzung für die Interaktion mit der ANTAR-Domäne sowie die natürlichen Bindepartner gefunden werden. Daher wurden, analog zu NmPAL, gereinigtes Protein für die Selektion von Bindepartnern durch SELEX eingesetzt. Die Ergebnisse dieser Experimente liegen zum Zeitpunkt des Verfassens dieser Arbeit noch nicht vor.



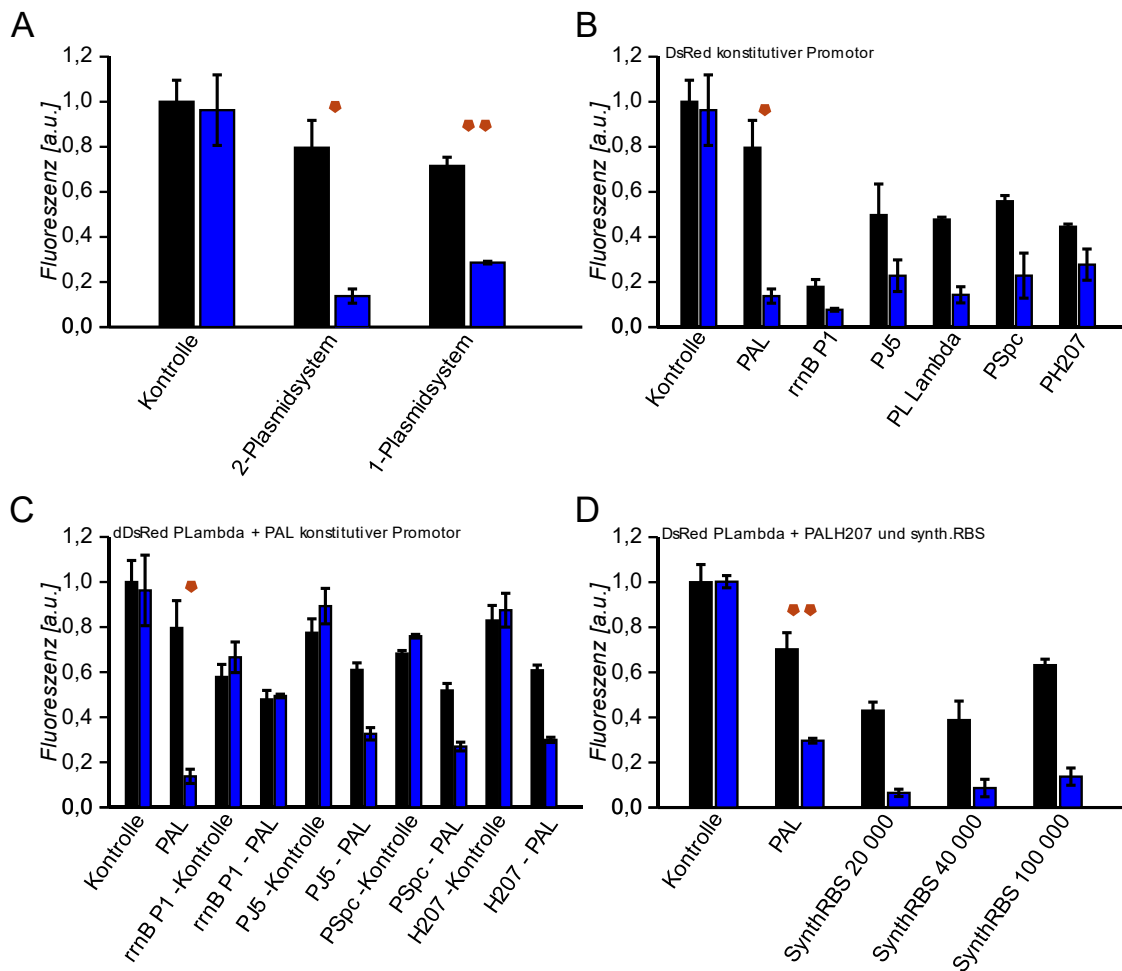
**Abbildung 30** Messung der Interaktion zwischen dem 04.17 Aptamer und NsPAL1 und 2: Diagramme A und B zeigen die Änderung der Fluoreszenzanisotropie des 5'-TAMRA markierten 04.17 Aptamers im Dunkeln (schwarz) und nach Blaulichtbestrahlung (blau) bei zunehmender Konzentration von NsPAL1 (A) und NsPAL2 (B).

### 3.5 Einsatz des optimierten Reporterassays zur Analyse von Aptamervarianten

Eine weitere Möglichkeit, Aptamere für die spezifische Interaktion mit den NsPAL-Proteinen zu identifizieren, ist das Testen von variierten Aptameren im etablierten Reportersystem. Auch könnten auf diese Weise Aptamersequenzen ermittelt werden, die in Kombination mit NmPAL eine höhere Schaltbarkeit aufweisen.

Der zuvor beschriebene bakterielle Reporter-Assay konnte mit großem Erfolg für die Analyse von spezifischen Mutationen eingesetzt werden (Vgl. 3.2 Etablierung eines bakteriellen Reportersystems und Struktur-Funktionsanalyse von PAL, allerdings führen die zwei eingesetzten, induzierbaren Plasmide zu einer komplizierten Handhabung, die zwei separate Plasmidtransformationen, eine Normierung auf vergleichbare optische Dichten zu Beginn des Experiments sowie zwei separate Induktionsschritte erfordert. Dies hatte zu Beginn der Experimente den Vorteil, dass zum Optimieren des Systems viele Parameter variiert werden konnten, verringerte jedoch die Reproduzierbarkeit und erschwerte die Entwicklung von Verfahren für höheren Durchsatz der Analysen. Die Fusion der beiden verwendeten Plasmide zu einem einzigen, die beiden Komponenten konstitutiv exprimierenden Vektor, würde sowohl die Handhabung vereinfachen als auch die Reproduzierbarkeit erhöhen.

Um das zu erreichen, wurde im Rahmen einer Masterarbeit (Masterthesis Marc Juraschitz, Universität Bayreuth, 2019) zunächst die Expressionskassette des rot-fluoreszierenden Proteins auf das PAL-exprimierende Plasmid übertragen. Unter den gleichen Induktionsbedingungen wie das Zweiplasmidsystem zeigte sich eine verringerte Lichtantwort (Abbildung 31A), die auf die veränderte Expression des Proteins zurückzuführen ist.



**Abbildung 31 Entwicklung und Optimierung des Einplasmidsystems:** Die Abbildung zeigt die relative DsRed Fluoreszenz von *E. coli* Kulturen der einzelnen Konstrukte nach 16-stündiger Inkubation im Dunkeln (schwarz) oder unter Blaulichtbestrahlung (450 nm, 40  $\mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$ , blau). In A ist das Ergebnis der Übertragung der induzierbaren Konstrukte auf ein Plasmid, B zeigt die Einführung von konstitutiven Promotoren für die Expression des rot fluoreszierenden Proteins. In C ist die Kombination des PLambda Vektors für DsRed mit verschiedenen konstitutiv exprimierenden PAL-Varianten und D die weitere Optimierung des Systems durch Variation der 5'-untranslatierten Region der mRNA. Die Zahlen definieren dabei die berechnete Effizienzsteigerung der PAL-Expression. ● indiziert die Positivkontrolle des Zweiplasmidsystems ●● indiziert die Positivkontrolle des Einplasmidsystems. Daten erhoben im Rahmen einer Masterarbeit (Marc Juraschitz, Universität Bayreuth (2019)).

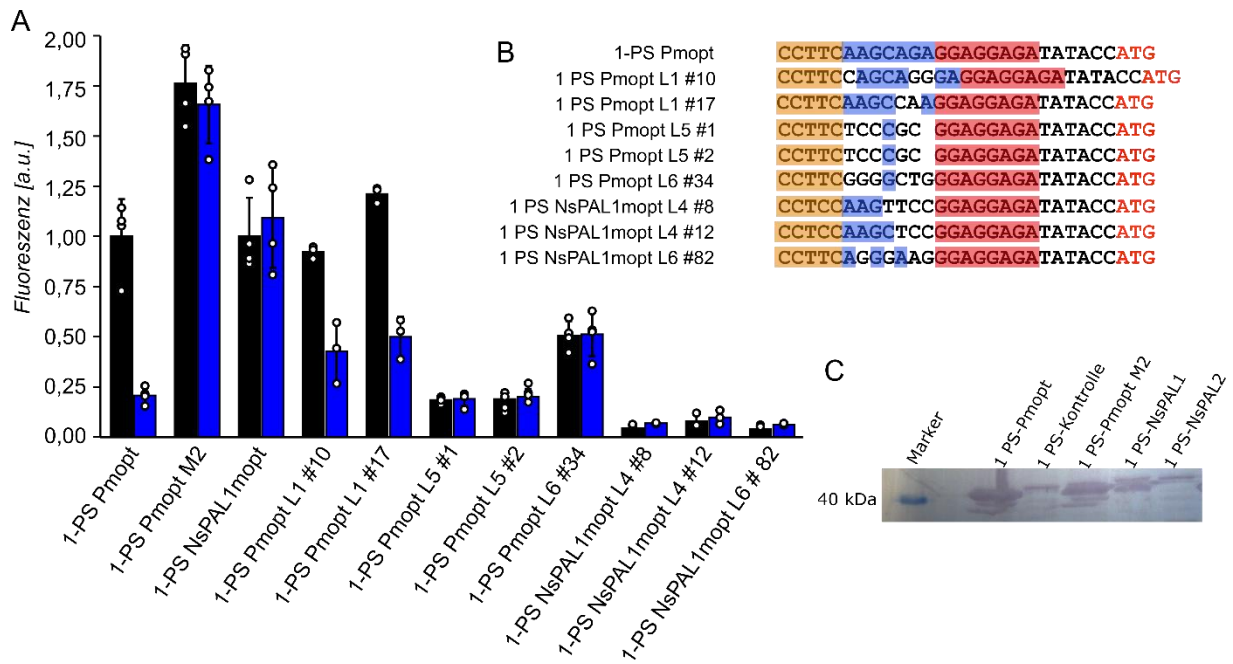
Der Test verschiedener konstitutiver Promotoren für die Expression von DsRed zeigte, dass diese Promotoren wie erwartet schwächer waren als der zuvor verwendete T7 Promotor, was sich an der verringerten Fluoreszenzentwicklung zeigt (Abbildung 31B). Die geringe Expression des Reportergens führte zu einer teilweise nur knapp dreifachen Lichtantwort. Für die weitere Entwicklung wurde der konstitutive Promotor PL Lambda für das Reportergen ausgewählt, da hier die stärkste Lichtantwort nachweisbar war. Das Einbringen eines konstitutiven Promotors für PAL führte zu einer weiteren Reduktion der Schaltbarkeit, die bei der optimalen Promotorenkombination von Fluoreszenzprotein PL Lambda und PAL H207 nur noch eine Abnahme der Fluoreszenz im Licht um 50 % auslöste (Abbildung 31C).

Dieses Ergebnis konnte verbessert werden, indem der 5'-untranslatierte Bereich der PAL-Expressionskassette mithilfe der *RBS-Calculator Software* (73) für eine bessere Interaktion mit dem Ribosom und damit eine höhere Translationseffizienz optimiert wurde. Dadurch wird eine Schaltbarkeit erreicht, die mit der des originalen Zweiplasmidsystems vergleichbar ist (Abbildung 31D). Der vereinfachte experimentelle Ablauf erleichtert das Testen einer großen Anzahl von Klonen, die durch zufällige Mutagenese erstellt wurden.

Da die beiden NsPAL Proteine keine Interaktion mit denen für das NmPAL entwickelten Aptameren zeigen, könnte durch zufällige Variation des Aptamerbereichs ein bindendes Aptamer identifiziert werden. Auch das Identifizieren von Aptameren, die im NmPAL System eine verbesserte Schaltbarkeit aufweisen sollte möglich sein.

Dazu erfolgte zunächst das Einbringen der NsPAL-Proteine in den Kontext des Einplasmidsystems. Bei einer *Western-Blot-Analyse* des *Myc-tags* am C-terminus der NsPAL-Varianten zeigte sich, dass für NsPAL2 keine Expression des Proteins nachweisbar war, der Blot weist nur eine unspezifische Bande auf, die auch in der Negativkontrolle ausgebildet wird (Abbildung 32C). Daher wurde NsPAL2 in den weiteren Analysen vernachlässigt. Um die im Assay-System verwendete Negativkontrolle weiter an das Testsystem anzunähern, wurde die Aptamervariante M2 im Assay getestet, die in *in vitro* Experimenten durch eine Punktmutation in der Schleifensequenz keine Interaktion mit PAL mehr aufweist. Auch im Assay wird keine Lichtschaltbarkeit mehr gemessen (Abbildung 32A), es wird durch Destabilisierung der Haarnadelstruktur an der *Shine-Dalgarno* Sequenz sogar eine höhere, konstitutive Fluoreszenz erreicht. Da in diesem Fall die Kontrolle nur durch eine Punktmutation vom 10-fach schaltbaren Assay-System abweicht, stellt sie eine Verbesserung gegenüber der zuvor verwendeten Kontrolle dar, in der PAL nicht exprimiert wurde.

Das Einbringen von NsPAL1 in den Assay-Kontext unterbindet die Lichtantwort des Systems, hat aber keinen Einfluss auf die maximale Fluoreszenzintensität. Durch den Einsatz von Primern mit degenerierter Sequenz wurde über PCR-Klonierung die Aptamersequenz sowohl für das NmPAL- als auch das NsPAL1-System variiert. An jeder Stelle der Aptamerschleife kann in den Primern jede der vier Basen auftreten. Bei der Primersynthese wurde jedoch ein Überschuss der ursprünglichen Base von 4:2:2:2 eingesetzt, was eine bevorzugte Integration von interagierenden Resten in die Primer auslöst. Durch PCR-Reaktionen mit diesen Überhangsprimern (Vgl. 2.7.2. Polymerasekettenreaktion), werden die sieben Nukleotide der Haarnadelschleife durch zufällige Nukleotide ersetzt, was einer theoretischen Bibliotheksgröße von 16384 Konstrukten entspricht.



**Abbildung 32 Analyse von NsPAL1 und Konstruktbibliotheken im Einplasmidsystem:** Grafik A zeigt die relative DsRed Fluoreszenz von *E. coli* Kulturen der einzelnen Konstrukte nach 16-stündiger Inkubation im Dunkeln (schwarz) oder unter Blaulichtbestrahlung (450 nm, 40  $\mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$ , blau). In B sind die Sequenzen der getesteten Aptamervarianten im Vergleich zur Ursprungssequenz gezeigt, der Stamm ist in orange hinterlegt, die konservierten Reste der Schleife in blau und die Shine-Dalgarno Sequenz, die den zweiten Teil des Stamms bildet, in rot. C zeigt die Expression der verschiedenen PAL-Varianten im Western-Blot.

Die erhaltenen Konstruktbibliotheken wurden zunächst in einen Klonierstamm transformiert und daraus gewonnene Plasmid-DNA in den Expressionsstamm überführt, um eine möglichst große Konstruktpalette auf ihr Fluoreszenzverhalten hin untersuchen zu können. Die Klone wurden anhand der Fluoreszenzentwicklung auf Agarplatten im Dunkeln und unter Blaulichteinstrahlung für eine weitere Analyse ausgewählt. Konstrukte, die lichtabhängige Fluoreszenzunterschiede zeigten wurden im bakteriellen Assay getestet und anschließend sequenziert. Sowohl für NmPAL als auch für NsPAL1 konnten aus acht Bibliotheken trotz hoher Transformationseffizienz und über 100 Klonen pro Konstrukt pro Transformationsansatz nur wenige Aptamere mit neuartigem Verhalten identifiziert werden (Abbildung 32A). Von fünf variierten NmPAL-Aptameren sind nur zwei lichtschaltbar, während die restlichen eine konstitutiv niedrige Fluoreszenz aufweisen. Während die schaltbaren Varianten #10 und #17 nur einzelne Mutationen aufweisen, zeigen die konstitutiv niedrig fluoreszierenden Varianten starke Abweichungen in der Schleifen-Region des Aptamers. Einige dieser Aptamere ändern mutmaßlich die RNA-Struktur im Bereich der Ribosomenbindestelle derart ab, dass eine effiziente Translationsinitiation unterbunden wird, sodass die beobachtete Fluoreszenzänderung nicht durch PAL-Bindung, sondern durch eine Verringerung der Proteinexpression ausgelöst wird.

Dasselbe gilt auch für die isolierten NsPAL1-Aptamere, die alle eine konstitutiv niedrige Fluoreszenz aufweisen. Insgesamt demonstrieren die Ergebnisse, dass die verwendete Bibliothek zwar eine große Variation der Aptamersequenzen ermöglicht, die durch die Ungenauigkeit bei der Ligation der linearen PCR-Produkte auch in ihrer Länge verändert werden kann.

Das Testsystem sollte jedoch verbessert werden. Durch die zeitaufwändige Analyse der einzelnen Agarplatten wurden nur ca. 10% der Anzahl der theoretisch möglichen Konstrukte beprobt, was sich aus den acht Bibliotheken, die in je zwei Transformationsansätzen zu ca. 100 Kolonien/Platte analysiert wurden, errechnen lässt. Zudem ist die Abnahme der Fluoreszenz alleine kein hinreichender Beweis für die Bindung des Aptamers an PAL, dafür muss die Lichtschaltbarkeit des Systems nachgewiesen werden. Eine Möglichkeit wäre die Analyse und Sortierung der Konstrukte durch Fluoreszenzvermittelte Zellsortierung (FACS).

Hier könnte im hohen Durchsatz alle erhaltenen Klone nach Inkubation im Licht analysiert und Konstrukte mit niedriger Fluoreszenz isoliert werden, welche dann nach anschließender Dunkelinkubation auf hohe Fluoreszenz selektiert werden, um so schaltbare Konstrukte zu erhalten. Mehrere Wiederholungen dieses Verfahrens sollten zu einer Anreicherung lichtschaltbarer Konstrukte führen, die dann genauer analysiert werden können.

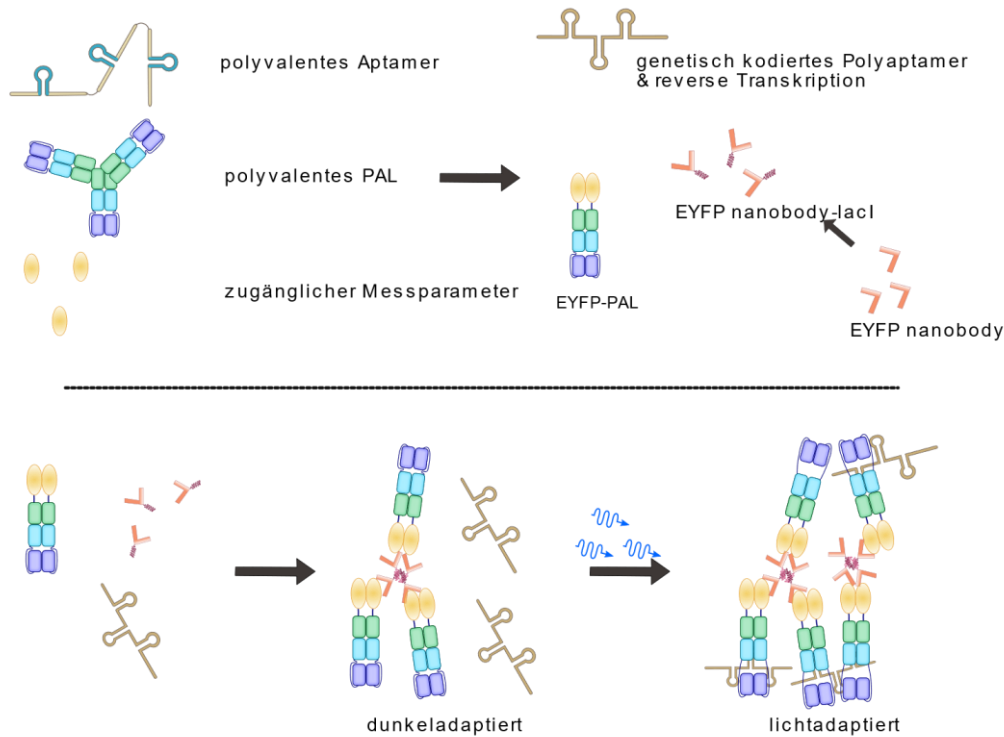
Ein weiterer Grund für den geringen Erfolg bei der Identifizierung von NsPAL1-Aptamer Varianten kann die Verwendung des trunkierten Konstrukts sein. Gegebenenfalls sind die entfernten Bereiche für die RNA-Interaktion von Bedeutung, auch wenn die Aktivität von NmPAL das nicht vermuten lässt. Auch die Anpassung an insgesamt längere oder strukturell anders aufgebaute RNA-Sekundärstrukturen des Proteins ist denkbar, die von der erstellten Bibliothek nicht abgedeckt werden.



### 3.6 PAL als Instrument für lichtabhängige Phasenseparation

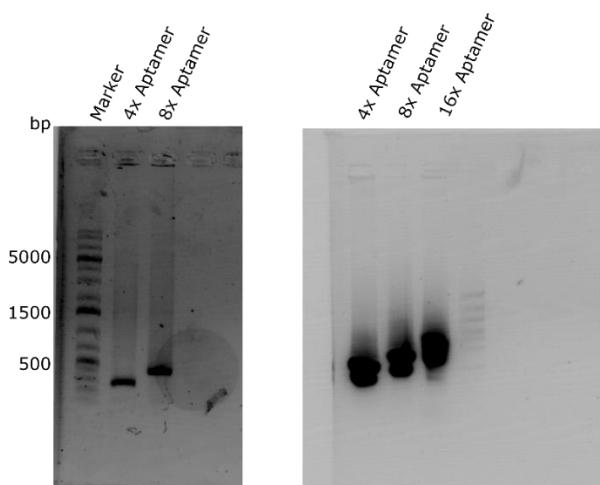
Es gibt viele RNA-basierte zelluläre Prozesse die von einer ort- und zeitspezifischen Kontrolle von RNA-Spezies profitieren würden. Einer dieser Prozesse ist die sogenannte Flüssig-Flüssig-Phasenseparation (*liquid-liquid-phase-separation*, LLPS) (74). Als Phasenseparation bezeichnet man dabei die Anreicherung bestimmter Komponenten in Lösung in Abgrenzung zur Umgebung ohne physikalische Abtrennung durch eine Membran. Das bekannteste Beispiel hierfür ist der Nukleolus in eukaryotischen Zellkernen. Auch viele andere Prozesse des RNA-Metabolismus und der RNA-Regulation sind durch LLPS reguliert (75). Das lichtabhängige Ausbilden solcher MLOs könnte nicht nur zum Verständnis der Bildung und der Dynamik solcher Systeme beitragen, sondern auch eine Grundlage für die optogenetische Kontrolle der spatiotemporalen Verfügbarkeit vieler verschiedener RNA-Spezies in der Zelle sein.

Die Interaktion eines Proteins mit einem RNA-Molekül ist für das Ausbilden von den angestrebten größeren Netzwerken allerdings nicht ausreichend. Es sollten daher für die Untersuchungen sowohl polyvalente Aptamervarianten als auch mehrere Aptamere bindende PAL-Varianten hergestellt werden (Abbildung 33). Die erneute Fluoreszenzmarkierung der erhaltenen langen RNA-Sequenzen ist unpraktikabel. Daher wurden unmarkierte Polyaptamere durch Restriktionsklonierung und *in vitro* Transkription erhalten (Abbildung 33). Es wurden 4x – 8x- und 16x-Polyaptamere hergestellt. Die Eigenfluoreszenz von PAL ist äußerst gering und die Exzitation würde zudem den Photozyklus anregen, sodass eine langfristige Beobachtung des Systems im dunkeladaptierten Zustand nicht möglich wäre. Für die initiale Untersuchung des Systems *in vitro* wäre es außerdem von Vorteil, ein messbares Signal für das System sowohl im Dunkeln als auch im Licht zu erhalten. Daher wurde EYFP als Fluoreszenzmarker an den N-Terminus von PAL fusioniert. Das Fusionskonstrukt aus EYFP und PAL kann durch den Einsatz eines tetrameren EYFP-*nanobodies* (76), also eines Einzeldomänen-Antikörpers der mit EYFP interagiert, zu polyvalenten RNA-Bindern zusammengefasst werden (Abbildung 33). Indem die *lacI*-Helix (77) aus *E. coli* an den C-Terminus des Antikörpers fusioniert wird, soll ein tetramerer *nanobody* erhalten werden. Somit sollte die Ausbildung von größeren Netzwerken aus RNA und Proteinen, analog zu den MLOs der Zelle, im Prinzip möglich sein.



**Abbildung 33 Prinzip der Flüssig-Flüssig Phasenseparation mithilfe von PAL:** Im oberen Bereich der Abbildung sind die notwendigen Komponenten für das durchführen der in vitro Experimente zur Phasenseparation aufgeführt, im unteren Bereich die lichtabhängige Auszubildung von größeren, phasenseparierten Netzwerken der interagierenden Komponenten.

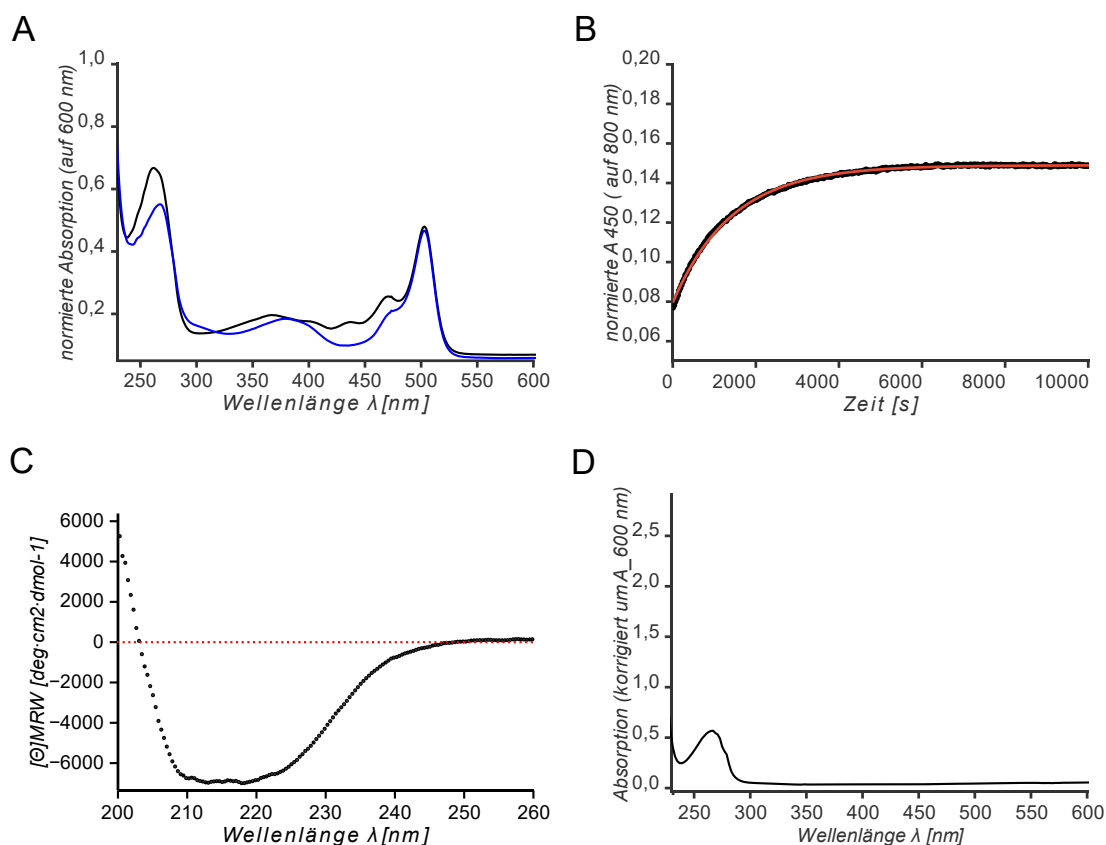
EYFP-PAL konnte mit dem für PAL etablierten Reinigungsprozess erhalten werden (Abbildung 34A). Als Expressionsstamm wurde im Gegensatz zur PAL-Reinigung *E. coli Arctic Express* verwendet, der eine Proteinexpression bei niedrigerer Temperatur von 12 °C im Vergleich zu 16 °C über einen längeren Zeitraum hinweg erlaubt, wobei zusätzliche Chaperone die effiziente Faltung des Proteins unterstützen.



**Abbildung 34 Synthese der Poly-Aptamer-Zielsequenzen:** Auf der linken Seite ist exemplarisch die Analyse der PCR-Amplifikation der Polyaptamer-Zielsequenzen und auf der rechten Seite die Banden der synthetisierten Polyvalenten RNAs auf 1%-Agarosegelen zu sehen

Die Gewinnung der Polyaptamere durch *in vitro* Transkription erbrachte hohe Ausbeuten. Das Agarosegel zeigt bei der Analyse der Produkte Doppelbanden, also zwei separate Produkte (Abbildung 34B). Eine Entstehung von verschiedenen Produkten durch Abbrechen der Polymerase von den stabilen Haarnadelstrukturen ist denkbar. Da die zweite Bande mit der Größe der zu erhaltenen Polyaptamere ebenfalls ansteigt, ist der Abbruch der reversen Transkription an immer derselben Stelle aber auszuschließen. Wahrscheinlicher ist stattdessen eine Interaktion der repetitiven Haarnadelstrukturen untereinander, die zum Ausbilden der zweiten Bande führen. Die *nanobody-lacI* Fusion konnte durch Affinitätschromatographie und anschließende Ionenaustauschchromatographie in hoher Reinheit gewonnen werden.

Die spektrale Analyse von EYFP-PAL (Abbildung 35A) zeigt sowohl die Absorption des Fluorophors bei 500 nm als auch die markanten Absorptionsmaxima des Flavinmononukleotids. Die Lichtschaltbarkeit des Fusionsproteins bleibt erhalten, wie am Absorptionsspektrum nach Beleuchtung zu sehen ist. Mit  $1422 \pm 32$  s ist die Halbwertszeit im Vergleich zum NmPAL verkürzt (Abbildung 35B).

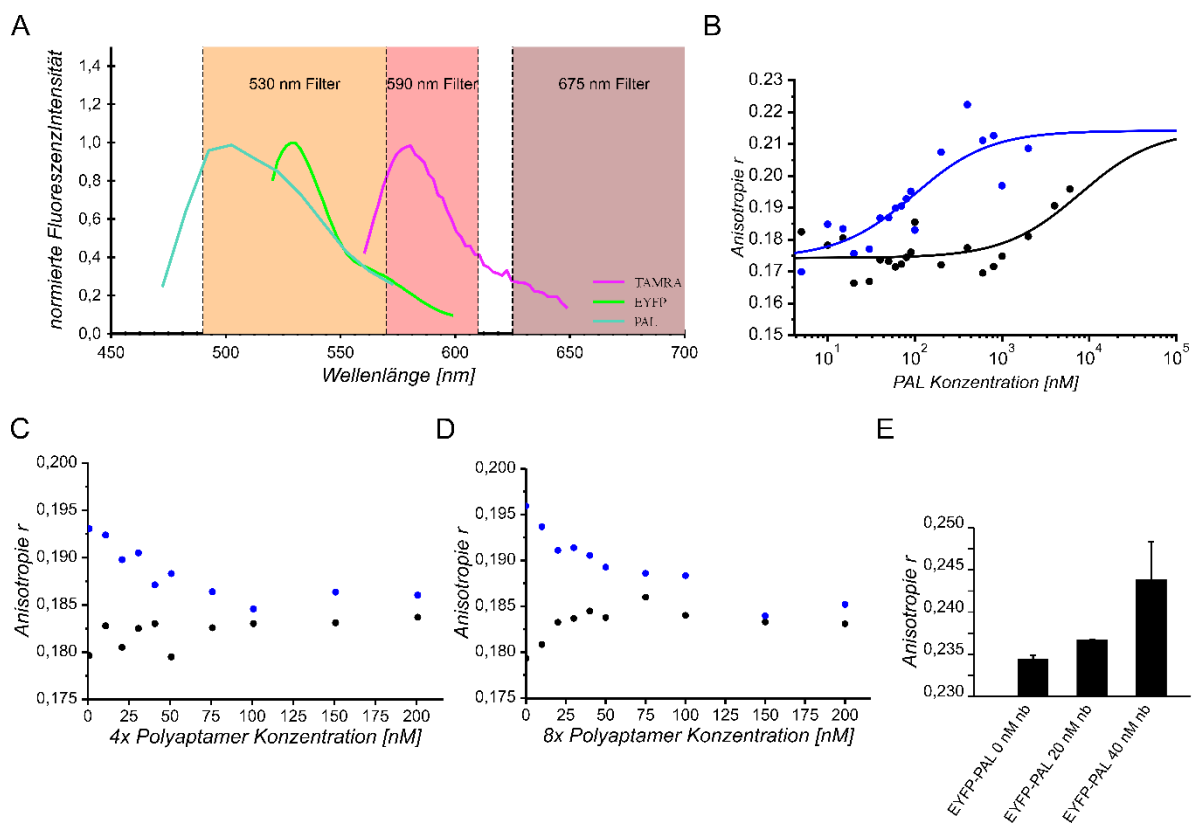


**Abbildung 35 Spektrale Untersuchung der LLPS Komponenten:** In A ist das Absorptionsspektrum von EYFP-PAL im Dunkeln (schwarz) und im Licht (blau) bei 22 °C dargestellt, die Rückkehrkinetik des Proteins bei 22 °C mit einer Halbwertszeit von  $1422 \pm 32$  s in B. C zeigt das CD-Spektrum von EYFP-PAL bei 22 °C, D das Absorptionsspektrum der nanobody-lacI Fusion bei 22 °C.

Das CD-Spektrum zeigt keine entfalteten Bereiche für das Fusionsprotein (Abbildung 35C). Das UV-Vis Spektrum des *nanobodies* weist nicht auf Aggregate oder ausgefallenes Protein hin, wie sie während der Reinigung teilweise beobachtet wurden (Abbildung 35D).

Um die Komponenten für die lichtabhängige Phasenseparation einzusetzen, muss das Fusionsprotein aus EYFP und PAL weiterhin mit seinem RNA-target interagieren. Es muss ebenfalls gewährleistet sein, dass die Polyaptamertargets nicht aufgrund von ausgebildeten Sekundärstrukturen eine geringe Affinität zu PAL aufweisen. Außerdem muss der polyvalente Zustand des *nanobody-lacI* Fusionsproteins sowie dessen effiziente Interaktion mit EYFP gewährleistet sein.

Die Emissionsspektren von TAMRA und EYFP überlappen teilweise, sodass eine Interaktionsmessung mit den etablierten Anisotropiemethoden erschwert wurde (Abbildung 36A). Die Messung der EYFP-Fluoreszenz als Messparameter scheitert am Einfluss der vom Flavin-Chromophor ausgelösten PAL-Fluoreszenz in den benötigten Filterbereich des Geräts.



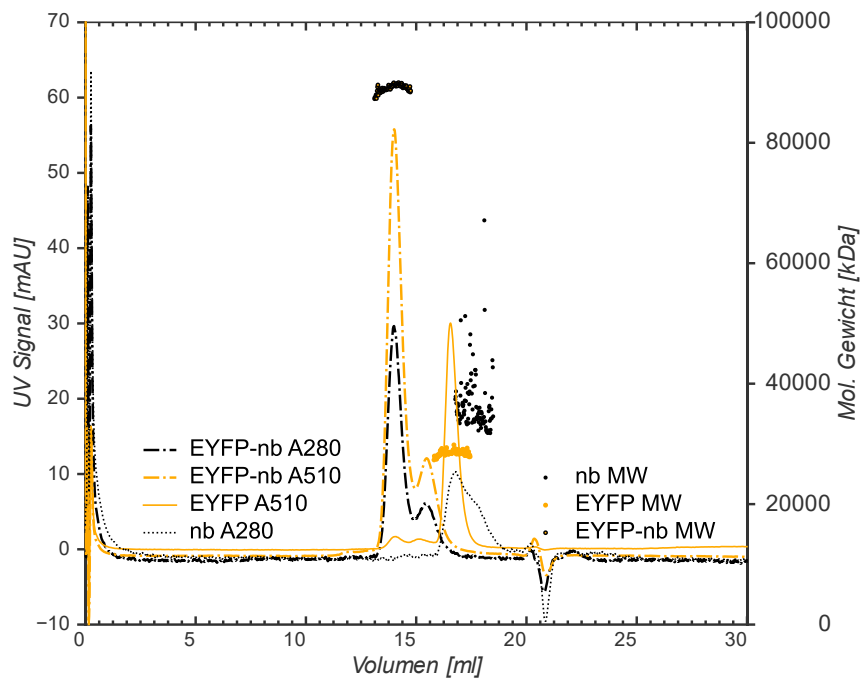
**Abbildung 36 Anisotropie-Untersuchungen zur Interaktion von EYFP-PAL und Polyaptameren:** Panel A zeigt die Fluoreszenzemissionsspektren der einzelnen Komponenten des Systems und die für die Messung verfügbaren Filter. B zeigt die lichtabhängige Änderung der Anisotropie nach Beleuchtung (blau) für die Interaktion von RNA-Aptameren mit dem EYFP-PAL Fusionsprotein im Vergleich zu den Dunkelwerten (schwarz). C und D zeigen die Änderung der Anisotropie im Dunkeln (schwarz) und im Licht (blau) bei zunehmender Konzentration von unmarkierten Kompetitor-Polyaptameren sowohl für das 4x als auch für das 8x Polyaptamer. E zeigt den Anstieg der Anisotropie durch Zugabe von steigenden Konzentrationen des EYFP-nanobody-lacI Konstruktes zu gleichbleibender EYFP-PAL Konzentration im Dunkeln. Während in B, C, und D der 675 nm Filter verwendet wird, um die TAMRA-Fluoreszenz zu messen, wird in E mit dem 530 nm Filter die EYFP-PAL Fluoreszenz beobachtet.

Daher wurde die Interaktion zwischen EYFP-PAL und 5'-TAMRA-markiertem 04.17 Aptamer mittels eines in den höherwelligen Messbereich verschobenen Filters (um 675 nm) gemessen. Dies erlaubte die Messung der lichtabhängigen Interaktion von EYFP-PAL mit seiner Zielsequenz 04.17 mit einer Dissoziationskonstante von  $98 \pm 52$  nM nach Beleuchtung (Abbildung 36B). Durch Konkurrenz der Polyaptamer-*targets* gegen die TAMRA-markierte Zielsequenz konnte deren Interaktion mit EYFP-PAL bewiesen werden. Dabei ist eine lichtabhängige Änderung der Anisotropie des TAMRA-*tags* nur bei niedrigen Konkurrentkonzentrationen messbar, bei hohen Konzentrationen verdrängen die unmarkierten Polyaptamere das 04.17-Aptamer aus der Interaktion mit PAL (Abbildung 36C und D).

Die Interaktion des *nanobody-lacI*-Konstrukts mit EYFP-PAL kann in einer Anisotropie Messung anhand von steigenden Anisotropie-Werten bei steigender *nanobody*-Konzentration nachgewiesen werden (Abbildung 36E), allerdings erlaubt dies keine Angabe über die Polyvalenz der *nanobody*-Spezies. Außerdem kann das lichtabhängige Verhalten aufgrund der Überlappung der Emissionsspektren von EYFP und PAL in diesem Messansatz nicht beobachtet werden.

Um eine Aussage zur Valenz des *nanobodies* und der Stöchiometrie der Interaktion mit EYFP wurden daher Größenausschlusschromatographie in Kombination mit Vielwinkel-Lichtstreuung zurückgegriffen (Abbildung 37). Dabei wurde auf die Verwendung des EYFP-PAL Fusionsproteins verzichtet, um lichtabhängige Effekte während der Messung auszuschließen. Der *nanobody* weist in der UV-Spur ein sehr breites Maximum auf, das auf mehrere vorhandene Proteinspezies hinweist. Die Berechnung des Molekulargewichts anhand des Elutionsvolumens ergaben Größen von 14-24 kDa, was zwischen den erwarteten Werten eines Monomers und eines Dimers liegt. Die Werte sind aufgrund der nicht globulären Struktur des *nanobodies* vermutlich fehlerbehaftet, es kann aber davon ausgegangen werden, dass keine tetrameren Spezies, wie durch das Design des Proteins erwartet wurden, vorhanden sind.

Die Lichtstreuungs-Experimente wurden bei höheren Konzentrationen durchgeführt und zeigen für den *nanobody* eine starke Streuung der Messergebnisse und eine Abweichung der berechneten Größe im Vergleich zu den Ergebnissen der Größenausschlusschromatographie. Die starke Streuung macht die Ergebnisse unzuverlässig und kann durch die nicht-globuläre Proteinstruktur und verschiedene, im Gleichgewicht stehende Proteinspezies ausgelöst werden. Auch höhere Oligomere, etwa die angestrebten Tetramere können vorkommen.

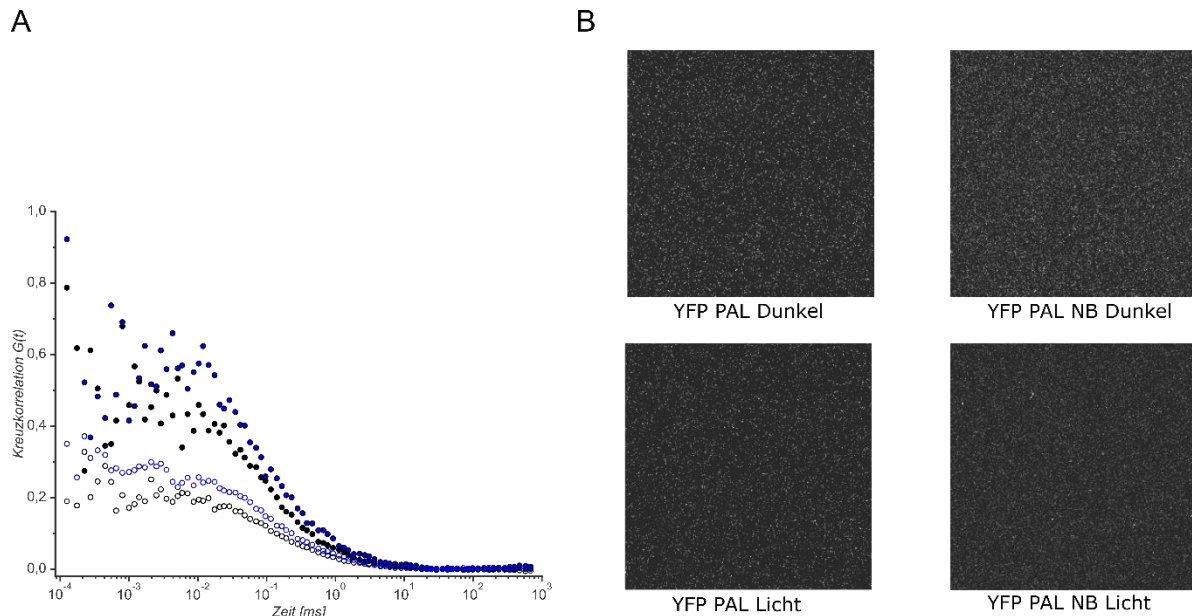


**Abbildung 37 Größenausschlusschromatographie und Vielwinkel-Lichtstreuung der Interaktion von EYFP und nanobody-lacI:** Auf der Abbildung ist sowohl die Stärke des UV-Signals in Abhängigkeit vom Elutionsvolumen der Größenausschlusschromatographie (linke Achse, Linien) als auch das berechnete Molekulargewicht der entsprechenden Maxima der Vielwinkel-Lichtstreuung (rechte Achse- Punkte) aufgetragen. Gemessen wurden sowohl die einzelnen Komponenten EYFP (gelb, undurchbrochen), nanobody (schwarz, undurchbrochen) und die ausgebildeten EYFP-nanobody Komplexe (schwarz und gelb, durchbrochen). Für EYFP wurde neben dem UV-Signal auch die Absorption des Fluorophors aufgezeichnet, was eine Aussage zu der Zusammensetzung der EYFP-nanobody Komplexe ermöglicht.

Insgesamt zeigt sich, dass die lacI-Fusion des *nanobodies* keine definierten, oligomeren Spezies entstehen lässt, was für Interaktionsmessungen problematisch ist. Sowohl für EYFP als auch für den Komplex aus EYFP und *nanobody* konnten durch Vielwinkel-Lichtstreuung sehr scharfe Größenverteilungen berechnet werden, die mit jeweils 28 kDa und 89 kDa gut mit den durch Chromatographie ermittelten Werten von 26 kD und 89 kDa übereinstimmen. Diese Größen entsprechen für EYFP einem Monomer bei ca. 27 kDa (theoretisch berechnet 26,9 kDa) und für den Komplex einem Heterotetramer aus zwei EYFP Monomeren, die durch die Interaktion mit je einem *nanobody* zu divalentem EYFP zusammengefasst werden bei 89 kDa (theoretisch berechnet 95 kDa). Sowohl das UV-Signal als auch das Fluoreszenzsignal des Chromatographieverlaufs zeigen für den Komplex bei 46 kDa ein weiteres Maximum, was der Interaktion des EYFP Monomers mit einem *nanobody* entspricht. Dass diese Spezies bei den Lichtstreuungsexperimenten nicht nachgewiesen wurde, verdeutlicht den Einfluss der Konzentration auf das Ausbilden der Interaktionskomplexe, was bei späteren Experimenten nicht vernachlässigt werden sollte.

Die Experimente zeigen, dass der *nanobody* nicht wie geplant durch die *lacI*-Helix Tetramere ausbildet, sondern sich nur dimere Strukturen ausbilden. Diese interagieren jedoch wie erwartet mit EYFP, sodass hier zwei Monomere zu einem Dimer zusammengefasst wurden. Das heißt, dass aus der Interaktion von EYFP-PAL und dem *nanobody* eine divalente PAL-Spezies entsteht. In Kombination mit den synthetisierten, polyvalenten Aptameren sollte das zur Erzeugung größerer RNA-PAL Netzwerke ausreichen.

Zur Untersuchung dieser größeren Netzwerke und der Phasenseparation sind aufgrund der erwarteten großen Partikel mit hoher Viskosität weder säulenbasierte Verfahren noch Anisotropie-Messungen geeignet. Eine andere Möglichkeit, die Größe fluoreszierender Partikel zu bestimmen ist die Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie. Diese basiert auf den zeitlich veränderlichen Fluktuationen der Fluoreszenz in einem sehr kleinen Konfokalvolumen. Dabei sollte die Partikelanzahl im angeregten Volumen möglichst klein sein, im Idealfall befindet sich im Mittel nur ein Teilchen im Fokus. Ein sich in Lösung bewegendes Teilchen löst also nur während es sich durch ein definiertes Volumen bewegt ein messbares Fluoreszenzsignal aus. Die Zeit, indem das Teilchen im Konfokalvolumen verbleibt lässt einen direkten Schluss auf die Diffusionskonstante und damit die Größe des beobachteten Teilchens zu. Die Rohdaten der Messung bestehen aus der Fluoreszenzintensität über den Messzeitraum hinweg. Indem ein Strahlteiler für das Messsignal verwendet wird, können das Rauschen und potentielle Korrelationseffekte des Detektors über die Kreuzkorrelation der Messsignale korrigiert werden. Die gewonnene Kreuzkorrelationsfunktion dient als Maß für die Diffusionszeit der beobachteten Teilchen und deren Anzahl. Eine Verschiebung hin zu längeren Zeiten korreliert mit einem Größenanstieg der Partikel, während eine Verschiebung auf der y-Achse auf eine Änderung der durchschnittlichen Teilchenzahl im Fokus hindeutet. Dabei korreliert der y-Achsenabschnitt der Korrelationsfunktion mit der reziproken Teilchenzahl im Messfokus. Weiterhin wurde das Verhalten der fluoreszenten Moleküle über bildgebende Verfahren am konfokalen Mikroskop aufgezeichnet. Erste Messungen zu Fluoreszenzkorrelation von EYFP-PAL zeigten Diffusionszeiten von  $\sim 0,13$  ms. Der y-Achsenabschnitt lag für EYFP-PAL bei  $\sim 0.5$  was einer Anzahl von zwei fluoreszierenden Partikeln im Messvolumen entspricht (Abbildung 38A).

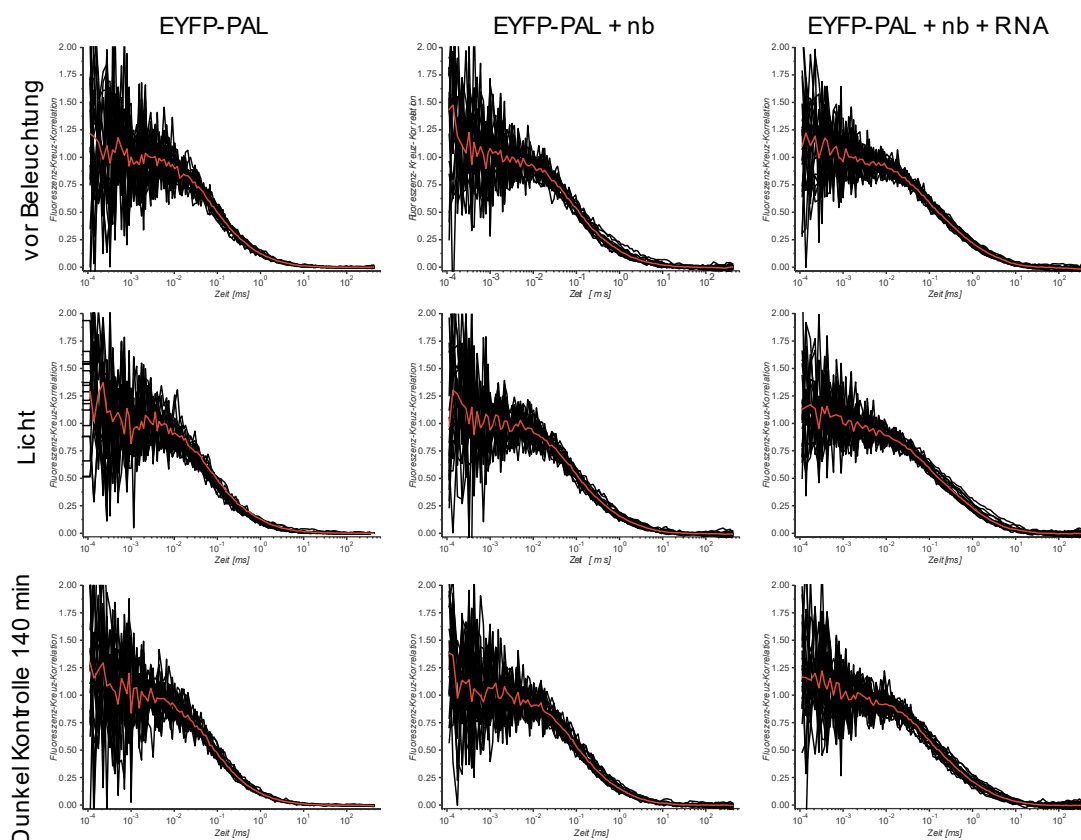


**Abbildung 38 Exemplarische Daten einer FCS-Messung von EYFP-PAL ohne und in Anwesenheit des EYFP-nanobodies:** Die Kreuzkorrelationskurve der beiden Photodetektoren des Aufbaus wird in A über die Zeit aufgetragen. Dabei zeigen die vollen Markierungen die Messung von EYFP-PAL alleine, die leeren Kreise die Messung von EYFP-PAL in Kombination mit dem nanobody. Messungen im Dunkeln werden in schwarz, Messungen im Licht in blau dargestellt. B zeigt die mikroskopischen Aufnahmen der gemessenen Proben im Dunkeln und im Licht.

Das könnte einem PAL-Dimer mit zwei fluoreszierenden EYFP-Einheiten entsprechen. Durch Zugabe des *nanobodies* zur Proteinlösung wird eine Verringerung dieses Werts um die Hälfte ausgelöst, was auf eine Bildung des zuvor postulierten Heterotetramers mit vier EYFP-Monomeren hindeutet. Gleichzeitig korreliert diese Abnahme jedoch mit einer Erhöhung der mittleren Fluoreszenzintensität der Teilchen, ein Einfluss der nicht trivial erklärt werden kann. Makroskopisch werden weder durch die Zugabe des *nanobodies* noch durch die Beleuchtung der Probe offensichtliche Unterschiede wahrgenommen (Abbildung 38B).

Im weiteren Verlauf der Experimente wurde der Effekt von kontinuierlicher Blaulichtbeleuchtung auf EYFP-PAL, eine Mischung aus EYFP-PAL und des dimeren *nanobodies* sowie der Kombination aus EYFP-PAL, *nanobody* und 8x-Polyaptamer gemessen. Die Messungen wurden sowohl mit einer initialen Messung des Systems vor Beleuchtung als auch mit kontinuierlich im Dunkeln gehaltenen Proben verglichen (Abbildung 39). Schon bei der Analyse der Rohdaten zeigte sich, dass die Zugabe des *nanobodies* keinen statistisch relevanten Effekt auf die Diffusionszeit der Partikel hat, die ausgelöste Interaktion also nicht zu Partikeln führt, die sich in ihrer Größe und Diffusionsgeschwindigkeit unterscheiden.





**Abbildung 39 FCCS Kurven der einzelnen Messbedingungen:** Es werden die normierten, zeitabhängigen Kreuzkorrelationskurven der Fluoreszenzintensitäten der indizierten Proben und Messbedingungen gezeigt. Einzelmessungen sind in schwarz abgebildet, der Mittelwert der Kurven in rot. Für die Messung wurden 200 nM EYFPAL, 200 nM nanobody und 400 nM RNA-8x-Polyaptamer eingesetzt.

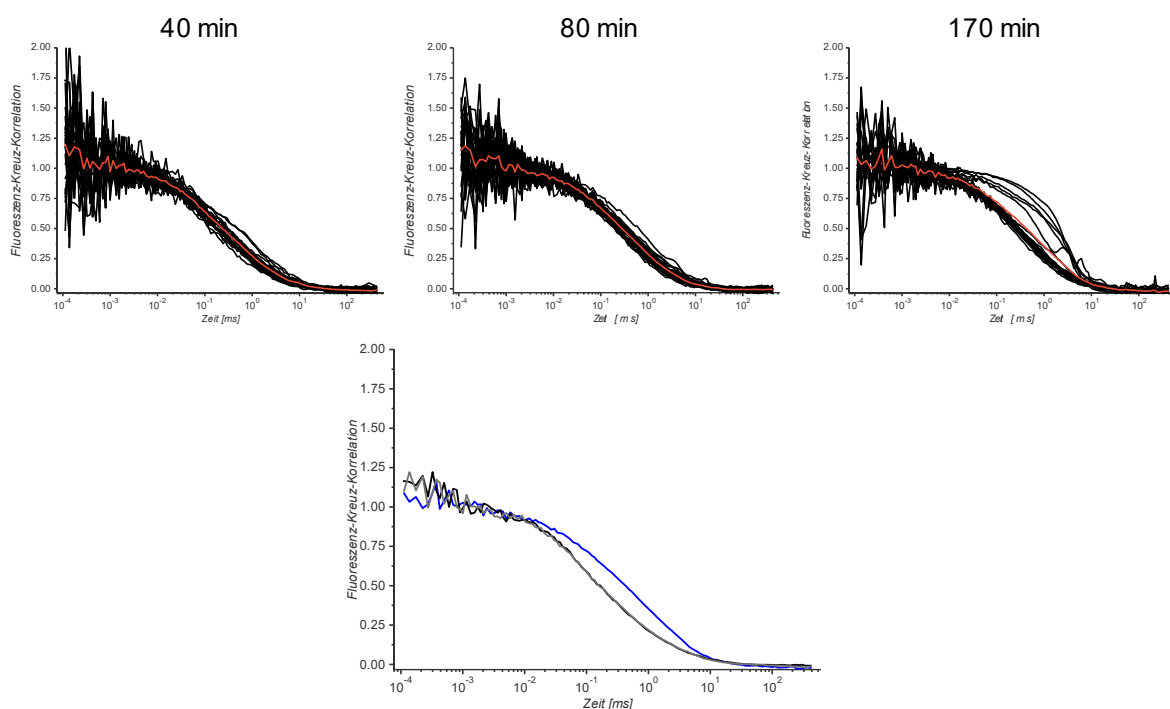
Die Zugabe von RNA führt hingegen auch ohne Beleuchtung zu einem Anstieg der Diffusionszeit, es bilden sich also auch im Dunkeln Interaktionen zwischen Polyaptamer und PAL aus. Diese bleiben jedoch über die Zeit hinweg statisch und zeigen keinen Anstieg, wie ein Vergleich mit Tabelle 12 zeigt.

**Tabelle 12:** Berechnete mittlere Diffusionszeiten und assoziierte Standardabweichungen. \* markieren bereinigte Mittelwerte, bei denen Kurven entfernt wurden, die starke Abweichungen hin zu größere Diffusionszeiten aufwiesen.

<b>EYFP-PAL-nb-RNA Probe</b>	<b>Diffusionszeit <math>\tau</math> [ms]</b>	<b>Standardabweichung <math>\tau</math> [ms]</b>
vor Beleuchtung	0,4090	0,0284
0 min nach Beleuchtung	0,4345	0,0352
80 min nach Beleuchtung	0,5621	0,0503
170 min nach Beleuchtung	0,7647	0,2035
105 min Dunkel	0,3988	0,0373
300 min Dunkel	0,3043	0,0254
170 min nach Beleuchtung*	0,5429	0,0363

Die Diffusionszeit der RNA-nanobody-PAL Partikel steigt 300 Minuten im Dunkeln nicht weiter an, es haben sich also keine größeren Partikel gebildet. Der Anstieg der Diffusionszeit und damit der Partikelgröße der EYFP-PAL-nb-RNA-Mischung nach Beleuchtung ist zunächst nicht signifikant. Bei der Betrachtung längerer Zeiträume ist jedoch ein Anstieg der Diffusionszeit zu beobachten. Insbesondere fallen einzelnen Messungen auf, die sehr hohe Diffusionszeiten aufweisen und die statistische Auswertung erschweren. Diese Messungen weisen auf das vereinzelte Ausbilden von größeren Netzwerken hin, dies scheint aber ein räumlich begrenzter Effekt zu sein, der zu einer Entmischung oder Phasenseparation des Testsystems führt, da weiterhin keine makroskopischen Effekte beobachtet werden konnten (Abbildung 40).

Durch die starke Streuung der Werte ist eine belastbare Auswertung der Messungen bei langen Zeiträumen nicht möglich. Zwar werden einzelne Ereignisse, die auf eine beginnende Phasenseparation hinweisen beobachtet, diese führen jedoch nicht zu einer makroskopischen Entmischung des Systems. Nach Bereinigung um die Werte mit sehr hohen Diffusionszeiten zeigt sich, dass nach ca. 60 Minuten Beleuchtung eine Sättigung der Interaktion erreicht wird. Eine weitere Steigerung der bereinigten Mittelwerte ist nicht zu beobachten.



**Abbildung 40 Zeitverlauf der FCCS-Messung:** Oben sind die normierten Einzelkurven der FCCS-Messung (schwarz) und die mittlere Kurve (rot) der Messung an EYFP-PAL-nanobody-RNA-Mischung zu den indizierten Zeitpunkten abgebildet. Unten ist der Anstieg der mittleren Lebenszeit des beleuchteten Gemischs (blau) im Vergleich zur Probe vor Beleuchtung (schwarz) und einer Probe, die über 300 Minuten hinweg im Dunkeln gelagert wurde (grau) gezeigt. Für die Messung wurden 200 nM EYFPAL, 200 nM nanobody und 400 nM RNA-8x-Polyaptamer eingesetzt.

Die beobachteten Effekte sind insgesamt geringer als erwartet. Es kann über den gesamten Zeitraum der Messung keine makroskopische Phasenseparation beobachtet werden. Dennoch ist ein klarer Einfluss der Beleuchtung auf das System zu erkennen, am Anstieg der Diffusionszeiten kann auch eine ca. 8-fache Steigerung des Molekulargewichts des Fluoreszenzmarkers, also EYFP-PAL, geschlossen werden. Das könnte einer Absättigung des 8x-Polyaptamers entsprechen, ohne das Ausbilden von größeren Netzwerken. Die sporadisch gemessenen, viel größeren Partikel zeigen aber, dass die Ausbildung von Netzwerken möglich ist und auch vorkommt.

Die Sättigung der Interaktion nach 60 Minuten kann der Bildung von Nukleationskeimen entsprechen, die anschließend in seltenen Fällen zu größeren Netzwerken interagieren. Diese scheinen aber bei den gewählten Bedingungen nur in sehr seltenen Fällen weiter zu interagieren und führen nicht zur globalen Entmischung der Probelösung. Dies kann auf Konzentrationseffekte zurückzuführen sein.

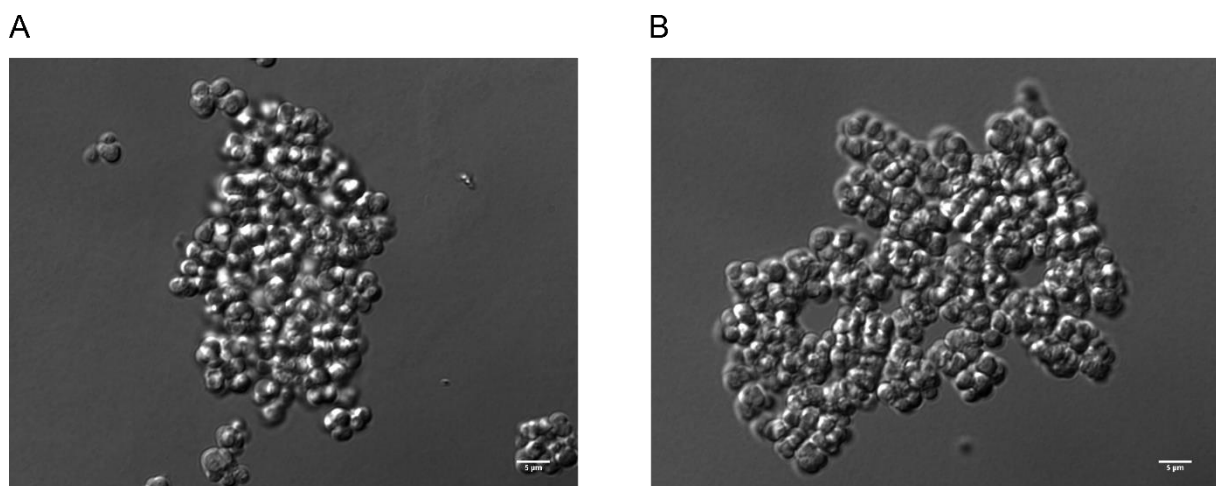
Gegebenenfalls reichen die gewählten Konzentrationen nicht aus, um die Phasenseparation auszulösen. Wie schon weiter oben erwähnt, kann zum Beispiel die RNA Konzentration einen großen Effekt auf die Ausbildung von phasenseparierten Partikeln haben. Variation der RNA und *nanobody* Konzentrationen könnten die Phasenseparation weiter unterstützen. Eine andere Ursache für keine makroskopischen Veränderungen könnte die intrinsische Instabilität der *nanobody*-Polymere sein, die bereits thematisiert wurde. Die polyvalenten PAL-Komplexe könnten zu instabil sein um längerfristig stabile Netzwerke auszubilden. Es ist ebenfalls zu bedenken, dass Phasenseparation auch mit natürlichen Komponenten *in vitro* ein relativ langfristiger Prozess ist, vermutlich, weil keine *crowding*-Effekte auftreten. So werden in der Literatur von Messungen über 30 Stunden hinweg berichtet, um bestimmte Effekte zu beobachten (37).

Zusammenfassend ist zu sagen, dass zwar keine makroskopische Phasenseparation beobachtet wurde, dass das entwickelte System aber schon ohne Optimierungen mindestens die lichtabhängige Bildung von Nukleationskeimen unterstützt. Eine beginnende Phasenseparation kann anhand der zunehmenden Anzahl von Messungen von sehr großen Partikeln bei langer Beleuchtungszeit vermutet werden. Ohne ergänzende Methoden ist ein Beweis jedoch nicht möglich. Dennoch zeigen die hier erhobenen Daten die prinzipielle Anwendbarkeit von PAL für die lichtabhängige Phasenseparation.

## 4. Diskussion und Ausblick

### 4.1 Natürliche Funktion von PAL und PAL-Homologen

Die Analyse der natürlichen Funktion von PAL und seinen Homologen steht noch am Anfang. Zu Beginn dieser Arbeit war kein weiteres Protein mit der speziellen Domänenkombination aus PAS ANтар und LOV bekannt, sodass eine biologische Funktion nur vermutet werden konnte. Durch das Auftreten weiterer PAL-Homologe zeichnet sich zwar die biologische Signifikanz der Proteingruppe ab, da alle PAL-enthaltenden Organismen entweder kaum oder noch gar nicht charakterisiert sind, ist eine Untersuchung der natürlichen Funktion dennoch anspruchsvoll. Durch die kaum vorhandene Charakterisierung der Organismen ist ein molekularbiologischer Ansatz zur Identifizierung der Funktion wie zum Beispiel *knockout* oder *knock-down* von PAL erschwert. In initialen Experimenten wurde zudem ein großer Einfluss von geringen Blaulichtdosen auf das Wachstum der Bakterien nachgewiesen. Schon bei einer Lichtintensität von  $10 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ , eine Dosis die zehnmals geringer ist als Dosen, die ohne Wachstumsdefekte bei *E. coli* eingesetzt werden (72), war die Wachstumsrate etwa um die Hälfte reduziert. Bei der lichtmikroskopischen Betrachtung konnte allerdings kein besonderer Phänotyp der Zellen beobachtet werden (Abbildung 41). Der beobachtete, einschneidende Effekt der Illumination auf das Wachstum der Bakterien, könnte unter anderem durch PAL ausgelöst werden. Es ist aber unwahrscheinlich, durch Analyse der Expressionsmuster in dunkel- und lichtadaptierten *N. multipartita* klare Aussagen bezüglich eines einzigen, durch PAL regulierten Gens zu treffen, wenn Blaulicht so umfassende Einflüsse auf das Bakterium hat.



**Abbildung 41 Kultivierung von *Nakamurella multipartita*:** Zu sehen sind die mikroskopischen Aufnahmen von *N. multipartita* Kulturen, die bei  $10 \mu\text{W}/\text{cm}^2$  im Blaulicht über einen Zeitraum von 10 Tagen auf eine optische Dichte bei 600 nm von 0,5 angezogen wurden (A), und von Kulturen die im Dunkeln über einen Zeitraum von 5 Tagen auf eine optische Dichte bei 600 nm von 0,5 angezogen wurden (B). In beiden Fällen sind kaum freie Zellen nachweisbar, es bilden sich Aggregate und Zellhaufen vermutlich vermittelt durch die polysaccharidhaltige extrazelluläre Matrix.

Eine *in silico* Analyse des Genoms ausgehend von den identifizierten Aptamer Sequenzen zeigte zwar viele mögliche Sequenzmotive in 5'-untranslatierten Regionen vor ORFs. Da die Sequenz des Haarnadel-Stamms von geringerer Bedeutung für die Interaktion des Aptamers mit PAL war, wurde bei dieser Analyse nur die Schleifensequenz berücksichtigt. Ein Kriterium der Analyse war jedoch die Ausbildung von Haarnadelschleifenstrukturen unter Einbindung der 04.17 bzw. 53.19 Sequenz. Die identifizierten Abschnitte des Genoms weisen demnach definierte Sekundärstrukturen auf, die eine Regulation der nachgeschalteten Gene durch Antitermination ermöglichen könnten (Abbildung 42). In diesem Fall ist die geringe Länge der identifizierten Aptamere aber von Nachteil. Rein statistisch gesehen ist mit einem ca. 400-fachen Auftauchen der sieben Nukleotide langen Schleifen-Sequenzen im Genom zu rechnen, auch zusätzliche Einschränkungen wie die Lokalisation in bestimmten Abständen vor einem theoretischen Leserahmen und das Ausbilden einer degenerierten Doppel-Haarnadelstruktur wie in bisher veröffentlichten ANTAR-Bindemotiven führt noch zu mehreren hunderten Ergebnissen im Genom von *Nakamurella multipartita*.

**Ziel-Schleifen-Sequenz 04.17: AAGCAGA**

```
AGCUGCGGCCCGACCUGAUCGGGGGUCGACCUACGGUUCGGAUCCGCGGCCGCGGGGAUCGUUCGGUCAAGCAGAACCUGGACAGUCCCGCGGGUGACCGACCG
.(((((((.....))))))(((((((.....)))))(((((((.....))))))(((((((.....))))))(((((((.....))))))(((((((.....))))))
UCGUGGUCUAUCAAGCAGAAGUGCUUGACAGACCACGCAAUGCUUGGCAGACUAAGCGCAGCAGCUUGAGAGCACGCCAAAACCCAGGAGGAACACCAUGACCGACUU
(((((((.....))))))(((((((.....))))))(((((((.....))))))(((((((.....))))))(((((((.....))))))(((((((.....))))))
UGUCAUCUCCACUUCGGCGGACGACCCUUCGAGUACGCCACCGUUCGUCUACUCCAGCGCACAAGCAGAUCCUGGACACCUUGGGCGAGGACGGGUGGAGCUGG
...(((.....(((((((.....))))))(((((((.....))))))(((((((.....))))))(((((((.....))))))(((((((.....))))))(((((((.....))))))
```

**Ziel-Schleifen-Sequenz 53.19: CAGCAGCGA**

```
GGUGGGCGGUGCGCGCGGAUCCACCGUCCAUCCGGAUGCCCGCGGGUCAGCAGCGAGCCGCGCGGGUCAUACCAAUCCAGAUCCGAGGCGUGGAGUCGUAACGGGCC
(((((((.....))))))(((((((.....))))))(((((((.....))))))(((((((.....))))))(((((((.....))))))(((((((.....))))))
GUGGUACCGCCCGCCCGCAAGGCCGCGUCCACCCCGCCCGGACGGACCGCCCGGAUGGACAGGGCCGCGCGUCCAUCAGCAGCGAAAGGGCACCCCGCGUGCACUUCGU
((((.....(((((((.....))))))(((((((.....))))))(((((((.....))))))(((((((.....))))))(((((((.....))))))(((((((.....))))))
CGCGUUAUCCAGCGUGACGAGGCGAGCCUCCAGGCGAGCCUCCAGGCGAGCAGUCCAGGGCAGCAGCGACAGGCGAGGCGAGGUGGGGAGCGAGCGUGGAGCCUGA
(((((((.....))))))(((((((.....))))))(((((((.....))))))(((((((.....))))))(((((((.....))))))(((((((.....))))))
```

**Abbildung 42: Vorkommen der Aptamersequenzen im Genom von *N. multipartita*:** Die Aptamerschleifensequenzen sowohl von 04.17 (grün) als auch von 53.19 (blau) konnten im Genom von *N. multipartita* (gi|258553496|gb|CP001737.1) identifiziert werden. Anhand von Berechnungen durch RNAfold werden die Sequenzmotive als Teil von Haarnadelstrukturen identifiziert, die Stammsequenz und berechnete Struktur (gelb markiert) stimmen nicht vollständig mit den synthetischen Aptamern überein.

Gegebenenfalls kann hier bei einer Identifizierung der Bindemotive von NsPAL 1 und 2 sowie NfPAL durch ähnliche Analysen und Abgleich der gefundenen, potentiell regulierten Gene eine genauere Aussage getroffen werden, eine definitive Aussage wird aber vermutlich durch diese Methode nicht möglich sein. Zudem müssen diese Ergebnisse durch eine qRT-PCR-Analyse der RNA-Menge identifizierten Zielgene verifiziert werden. Dies ist durchführbar, aufgrund des hohen GC-Gehalts des Genoms aber anspruchsvoll.

Zur absoluten Bestimmung der natürlichen RNA-Zielsequenzen von PAL wäre Co-Immuno-präzipitation von PAL im Komplex mit seiner natürlichen RNA durch einen PAL-Antikörper erforderlich. Die aus dem Komplex gewonnene RNA kann dann sequenziert und mit dem Genom abgeglichen werden, sodass die Bindungssequenz und die regulierten Gene identifiziert werden können. Die Anwendung des in dieser Arbeit entwickelten EYFP-PAL Fusionskonstrukts könnte das Verfahren vereinfachen, da hier effizient bindende, monoklonale Antikörper gegen EYFP und nicht neu erstellte, polyklonale PAL-Antikörper eingesetzt werden können. Dazu müsste man gewonnenes *N. multipartita* Lysat mit dem rekombinant hergestellten EYFP-PAL vermengen, bevor die Immunopräzipitation durchgeführt wird.

Durch die Analyse der Homologen PAL-Varianten können Informationen gewonnen werden, um die Anwendung zu verbessern. Neben der schon beschriebenen Möglichkeit der Tandem-Anwendung der verschiedenen Systeme eröffnet NsPAL1 mit seinem schnellen Photozyklus (Vgl. Abbildung 28) die Möglichkeit, die Genauigkeit der Kontrolle durch den Photorezeptor zu verstärken. Wenn der Mechanismus der Signaltransduktion mit der photochemischen Lichtaktivierung gekoppelt ist, ist dieses Protein nur ungefähr eine Minute aktiv nachdem die Beleuchtung beendet wurde, während NmPAL 30-60 Minuten länger im Signalzustand verweilt. Die zeitliche Kontrolle der RNA-Bindung würde durch einen möglichen Einsatz von NsPAL1 also verbessert.

Das NfPAL-Protein wurde noch nicht charakterisiert, die Sequenzanalyse legt aber nahe, dass es enger verwandt mit NmPAL ist als die NsPAL-Varianten. Es steht daher zu vermuten, dass es sich ebenfalls mit den etablierten Protokollen extrahieren lässt und eine für LOV-Domänen spezifische Photochemie aufweist. Die Variation der eingefügten Helix in der ANTAR-Domäne weist aber auch für dieses Protein auf eine andere Sequenzspezifität für RNA hin. Allerdings könnte durch die engere Verwandtschaft der Proteine die Zielsequenz ähnlicher sein, sodass höhere Aussichten bestehen, durch eine Mutationsanalyse der Bindemotive im bakteriellen Assay lichtabhängig bindende Sequenzen zu identifizieren. Der markanteste Unterschied zwischen NmPAL/NfPAL auf der einen und den NsPAL Varianten auf der anderen Seite sind die verlängerten Sequenzen am N- und C-Terminus der Proteine.

Der verlängerte N-Terminus von NsPAL 1 kann durch eine *blast*-Analyse nur hypothetischen Proteinen zugeordnet werden, also Proteinen deren Ähnlichkeit mit bekannten Proteinen nicht groß genug ist, um einen Schluss bezüglich ihrer Funktion zuzulassen. Die Analyse der C-terminalen Bereiche des Proteins zeigt jedoch wie oben berichtet eine Verwandtschaft zu Di-Guanylat-Cyclasen auf.

Diese produzieren c-di-GMP, was als *second messenger* in Bakterien eng mit der Ausbildung von Biofilmen oder allgemeiner, mit dem Übergang von einer motilen in eine sessile Form der Bakterien verknüpft ist (78; 79). Die Signalwirkung ist dabei vielfältig und schließt sowohl Interaktionen mit Transkriptionsfaktoren als auch *Riboswitch*-Funktionen des *second messengers*, also eine direkte Interaktion mit RNA mit ein. Allerdings überlappt die putative Cyclase-Sequenz zum Teil mit der LOV-Domäne (Abbildung 43). Da diese in der vorliegenden Arbeit lichtschtbar und damit funktional war, ist eine Funktion der NsPAL-Varianten als Guanylat-Cyclase unwahrscheinlich.

NsP1	302	STPRPGWTRSAGQSRSAAAEAAESASHI	PAALLPGILTRAVADA	AVSITVADMTVPHRPL	361
		+ PRP	S +A++	A +P +LP +L RA+A A+ I +AD ++P PL	
Cyc	424	AVPRP-----	SPAASSVPTHRAEAVPQDVL	PDLLLRAIATASNGI	VIADASLPGLPL 475
NsP1	362	VYVNP	AFERLTGYAAADV	LGRCRFLQGDHTNDEQNQAI	REAMRDGRSTDTLIRNFTADG 421
		VYVN AF	RLTGY+A +VLGRNCRFLQG	T+ Q Q I + GR T++ N+ DG	
Cyc	476	VYVNTAF	RLRTGYSAD	EVLGRCRFLQSGTDP	TQVQPISRRLLAGRDVHTVLLNYRRDG 535
NsP1	422	TPFWNEFHLS	SPVRNVHGRLTHYIGYQLDVT	ERVEREEQLRRLAF	EDAATGLPNRAAALRH 481
		+ FWNE H+SPV + G +THYIG	QLDVT RVERE++	LA D T LPNRA L H	
Cyc	536	SAFWNEVHIS	PVTDAGGNITHYIGNQLDVT	SRVEREQRTTYLAH	DELTAALPNRAHILDH 595
NsP1	482	----VEDLRSAAT	PFTVATVSSDRF-GDGDALD	HSDGRVVTMLAAQRLRAAA-P	DAYLAR 535
		+ R + V + D F G D H+ G	AA RLR+A L R		
Cyc	596	LRLELRRARR	SGSVAVLMLDLDEFKGINDR	FHAAGDRALSWAAHRLRS	AVRAGDLLGR 655
NsP1	536	TGAHSLQLI-GSLP	-----	AQAAL	EQALHAPAGTVDDVRLDAT 573
		G L+ LP		Q L AL P D VRL A+	
Cyc	656	LGGDEFLLVLAGL	PPTGGSPDDPGRGTSVDDTL	RRVQEH	LHAALDGPLALADTTVRLSAS 71

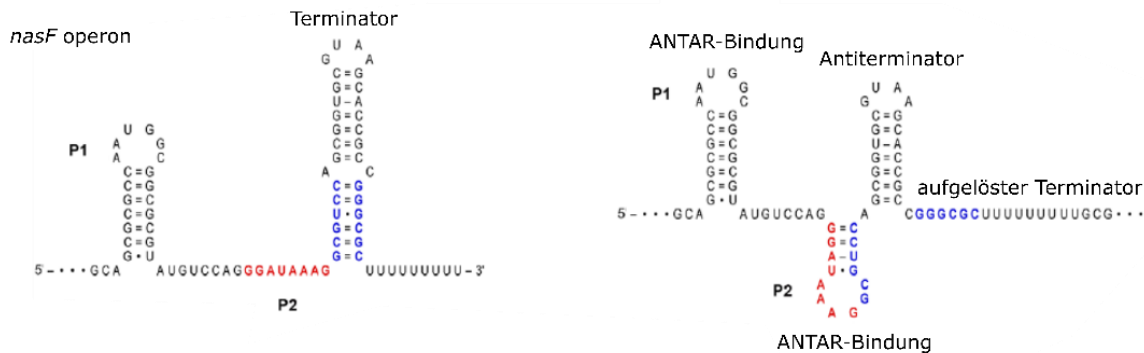
**Abbildung 43: Sequenzalignment von NsPAL1 und einer Di-Guanylat-Cyclase:** *Pairwise*-Alignment durch das NCBI-blastp Programm mithilfe einer BLOSUM62 Matrix. Dabei wurden homologe Sequenzen ausgehend von NsPAL1 gesucht. Hier gezeigt ist das Alignment mit der Di-Guanylat Cyclase aus *Modestobacter* sp. 1G4 (gi|1678277842|ref|WP\_138758997.1|). Die LOV-Domäne von NsPAL1 ist in hellblau markiert, dabei ist das konservierte Cystein und das DVT-Motiv der  $\alpha$ -Helix gelb hervorgehoben.

#### 4.2 PAL im Vergleich zu weiteren RNA-basierten Schaltern

Die Entdeckung von PAL und seinen Homologen eröffnet völlig neue Möglichkeiten der Manipulation zellulärer Prozesse mit Licht. Durch Optoribogenetik, die direkte Beeinflussung von RNA-Spezies durch Licht, können prinzipiell sämtliche RNA-Varianten in der Zelle durch die Interaktion mit PAL beeinflusst werden. Dies wird durch die identifizierten, sehr kurze Aptamere, die spezifisch mit PAL interagieren, ermöglicht. Während andere entwickelte Aptamere, zum Beispiel für *riboswitch*-Anwendungen meist eine Größe von über 100 Nukleotiden aufweisen (59; 80), können die 04.17 und 53.19 Aptamere mit 17 bzw. 19 bp Länge verhältnismäßig leicht in verschiedene Kontexte eingebracht werden. Dies demonstriert auch die Anwendung zur translationalen Kontrolle in HEK-Zellen, die in (44) gezeigt wurde.



Die geringe Größe der Aptamere ist wie berichtet auch im Vergleich zu den Bindemotiven anderer, natürlicher ANTAR-Bindemotive ungewöhnlich, die meist als Struktur aus zwei duplizierten, degenerierten Haarnadelschleifen beschrieben werden, wie in Abbildung 44 für das *nasF* operon aus *Klebsiella oxytoca* gezeigt (81; 82).



**Abbildung 44 Sequenz und Sekundärstruktur des *nasF*-operon *leaders* als Terminator- und NasR-bindender Antiterminator:** Die Abbildung zeigt die Möglichkeiten alternativer RNA-Sekundärstrukturen im transkribierten Bereich des *nasF* operons. Der Terminator wird nach der NasF Bindung durch die Ausbildung des P2-loops aufgelöst und die Transkriptionstermination aufgehoben. (Variiert nach (81))

Die zweite Haarnadelschleife trägt in den bekannten ANTAR-Systemen zur Auflösung des gebildeten Terminators bei, um eine effiziente Transkription des regulierten Gens zu erlauben. Die Datenlage erlaubt aber keine absolute Definition der Bindemotive, da die Sequenzspezifität und Länge der bekannten Domänen nicht erschöpfend *in vitro* untersucht wurden. Da die Aktivität im zellulären Kontext nicht nur von der Interaktion der ANTAR-Domäne mit der RNA abhängt, sondern auch von den sich gegenseitig ausschließenden, alternativen Sekundärstrukturen der RNA, werden in *in vivo* Untersuchungen längere Bindungsmotive identifiziert. Das in dieser Arbeit entwickelte, synthetische Assay-System basiert ebenso auf einer Wechselwirkung des Aptamers mit der benachbarten Ribosomenbindestelle.

Ein potentieller Anwendungsbereich für RNA-Aptamere ist das Design der oben erwähnten *riboswitches*. Hier reagiert das Aptamer auf die Zugabe eines kleinen Metaboliten, meist durch die Ausbildung von Terminatorstrukturen, welche die Transkription von Zielgene unterdrücken (60; 59). Während die dabei verwendeten Aptamere meist größer und damit umständlicher in der Anwendung sind als die hier beschriebenen PAL-Aptamere, sind die Interaktionspartner einfache Chemikalien und Metabolite, die im Gegenteil zum PAL-Protein leichter verfügbar sind.



Allerdings sind diese Stoffe nicht genetisch kodierbar, sondern abhängig von externer Zugabe oder Produktion durch die Zellen, was keine räumliche und zeitliche Kontrolle der regulierten Effekte erlaubt. Gegebenenfalls sind die verwendeten Metabolite sogar schlecht zellgängig oder in den benötigten Konzentrationen cytotoxisch. Gerade durch die Identifikation weiterer PAL Varianten mit Unterschieden sowohl in der Schaltbarkeit als auch in der Sequenzspezifität können verschiedene RNA-basierte Prozesse auf verschiedenen Zeitskalen und mit unterschiedlicher subzellulärer Position reguliert werden.

### 4.3 Temperatur und pH-Abhängigkeit der PAL-Aptamer Interaktion

Die für die PAL-Aptamer Interaktion Affinität im niedrigen nanomolaren Bereich kann *in vivo* von Änderungen des pH-Werts und der Temperatur beeinflusst werden (Vgl. Abbildung 13), was zu der im Vergleich zur Interaktionsstärke geringeren, zehnfachen Schaltbarkeit des bakteriellen Reportersystems führen könnte (Vgl. Abbildung 15). In der Vergangenheit wurde für LOV-Domänen eine Temperaturabhängigkeit des Photozyklus und der Signaltransduktion beschrieben (30). Da durch die EPR-Messungen für PAL gezeigt wurde, dass das Signal durch eine starke Bewegung der LOV-Domäne und vermutlich auch der  $J\alpha$ -Helix weitergeleitet wird, kann eine erhöhte Beweglichkeit der Proteinreste durch höhere Temperaturen für eine verringerte Schaltbarkeit verantwortlich sein.

Für die Rückkehrreaktion in den dunkeladaptierten Zustand der LOV-Domäne wurde sowohl direkte Basenkatalyse durch die Zugabe von Imidazol als auch allgemeine Basenkatalyse durch den Zugang von Lösemittelmolekülen zum Chromophor gezeigt (56). Dabei beruht die Beschleunigung der Rückkehrreaktion auf der erleichterten Abstraktion des Protons von der N5 Position des Chromophor, des geschwindigkeitsbestimmenden Schritts der Rückkehrreaktion (83). Die höhere Interaktionsrate des Systems bei sinkendem pH, die in den Anisotropie-Experimenten gezeigt wurde, könnte also durch eine Stabilisierung des lichtadaptierten Zustands ausgelöst werden. Um die Schaltbarkeit in der Anwendung, die durch Temperatur und pH-Einflüsse verringert werden kann, zu verbessern, können intrinsische Eigenschaften der zu regulierenden Systeme ausgenutzt werden. So wurde das im pDusk Kontext 12-fach schaltbare YF1 System durch Kombination mit einem biologischen Inverter sowohl in seiner Lichtantwort umgekehrt als auch um fast 40x in seiner Schaltbarkeit gesteigert um das pDawn System zu erhalten (12).

#### 4.4 Erkenntnisse der Struktur- und Funktionsanalyse des PAL-Proteins

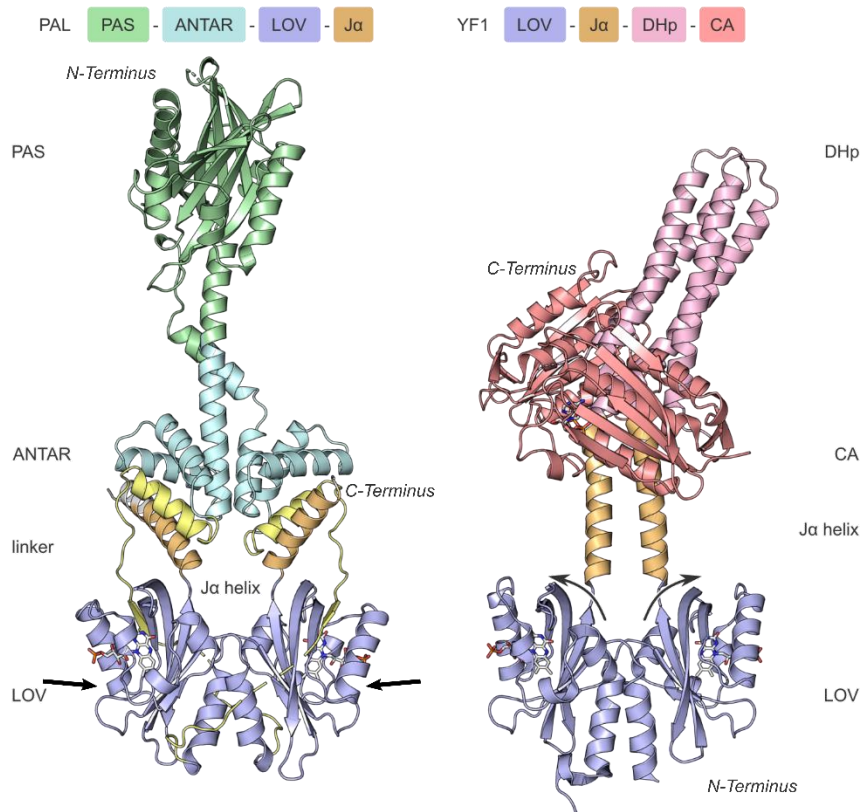
Die Entdeckung von PAL ist nicht nur bezüglich der Identifikation einer neuen Proteinklasse und für neuartige Anwendungen von Interesse, es hat auch neue Einsichten in die Signaltransduktion der lichtaktivierten LOV-Domäne ermöglicht. Der zu Anfang des Projekts unverstandene Mechanismus der C-terminalen Signaltransduktion konnte durch das Lösen der Kristallstruktur und umfassende Struktur-Funktionsanalysen klarer definiert werden. Der lange Linker zwischen ANTAR- und LOV-Domäne erlaubt eine Reorientierung der LOV-Domäne um  $180^\circ$ , was eine direkte Interaktion zwischen ANTAR-Domäne und der  $J\alpha$ -Helix ermöglicht. Die essentielle Rolle der terminalen Helices und insbesondere der  $J\alpha$ -Helix auch in LOV-Photorezeptoren mit atypischer Domänenanordnung wird somit weiter bestätigt und scheint eine universelle Eigenschaft der LOV-Signalweiterleitung zu sein, auch wenn die ausgelösten strukturellen Änderungen divers sind. Während in *short*-LOV Domänen wie AsLOV2 (25) meist eine partielle oder komplette Entfaltung der Helices ausgelöst wird, kann dies bei PAL anhand der unveränderten CD-Spektren im Dunkeln und im Licht ausgeschlossen werden (Vgl. Abbildung 6). Die Mutagenese-Studie legt aber eine Bewegung und Veränderung der Interaktion der  $J\alpha$ -Helix als Resultat der Lichtadaptierung nahe. Es wurde in dieser Arbeit auch die Funktion des Adapters zwischen ANTAR- und LOV-Domäne in der Signaltransduktion untersucht. Da die Mutation eines Lysins K211 eine starke Abnahme der Schaltbarkeit mit Tendenz zur konstitutiven RNA Bindung auslöste, kann aber eher von einer strukturellen Bedeutung ausgegangen werden (Vgl. Abbildung 19). Eine konstitutive RNA Bindung setzt eine Zugänglichkeit der RNA-Bindestelle auch im dunkeladaptierten Zustand voraus, wie sie durch eine Fehlorientierung der LOV-Domäne, ausgelöst durch eine Störung des Adapters vorkommen kann. Bei einem Einfluss auf die Signaltransduktion wäre von einer Abnahme der Interaktion mit RNA auszugehen. Auch wenn der Linker nicht essentiell für die Signaltransduktion ist, ist hervorzuheben, dass er eine sehr rigide Struktur aufweisen müsste um die Domänenanordnung zu koordinieren, und vermutlich nicht ungeordnet vorliegt wie durch die Kristallstruktur suggeriert wird. Auch die hohe Anzahl von sieben Prolinen in einem nur knapp 40 Aminosäuren langen Proteinabschnitt spricht für eine unbewegliche Struktur, die lichtabhängig spezifische Reorientierungen zulässt.

Die Mutationsanalyse der Interaktion zwischen ANTAR-Domäne,  $J\alpha$ -Helix und LOV-Domäne identifizierte mehrere für die Funktion von PAL relevante Aminosäuren: R193, R195, E352 und R356 liegen dabei in der Scharnierregion des Proteins (Vgl. Abbildung 19). Dabei kamen sowohl konstitutive RNA-Bindung als auch Verlust der RNA-Bindekapazität vor.

Zusammen mit den Ergebnissen, die für die Deletion der  $J\alpha$ -Helix erbracht wurden, zeigt sich, dass die Helix zwar die Autoinhibition der ANTAR-Domäne im Dunkeln vermittelt, die Aufhebung dieser sterischen Hemmung im Licht aber nicht für eine effiziente RNA-Bindung ausreicht. Auch in Abwesenheit  $J\alpha$ -Helix kann RNA im Dunkeln nicht effizient an die ANTAR-Domäne binden, was darauf hindeutet, dass noch weitere strukturelle Änderungen von der Scharnierregion und der Helix an die ANTAR-Domäne weitergegeben werden. Dies könnte zum Beispiel unter der Ausnutzung der Salzbrücke zwischen R193 und E352 geschehen.

Eine andere Gruppe von LOV-Photorezeptoren die eine LOV-Domänen am C-Terminus aufweisen, sind die Aureochrome. Diese bestehen aus einem *basic leucine zipper* (bZIP) -DNA Bindemotiv und einer LOV-Domäne die ebenfalls über einen langen Adapter verknüpft sind (27). Sie lokalisieren lichtabhängig im Zellkern von einzelligen Algen und wirken dort als blau-lichtabhängige Transkriptionsfaktoren. Bisher war es noch nicht möglich, diese Proteine in voller Länge in ihrer Struktur zu charakterisieren, die ähnliche Architektur legt aber auch hier eine Reorientierung der LOV-Domäne und direkte Interaktion mit dem zu regulierenden bZIP-Motiv nahe. Erste Erkenntnisse aus *small angle x-ray scattering* und *HD-exchange* Experimenten von Aureochromen (84) zeigen zumindest die räumliche Nähe der beiden Domänen. Der Adapter besteht aus weniger Prolinen und ist strukturell gegebenenfalls weniger rigide als der von PAL.

In EPR-Experimenten wurde in dieser Arbeit eine Annäherung der LOV-Domänen nach Beleuchtung nachgewiesen (Vgl. Abbildung 21). Dies steht in Kontrast zum strukturell sehr ähnlichen, synthetischen Photorezeptor YF1. Auch wenn die Effektordomäne mit einer Histidinkinase eine andere ist, sind sowohl Ausrichtung der LOV-Domäne als auch der  $J\alpha$ -Helix sehr ähnlich (Abbildung 45). Trotz der umgekehrten Domänenarchitektur sind die Gemeinsamkeiten in der Signaltransduktion augenscheinlich. In EPR-Messungen wurde für YF1 jedoch eine Entfernung der LOV-Domänen nach Beleuchtung nachgewiesen, die mutmaßlich durch ein Verdrillen der  $J\alpha$ -Helices an die katalytische Domäne weitergegeben wird (85).



**Abbildung 45 Vergleich der Strukturen von PAL und dem synthetischen Photorezeptor YF1:** Oben sind die Domänenarchitekturen der Proteine gezeigt, im unteren Bereich die Kristallstrukturen. Die PAS-Domäne ist in hellgrün, die ANTAR-Domäne in petrol und die LOV-Domäne in lila hervorgehoben. Die J- $\alpha$ -helix ist in orange gekennzeichnet, eine zusätzlich in die ANTAR-Domäne integrierte Helix in gelb, die Dimerisierungsdomäne von YF1 hellrot und die katalytische Domäne dunkelrot (PDB ID YF1: 4GCZ PDB ID PAL 6HMJ, übernommen aus (44)).

Durch das Einführen von Punktmutationen kann diese Bewegung umgekehrt werden und damit das lichtabhängige Verhalten. Diese Befunde sind insofern von Interesse, als dass sie die Bewegung der LOV-Domäne auch in Multidomänenrezeptoren als Merkmal von LOV-vermittelter Signaltransduktion nahelegen, ähnlich wie es auch für die Aureochrome (86) vermutet wird. Zudem zeigt es, dass bei der Erstellung synthetischer Photorezeptoren Mechanismen ausgenutzt werden, die auch in natürlichen Proteinen vorkommen, sie also gute Modelle für mechanistische Untersuchungen sein können.

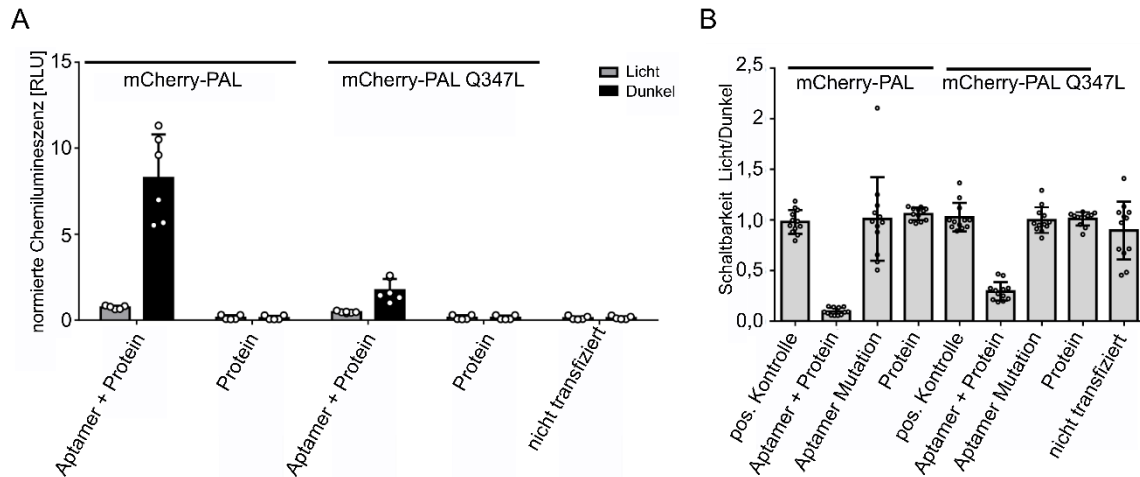
Der entwickelte bakterielle Assay wurde auch verwendet, um Mutationen der ANTAR-Domäne zu identifizieren, die die RNA-Interaktion beeinträchtigen. Alle der identifizierten Reste waren über die ANTAR-Domänen hinweg konservierte Aminosäuren, zwei der Reste waren zudem ins Domäneninnere gerichtet und haben mutmaßlich strukturelle Relevanz. F158 interagiert vermutlich direkt mit der RNA, da der Rest in verschiedenen ANTAR-Domänen auftritt, die unterschiedliche Zielsequenzen aufweisen, ist es unwahrscheinlich, dass es an der Sequenzspezifität der Domäne beteiligt ist.

Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass die initiale Erkennung der Zielsequenz der ANTAR-Domäne strukturbasiert ist, das heißt das durch die intakte Faltung der ANTAR-Domäne die Haarnadelschleifenstruktur der RNA zum Beispiel durch  $\pi$ - $\pi$ -Stapelwechselwirkungen erkannt wird. Die Sequenzspezifität für eine hochaffine Bindung könnte dann durch wenige Reste vermittelt werden. Im Fall von PALs Aptamersequenz liegen diese gegebenenfalls auf der nicht konservierten Adapterhelix, deren Entfernung zu einem Verlust der RNA-Bindekapazität führt.

Um zu prüfen, dass der kanonische LOV-Mechanismus von PAL durchlaufen wird, wurden einige Mutationen im bakteriellen Assay eingeführt um bekannte polare Interaktionen gezielt zu unterbinden. Um den Einfluss der mutierten Positionen deutlich zeigen zu können, wurden möglichst disruptive Aminosäureaustausche vorgenommen, wie das Umkehren der Polarität der Reste. Überraschenderweise zeigte die Punktmutante Q347L, die durch Ersetzen des konservierten Glutamins die Signaltransduktion unterbinden sollte, im bakteriellen Assay wildtypische Aktivität (Vgl. Abbildung 23). Auch in *in vitro* Untersuchungen zeigte es eine weitestgehend erhaltene Schaltbarkeit bei unveränderter Photochemie.

Zuvor wurde die konformationelle Änderung des Glutamins, ausgelöst durch die Protonierung des N5 Atoms des Flavins und der damit verbundenen Veränderung des Wasserstoffbrückennetzwerks, als Ausgangspunkt der Signaltransduktion in LOV-Domänen angesehen. Das unpolare Leucin kann diese durch polare Wechselwirkungen vermittelte Interaktion nicht eingehen und somit das Signal nicht wie angenommen weiterleiten. Die beobachtete geringere Effizienz der Signaltransduktion, die sich unter anderem in den sehr viel höheren  $K_D$ -Werten der PAL-RNA Interaktion niederschlägt (Vgl. Abbildung 25), könnte aber auf die geringere Stabilisierung der lichtadaptierten Struktur durch einen Wegfall der Wasserstoffbrücken zurückzuführen sein. Dafür spricht auch die pH-Abhängigkeit dieser Interaktion.

Untersuchungen der mutierten Variante indem bei *Weber et al.* (44) beschriebenen zellulären Assay zeigte eine Tendenz zur konstitutiven RNA-Bindung, aber dennoch eine dem Wildtyp ähnliche Dynamik der Schaltbarkeit. Dies demonstriert die Übertragbarkeit der *in vitro* Ergebnisse in verschiedene biologische Systeme (Abbildung 46). Gleichzeitig zeigen die Experimente wieder die Abhängigkeit der Effizienz der Regulierung von äußeren Faktoren auf. Auch wenn die festgestellte Aktivität der Punktmutante im getesteten zellulären System gering war, kann dies für andere Systeme nicht grundsätzlich angenommen werden.



**Abbildung 46 Luciferase basierter HeLa-Zell Assay:** A zeigt die Chemolumineszenz des Luciferase-Reporterproteins in Abhängigkeit von verschiedenen Konstruktkombinationen im Dunkeln und im Licht. Die Lumineszenz wurde sowohl in Anwesenheit von Protein und Aptamer, in Abwesenheit der Reportergens (Protein) und für untransfizierte Zellen getestet. B zeigt die Schaltbarkeit der einzelnen Systeme sowohl für das Original PAL als auch für die Punktmutante Q347L (Daten erhoben von Sebastian Pils und Christian Renzl, LiMES Bonn, 2019)

Zunächst wurde angenommen, dass das in PAL beobachtete Phänomen von intakter Signalweiterleitung bei fehlendem konserviertem Glutamin eine Eigenschaft der neu charakterisierten Proteinklasse ist. Aber in Experimenten zu AsLOV2 und YF1, die in der Arbeitsgruppe durchgeführt wurden, zeigte sich auch für diese Photorezeptoren nur eine beeinträchtigte, nicht aber eine entfallende Signaltransduktion.

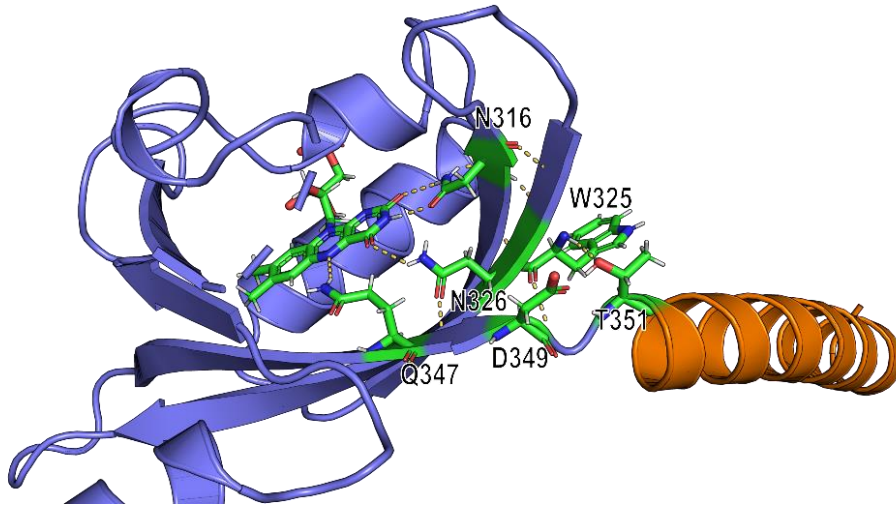
Die momentane Datenlage reicht nicht aus um einzuschätzen, ob die beobachtete Beeinträchtigung der Schaltbarkeit durch eine geringere Effizienz der Aktivierung der LOV Domäne oder eine verringerte Lebensdauer des lichtadaptierten Zustands ausgelöst wird. Dabei ist zu bemerken, dass die Kinetik der Photochemie, die sich zwischen PAL und PALQ347L nicht maßgeblich verändert, nicht zwangsläufig mit der Lebensdauer der lichtadaptierten Struktur korrelieren muss. Eine Entkopplung von photochemischer Rückreaktion und aktivem Zustand des Proteins ist denkbar, wenn die eingeführten Mutationen die Kommunikation zwischen Signal- und Effektor-domäne beeinträchtigen.

Die konformationelle Änderung des Glutamins ist anhand der Daten als nicht essentiell für die lichtabhängige Signaltransduktion zu bewerten. Die vom Chromophor im Verlauf des Photozyklus ausgebildete, kovalente Bindung zu einem konservierten Cystein, in PAL an Position 284, wurde ebenfalls als Signaltransduktionsmechanismus diskutiert (25). Es wurde aber sowohl für PAL in dieser Arbeit als auch für andere LOV-Proteine in der Vergangenheit gezeigt, dass auch das Cystein die Signalweiterleitung zwar unterstützt, aber nicht essentiell ist (24; 25).

Lichtabsorption des Chromophors führt auch in Abwesenheit des Cysteins zur Radikalbildung am C4a Atom und anschließend zur Protonierung des N5-Atoms, diese Schritte sind also weiterhin als auslösend für die Signaltransduktion zu betrachten. Entweder wird die Protonierung an der N5-Position erkannt, oder aber die Radikalbildung und resultierende Änderung der Flavinstruktur (87). Während der oxidierte Isoalloxazin-Ring klar planar und das reduzierte Flavin eine deutliche Biegung aus der Planarität heraus aufweist (88; 89; 90), zeigt das Radikal vermutlich nur eine leichte Verschiebung aus der Ebene heraus auf, die stark von der molekularen Umgebung und äußeren Einflüssen abhängt.

Die Protonierung des N5-Atoms des Isoalloxazin-Rings kann statt von der Seitenkette des Glutamins auch durch Wechselwirkungen mit dem Proteinerückgrat oder Wassermolekülen in der Bindungstasche erkannt werden. Die beobachtete Rotation des Glutamins wäre dann ein Resultat aus veränderten Rückgratwechselwirkungen des Proteins, welche die konformationelle Änderung an die distalen Bereiche der LOV-Domäne weitergeben. Wäre dies der Fall, sollte eine Mutation des konservierten Glutamins zu Prolin, das kein Wasserstoff an seinem Rückgrat aufweist, die Signaltransduktion der LOV-Domäne unterbinden. Es müsste allerdings geprüft werden, ob eine solche Änderung des Proteinerückgrats den Einbau des Chromophors beeinträchtigt.

Die Veränderung der Ringgeometrie des Chromophors könnte durch zwei konservierte Asparagin-Reste, in PAL an den Positionen 316 und 326, weitergegeben werden. Eine hohe Dynamik dieser Asparagine als Antwort auf die Lichtadaptierung wurden in verschiedenen Modellierungen postuliert (26; 91) eine geringe Beweglichkeit des N326 auch in kristallographischen Untersuchungen (92) beobachtet. Diese Dynamik wird jedoch als Resultat der Rotation des konservierten Glutamins interpretiert. Zudem wurde die starke Bewegung bisher nicht durch strukturgebende Verfahren bestätigt. Über Rückgratwechselwirkungen interagieren diese Reste in PAL, AsLOV2 und YF1 direkt mit einem benachbarten Tryptophan (Position 325), dessen Bewegung als Resultat der Lichtreaktion in der Vergangenheit beobachtet wurde (28; 91; 93) und der in LOV-Domänen ebenfalls hochkonserviert ist. Dieser Aromat wiederum steht über polare Wechselwirkungen in Kontakt mit dem in LOV-Domänen konservierten DVT Motiv (94) am Übergang zur  $\alpha$ -Helix und könnte durch in der Kristallstruktur sichtbare Interaktionen das Netzwerk aus polaren Wechselwirkungen in der Scharnier-Region der Helix stören (Abbildung 47). Das würde zu den Daten der in dieser Arbeit durchgeführten Mutationsanalyse passen, in denen W325A keine Lichtantwort zeigt und intermediäre RNA-Bindung aufweist (Vgl. Abbildung 18).



**Abbildung 47 Wasserstoffbrückennetzwerk im Bereich des Flavinchromophors von PAL:** Die LOV-Domäne ist in blau, die J- $\alpha$ -Helix in orange gekennzeichnet. Q347, N326 und N316 gehen polare Wechselwirkungen mit dem Chromophor ein, die enge räumliche Nachbarschaft von N326 und W325 ist aufgezeigt sowie die Wasserstoffbrücken die W325 mit dem DIT-Motiv in der Scharnierregion der J-  $\alpha$ -Helix einget.

Die Datenlage erlaubt keine abschließende Aussage zum tatsächlichen Ablauf der Signaltransduktion, in beiden oben beschriebenen Szenarien würde aber sowohl dem konservierten Cystein als auch dem Glutamin eine Rolle für die Stabilität der lichtaktivierten Struktur, nicht bei der direkten Signalweiterleitung zukommen. Ein anderer Grund für die hohe Konservierung des Glutamins in den LOV-Domänen ist möglicherweise das Abschirmen der Photochemie von pH-Einflüssen, sowie eine Verringerung der ROS-Ausbeute der Photoreaktion. Somit wären ursprüngliche LOV-Domänen auch ohne konserviertes Cystein und Glutamin in der Lage gewesen, auf Licht zu reagieren, jedoch wären die ausgebildeten lichtadaptierten Strukturen sehr kurzlebig und außerdem mit der Entstehung von hohen ROS Konzentrationen verbunden (24; 95). Die konservierten Reste entstanden evolutiv durch Selektionsdruck hin zur verringerten Bildung von radikalen Spezies und definierteren Licht- und Dunkelstrukturen.



#### 4.5 PAL als Werkzeug für die flüssig-flüssig Phasenseparation

In dieser Arbeit wurde das PAL-Protein eingesetzt um *in tandem* mit dem spezifisch interagierenden Aptamer flüssig-flüssig Phasenseparation auszulösen. In biologischen Systemen basiert dieser Vorgang auf Interaktion zwischen intrinsisch ungeordneten Regionen (IDR) von Proteinen und verschiedensten RNAs (96). Das in dieser Arbeit entwickelte synthetische System weist mit dem *nanobody* eine zusätzliche Komponente im Vergleich zu natürlichen Systemen auf. Außerdem beruht es auf Wechselwirkungen zwischen einer spezifischen Proteinstruktur mit einem sehr kurzen Aptamer, was im Kontrast steht von den vermutlich unspezifischen Wechselwirkungen zwischen IDR und langen RNA-Sequenzen (32; 97). Daher kann es das natürliche System nicht naturgetreu abbilden. Für quantitative Studien ist dieses auf ‚einfachen‘ Wechselwirkungen beruhende, modulares System jedoch sehr nützlich. Interaktionsbedingungen im Dunkeln und im Licht können für die einzelnen Komponenten bestimmt werden und vor allem das Verhalten des Fusionsproteins und der RNA auch separat betrachtet werden.

Durch ein Oligomerisierungselement direkt an den N-terminus von PAL kann die zusätzliche Komponente in weiterführenden Studien eingespart werden. Zusätzlich würde so auf die Verwendung der *lacI*-Helix verzichtet werden, die aufgrund des unklaren oligomeren Status der erhaltenen Fusionsproteine in dieser Arbeit zu Problemen führte. Durch Verwendung eines tetramerisierenden DsRed-PAL Fusionskonstrukts (98), würde gleichzeitig ein messbares Fluoreszenzsignal erhalten. In diesem Fall würde auch die spektrale Überschneidung der PAL- und der Reporterfluoreszenz minimiert.

Bei den in dieser Arbeit getesteten Bedingungen konnte zwar eine Bildung von Nukleationskeimen für größere Partikel festgestellt werden, die Ausbildung tatsächlich phasenseparierter, größerer Partikel war aber nur sehr selten nachweisbar (Vgl. Abbildung 40). Dies ist unter Umständen auf suboptimale Konzentrationsauswahl der Komponenten oder inhomogene Einzelkomponenten, nämlich den unspezifisch oligomerisierenden *nanobody* zurückzuführen. In einem auf oben beschriebene Weise angepassten System können weitere Analysen für optimierte Bedingungen durchgeführt werden. Auch Parameter, die in der Vergangenheit als wichtige Faktoren bei der Entstehung von phasenseparierten Organellen identifiziert wurden, wie das RNA/Protein Verhältnis und die Salzkonzentration (97), können in dem entwickelten System leicht überprüft werden.

Durch die Herstellung eines lichtschtbaren EYFP-PAL Konstrukts konnte zudem bewiesen werden, dass N-terminale Proteinfusionen an PAL toleriert werden, was weitere Möglichkeiten eröffnet. Durch die Fusion von PAL mit natürlich vorkommenden IDRs sowie dem Einsatz von natürlichen RNAs können die Eigenschaften der zellulären Phasenseparation zukünftig besser wiedergegeben werden. Insbesondere gibt es Hinweise darauf, dass die Phasenseparation im Nucleolus durch spezifische RNA-Protein Wechselwirkungen nur im Hintergrund unspezifischer, IDR-vermittelter Interaktion stattfindet (37). Da je nach untersuchter RNA-Spezies sowohl die Phasenseparation unterstützende (74) als auch verhindernde (37) Eigenschaften festgestellt wurden, ist auch das Testen verschiedener natürlicher RNAs in diesem System von Interesse.

Unabhängig vom natürlichen Kontext kann das in dieser Arbeit entwickelte System zur räumlichen und zeitlichen Kontrolle definierter RNA-Spezies in Zellen eingesetzt werden. Durch Phasenseparation oder auch durch das Ausbilden der hier beobachteten Nukleationskeime ist es möglich, RNA Spezies sehr schnell zu sequestrieren und unzugänglich für die Umgebung zu machen. Dieser Effekt wird auch für den Transport bestimmter, phasenseparierte *RNA-granules* über weite Strecken in Neuronen verwendet, wobei hier unter anderem mRNA für die lokale Translation bewegt werden (99; 100). Gerade die lokale Translation von RNA Spezies, die das PAL-Aptamer tragen, ließe sich durch lichtabhängige Phasenseparation sehr effektiv unterbinden.

### 4.6 Zusammenfassung und Ausblick

In dieser Arbeit konnte die Interaktion von PAL und seiner assoziierten Aptamere quantitativ untersucht werden, was die Basis für das Design weiterer Anwendungen ist. Vor allem die hohe Schaltbarkeit mit einem lichtabhängigen Unterschied der Dissoziationskonstanten von über 100x ist ein guter Ausgangspunkt für effiziente optogenetische Schalter. Auch die Stöchiometrie der Bindung eines Aptamers pro Proteindimer ist eine relevante Information für zukünftige Designs.

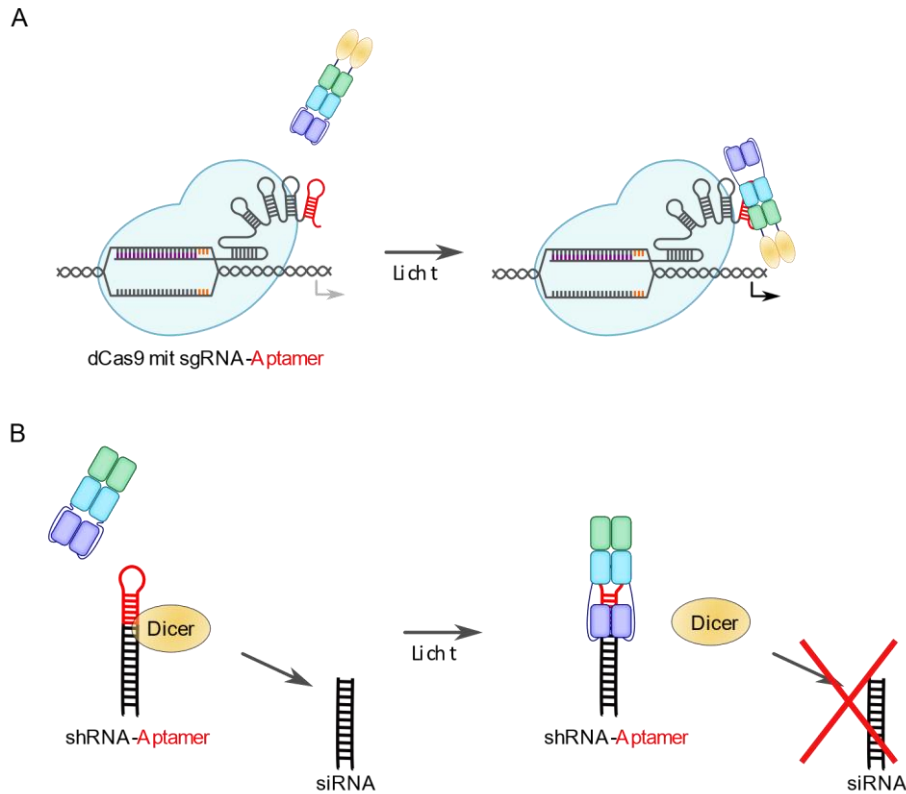
Mithilfe des entwickelten Interaktionsassays könnten zudem auch allgemeine Aspekte der ANTAR-RNA Interaktion untersucht werden. Hierfür könnte die PAL-ANTAR Domäne im Protein durch andere bekannte ANTAR-Domänen ersetzt, und deren Interaktion mit den putativen Bindemotiven *in vitro* untersucht werden. So könnten zum Beispiel die genauen RNA-Bindesequenzen von ANTAR-Domänen bestimmt werden. Zusätzlich würden dadurch neue RNA-Zielsequenzen mit unterschiedlichen Affinitäten der lichtabhängigen Kontrolle zugänglich.

Die Identifikation drei homologer Proteine in verwandten Organismen im Verlauf der Arbeit bestätigt die Entdeckung einer neuen Proteinklasse mit biologische Bedeutung, der lichtabhängigen RNA Bindung. Der nachgewiesene Photozyklus der NsPAL-Varianten bekräftigt die biologische Bedeutung der Lichtschaltbarkeit. Vor allem die variierten Rückkehrkinetiken im Vergleich zum NmPAL-Protein bieten die Möglichkeit, durch Kombination der einzelnen Domänen auch Tandem-Anwendungen zu entwickeln.

Durch das Implementieren eines bakteriellen Reporterassays wurde sowohl die Verwendung von PAL als rekombinanter lichtabhängiger Rezeptor demonstriert, als auch durch Mutationsstudien der Mechanismus der Signaltransduktion näher untersucht. Zusammen mit den Elektronenspinresonanz-Experimenten konnte ein erstes Modell für den Mechanismus der Signaltransduktion erstellt werden. Dass das entwickelte Testsystem zusätzlich ein starkes Instrument ist, um die Funktion der beteiligten Rezeptor- und Effektor-domäne zu untersuchen, zeigte sich an der Identifikation der Q347L Mutante, deren genauere Analyse zu neuen Erkenntnissen über den Mechanismus der LOV-Photorezeption führte. Diese Ergebnisse legen die Grundlage für weitere Forschung in diesem Bereich sowohl an PAL als auch an weiteren LOV-Photorezeptoren. Vor allem das optimierte Einplasmidsystem wird in Zukunft noch zu ausgedehnten Mutationsstudien genutzt werden.

Durch das Design und die Reinigung funktionaler Fusionsproteine und polyvalenter Aptamere konnten erste Experimente zur lichtabhängigen Phasenseparation durchgeführt werden. Diese demonstrieren die Anwendbarkeit der PAL-Aptamer-Interaktion für Phasenseparationsexperimente. In Zukunft können in diesem System wertvolle Erkenntnisse über die Entstehung und Dynamik dieser Organellen gewonnen werden, auch durch die Kombination mit natürlich phasenseparierenden Komponenten. Zum einen ist hierbei das Testen von Einflüssen wie der Konzentration der Komponenten, der Salzkonzentration und des pH-Werts des Mediums *in vitro* von Interesse. Auf diese Weise können Informationen zur Entstehung der teilweise pathogenen, phasenseparierten Netzwerke gerade in Nervenzellen gewonnen werden. Auch die Integration von natürlichen, phasenseparierenden Komponenten, sowohl auf RNA als auch auf Proteinseite sollten in Betracht gezogen werden. Zum anderen könnte durch das Sequestrieren in MLOs *in vivo* bestimmte RNA-Spezies sehr schnell abgereichert werden, in den MLOs wären sie für Interaktionspartner unzugänglich. Dadurch könnte die Funktion von lncRNAs, circRNAs, miRNAs und anderen RNA-Spezies orts- und zeitspezifisch untersucht werden. Hierbei sind die kurzen, spezifisch interagierenden Aptamere von Vorteil, die sich leicht in verschiedene RNA-Formen integrieren lassen sollten.

Mit der Entwicklung eines Werkzeugs für lichtabhängige Phasenseparation kann das PAL-Protein eine neuartige Regulation RNA-basierter Prozesse ermöglichen. Aber auch eine Verbesserung von bestehenden, RNA-basierten Systemen ist vorstellbar. In den bisher realisierten zellulären Anwendungen werden mit der Variation der Ribosomenbindestelle bzw. der 5'-UTR Sequenzen der mRNA vom Aufbau her zueinander verwandte Systeme eingesetzt. Für die eukaryotische Anwendung sind aber auch Kombinationen mit siRNA Ansätzen sowie den sgRNAs der CRISPRCas9 Systeme denkbar (101). Hier könnte das Aptamer und die PAL Bindung in Konkurrenz treten mit essentiellen Sekundärstrukturen der genannten Systeme. So könnte die sgRNA des CRISPRCas9-Systems modifiziert werden, um das PAL-Aptamer zu präsentieren. Auf diese Weise kann zum einen die Interaktion zwischen sgRNA und Cas9 moduliert werden. Zum anderen kann ein PAL-Fusionsprotein genutzt werden, um lichtabhängig Transkriptionsfaktoren an spezifische Genomabschnitte zu rekrutieren (102) (Abbildung 48A). Auch eine Maskierung der *Dicer*-Bindestelle auf der shRNA durch PAL als Reaktion auf Licht ist möglich (Abbildung 48B). Indem das PAL-Aptamer in die shRNA integriert wird, kann PAL lichtabhängig rekrutiert werden und damit die Prozessierung zur siRNA unterbinden (103).



**Abbildung 48 Schematische Darstellung denkbarer PAL-Anwendungen:** Das PAL-Aptamer kann mit der sgRNA des CRISPRCas9 Systems kombiniert werden, um in Kombination mit dCas9 Transkriptionsfaktoren lichtabhängig an spezifische Genomabschnitte zu rekrutieren (A). Eine Kombination des PAL-Aptamers mit der shRNA kann verwendet werden, um den Zugang des *Dicer*-Proteins an die RNA durch PAL lichtabhängig zu unterbinden, sodass die Konzentration spezifischer siRNA durch Licht gesteuert werden kann (B). (Teilweise modifiziert nach (101)).

Der in dieser Arbeit entwickelte Anisotropie-Interaktionstest und der bakterielle Reporterassay kann verwendet werden, um die Interaktion einer Vielzahl von modifizierten PAL-Aptamer Paaren zu untersuchen. Zudem werden die hier gewonnenen Daten zur Affinität und Stöchiometrie der PAL-Aptamer Interaktion sowie das mechanistische Verständnis von PAL die Grundlage für jede zukünftige Anwendungen bilden.

## 5. Literaturverzeichnis

- 1 *An Introduction to Spectroscopy for Biochemists*; Academic Press Inc. (1980);
- 2 Shichida, Y., Imai, H. (1998); *Visual pigment: G-protein-coupled receptor for light signals*; **Cellular and molecular life sciences : CMLS** 54 (12) 1299–1315.
- 3 Nagel, G., Ollig, D., Fuhrmann, M., Kateriya, S., Musti, A. M., Bamberg, E., Hegemann, P. (2002); *Channelrhodopsin-1: a light-gated proton channel in green algae*; **Science (New York, N.Y.)** 296 (5577) 2395–2398.
- 4 Boyden, E. S., Zhang, F., Bamberg, E., Nagel, G., Deisseroth, K. (2005); *Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity*; **Nature neuroscience** 8 (9) 1263–1268.
- 5 Zhang, F., Wang, L.-P., Brauner, M., Liewald, J. F., Kay, K., Watzke, N., Wood, P. G., Bamberg, E., Nagel, G., Gottschalk, A., Deisseroth, K. (2007); *Multimodal fast optical interrogation of neural circuitry*; **Nature** 446 (7136) 633–639.
- 6 Pashaie, R., Anikeeva, P., Lee, J. H., Prakash, R., Yizhar, O., Prigge, M., Chander, D., Richner, T. J., Williams, J. (2014); *Optogenetic brain interfaces*; **IEEE reviews in biomedical engineering** 7 3–30.
- 7 Deisseroth, K. (2011); *Optogenetics*; **Nature methods** 8 (1) 26–29.
- 8 Ziegler, T., Möglich, A. (2015); *Photoreceptor engineering*; **Frontiers in molecular biosciences** 2 30.
- 9 Eichenberg, K., Bäurle, I., Paulo, N., Sharrock, R. A., Rüdiger, W., Schäfer, E. (2000); *Arabidopsis phytochromes C and E have different spectral characteristics from those of phytochromes A and B*; **FEBS Letters** 470 (2) 107–112.
- 10 Pham, V. N., Kathare, P. K., Huq, E. (2018); *Phytochromes and Phytochrome Interacting Factors*; **Plant physiology** 176 (2) 1025–1038.
- 11 Tschowri, N., Busse, S., Hengge, R. (2009); *The BLUF-EAL protein YcgF acts as a direct anti-repressor in a blue-light response of Escherichia coli*; **Genes & development** 23 (4) 522–534.
- 12 Ohlendorf, R., Vidavski, R. R., Eldar, A., Moffat, K., Möglich, A. (2012); *From dusk till dawn: one-plasmid systems for light-regulated gene expression*; **Journal of molecular biology** 416 (4) 534–542.
- 13 Stüven, B., Stabel, R., Ohlendorf, R., Beck, J., Schubert, R., Möglich, A. (2019); *Characterization and engineering of photoactivated adenylyl cyclases*; **Biological Chemistry** 400 (3) 429–441.
- 14 Müller, K., Engesser, R., Schulz, S., Steinberg, T., Tomakidi, P., Weber, C. C., Ulm, R., Timmer, J., Zurbriggen, M. D., Weber, W. (2013); *Multi-chromatic control of mammalian gene expression and signaling*; **Nucleic acids research** 41 (12) e124.
- 15 Niopek, D., Benzinger, D., Roensch, J., Draebing, T., Wehler, P., Eils, R., Di Ventura, B. (2014); *Engineering light-inducible nuclear localization signals for precise spatiotemporal control of protein dynamics in living cells*; **Nature communications** 5 4404.
- 16 Bugaj, L. J., Choksi, A. T., Mesuda, C. K., Kane, R. S., Schaffer, D. V. (2013); *Optogenetic protein clustering and signaling activation in mammalian cells*; **Nature methods** 10 (3) 249–252.
- 17 Wu, Y. I., Frey, D., Lungu, O. I., Jaehrig, A., Schlichting, I., Kuhlman, B., Hahn, K. M. (2009); *A genetically encoded photoactivatable Rac controls the motility of living cells*; **Nature** 461 (7260) 104–108.
- 18 Ryu, M.-H., Moskvina, O. V., Siltberg-Liberles, J., Gomelsky, M. (2010); *Natural and engineered photoactivated nucleotidyl cyclases for optogenetic applications*; **The Journal of biological chemistry** 285 (53) 41501–41508.
- 19 Bongler, K. M., Rakhit, R., Payumo, A. Y., Chen, J. K., Wandless, T. J. (2014); *General method for regulating protein stability with light*; **ACS chemical biology** 9 (1) 111–115.

- 20 Möglich, A., Nack, J. (2017); *Biochemie 2016: Optische Kontrolle zellulärer Prozesse*; **Nachrichten aus der Chemie** 65 (3) 309–313.
- 21 Möglich, A., Ayers, R. A., Moffat, K. (2009); *Structure and signaling mechanism of Per-ARNT-Sim domains*; **Structure (London, England : 1993)** 17 (10) 1282–1294.
- 22 Kopka, B., Magerl, K., Savitsky, A., Davari, M. D., Röllen, K., Bocola, M., Dick, B., Schwaneberg, U., Jaeger, K.-E., Krauss, U. (2017); *Electron transfer pathways in a light, oxygen, voltage (LOV) protein devoid of the photoactive cysteine*; **Scientific reports** 7 (1) 13346.
- 23 Christian Bauer, Carl-Roland Rabl, Joachim Heberle, Tilmann Kottke (2011); *Indication for a Radical Intermediate Preceding the Signaling State in the LOV-Domain Photocycle*; **Photochemistry and photobiology** (87) 548–553.
- 24 Yee, E. F., Diensthuber, R. P., Vaidya, A. T., Borbat, P. P., Engelhard, C., Freed, J. H., Bittl, R., Möglich, A., Crane, B. R. (2015); *Signal transduction in light-oxygen-voltage receptors lacking the adduct-forming cysteine residue*; **Nature communications** 6 10079.
- 25 Brian D Zoltowski, Brian Vaccaro, Brian R Crane (2009); *Mechanism-based tuning of a LOV domain photoreceptor*; **Nature Chemical Biology** 5 (11) 827–834.
- 26 Freddolino, P. L., Gardner, K. H., Schulten, K. (2013); *Signaling mechanisms of LOV domains: new insights from molecular dynamics studies*; **Photochemical & photobiological sciences : Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology** 12 (7) 1158–1170.
- 27 A.B. Matiiv, E.M. Chekunova (2018); *Aureochromes - Blue Light Receptors*; **Biochemistry (Moscow)** 83 (6) 662–673.
- 28 Harper, S. M., Neil, L. C., Gardner, K. H. (2003); *Structural basis of a phototropin light switch*; **Science (New York, N.Y.)** 301 (5639) 1541–1544.
- 29 Taxis, C. (2017); *Development of a Synthetic Switch to Control Protein Stability in Eukaryotic Cells with Light*; **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)** 1596 241–255.
- 30 Richter, F., Fonfara, I., Bouazza, B., Schumacher, C. H., Bratovic, M., Charpentier, E., Möglich, A. (2016); *Engineering of temperature- and light-switchable Cas9 variants*; **Nucleic acids research** 44 (20) 10003–10014.
- 31 Sioud, M. (2020); *RNA and CRISPR Interferences: Past, Present, and Future Perspectives*; **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)** 2115 1–22.
- 32 Schütz, S., Nöldeke, E. R., Sprangers, R. (2017); *A synergistic network of interactions promotes the formation of in vitro processing bodies and protects mRNA against decapping*; **Nucleic acids research** 45 (11) 6911–6922.
- 33 Stochaj, U., Weber, S. C. (2020); *Nucleolar Organization and Functions in Health and Disease*; **Cells** 9 (3).
- 34 Parker, R., Sheth, U. (2007); *P bodies and the control of mRNA translation and degradation*; **Molecular cell** 25 (5) 635–646.
- 35 Toretsky, J. A., Wright, P. E. (2014); *Assemblages: functional units formed by cellular phase separation*; **The Journal of cell biology** 206 (5) 579–588.
- 36 Thelen, M. P., Kye, M. J. (2019); *The Role of RNA Binding Proteins for Local mRNA Translation: Implications in Neurological Disorders*; **Frontiers in molecular biosciences** 6 161.
- 37 Maharana, S., Wang, J., Papadopoulos, D. K., Richter, D., Pozniakovsky, A., Poser, I., Bickle, M., Rizk, S., Guillén-Boixet, J., Franzmann, T., Jahnel, M., Marrone, L., Chang, Y.-T., Sternecker, J., Tomancak, P., Hyman, A. A., Alberti, S. (2018); *RNA buffers the phase separation behavior of prion-like RNA binding proteins*; **Science (New York, N.Y.)**;
- 38 Tice, H., Mayilraj, S., Sims, D., Lapidus, A., Nolan, M., Lucas, S., Glavina Del Rio, T., Copeland, A., Cheng, J.-F., Meincke, L., Bruce, D., Goodwin, L., Pitluck, S., Ivanova, N., Mavromatis, K., Ovchinnikova, G., Pati, A., Chen, A., Palaniappan, K., Land, M., Hauser, L., Chang, Y.-J., Jeffries, C. D., Detter, J. C., Brettin, T., Rohde, M., Göker, M., Bristow, J., Eisen, J. A., Markowitz, V., Hugenholtz, P., Kyrpides, N. C., Klenk, H.-P., Chen, F. (2010);

- Complete genome sequence of Nakamurella multipartita type strain (Y-104)*; **Standards in genomic sciences** 2 (2) 168–175.
- 39 El-Gebali, S., Mistry, J., Bateman, A., Eddy, S. R., Luciani, A., Potter, S. C., Qureshi, M., Richardson, L. J., Salazar, G. A., Smart, A., Sonnhammer, E. L. L., Hirsh, L., Paladin, L., Piovesan, D., Tosatto, S. C. E., Finn, R. D. (2019); *The Pfam protein families database in 2019*; **Nucleic acids research** 47 (D1) D427–D432.
- 40 Ziegler, T. ((2020); *Engineering and Characterization of RNA-binding LOV photoreceptors*. University of Bayreuth.
- 41 Ramesh, A., DebRoy, S., Goodson, J. R., Fox, K. A., Faz, H., Garsin, D. A., Winkler, W. C. (2012); *The mechanism for RNA recognition by ANTAR regulators of gene expression*; **PLoS genetics** 8 (6) e1002666.
- 42 Morth, J. P., Feng, V., Perry, L. J., Svergun, D. I., Tucker, P. A. (2004); *The crystal and solution structure of a putative transcriptional antiterminator from Mycobacterium tuberculosis*; **Structure (London, England : 1993)** 12 (9) 1595–1605.
- 43 O'Hara, B. P., Norman, R. A., Wan, P. T., Roe, S. M., Barrett, T. E., Drew, R. E., Pearl, L. H. (1999); *Crystal structure and induction mechanism of AmiC-AmiR: a ligand-regulated transcription antitermination complex*; **The EMBO journal** 18 (19) 5175–5186.
- 44 Weber, A. M., Kaiser, J., Ziegler, T., Pilsl, S., Renzl, C., Sixt, L., Pietruschka, G., Moniot, S., Kakoti, A., Juraschitz, M., Schrottke, S., Lledo Bryant, L., Steegborn, C., Bittl, R., Mayer, G., Möglich, A. (2019); *A blue light receptor that mediates RNA binding and translational regulation*; **Nature Chemical Biology**;
- 45 Mallikaratchy, P. (2017); *Evolution of Complex Target SELEX to Identify Aptamers against Mammalian Cell-Surface Antigens*; **Molecules (Basel, Switzerland)** 22 (2).
- 46 Gibson, D. G., Young, L., Chuang, R.-Y., Venter, J. C., Hutchison, C. A., Smith, H. O. (2009); *Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases*; **Nature methods** 6 (5) 343–345.
- 47 Schägger, H., Jagow, G. von (1987); *Tricine-Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamid Gel Electrophoresis for the Separation of Proteins in the Range from 1 to 100 kDa*; **Analytical Biochemistry** (166) 368–379.
- 48 Andreas Möglich (2018); *An Open-Source, Cross-Platform Resource for Nonlinear Least-Squares Curve Fitting*; **Journal of Chemical Education** 95 (12) 2273–2278.
- 49 Gruber, A. R., Lorenz, R., Bernhart, S. H., Neuböck, R., Hofacker, I. L. (2008); *The Vienna RNA websuite*; **Nucleic acids research** 36 (Web Server issue) W70–4.
- 50 Don, R. H., Cox, P. T., Wainwright, B. J., Baker, K., Mattick, J. S. (1991); *'Touch-down' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification*; **Nucleic acids research** 19 (14) 4008.
- 51 Mathes, T., Vogl, C., Stolz, J., Hegemann, P. (2009); *In vivo generation of flavoproteins with modified cofactors*; **Journal of molecular biology** 385 (5) 1511–1518.
- 52 Engelhard, C., Raffelberg, S., Tang, Y., Diensthuber, R. P., Möglich, A., Losi, A., Gärtner, W., Bittl, R. (2013); *A structural model for the full-length blue light-sensing protein YtvA from Bacillus subtilis, based on EPR spectroscopy*; **Photochemical & photobiological sciences : Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology** 12 (10) 1855–1863.
- 53 Rainer E. Martin, Matthias Pannier, Francois Diederich, Volker Gramlich, Michael Hubrich, Hans W. Spiess (1998); *Determination of End-to-End Distances in a Series of TEMPO Diradicals of up to 2.8 nm Length with a New Four-Pulse Double Electron Electron Resonance Experiment*; **Angew. Chem. Int. Ed.** 37 (20).
- 54 Jeschke, G., Chechik, V., Ionita, P., Godt, A., Zimmermann, H., Banham, J., Timmel, C. R., Hilger, D., Jung, H. (2006); *DeerAnalysis2006—a comprehensive software package for analyzing pulsed ELDOR data*; **Applied Magnetic Resonance** 30 (3-4) 473–498.



- 55 Zhou, K., Zhou, L., Lim, Q. E., Zou, R., Stephanopoulos, G., Too, H.-P. (2011); *Novel reference genes for quantifying transcriptional responses of Escherichia coli to protein overexpression by quantitative PCR*; **BMC molecular biology** 12 18.
- 56 Alexandre, M. T. A., Arents, J. C., van Grondelle, R., Hellingwerf, K. J., Kennis, J. T. M. (2007); *A base-catalyzed mechanism for dark state recovery in the Avena sativa phototropin-1 LOV2 domain*; **Biochemistry** 46 (11) 3129–3137.
- 57 Banerjee, A., Herman, E., Serif, M., Maestre-Reyna, M., Hepp, S., Pokorny, R., Kroth, P. G., Essen, L.-O., Kottke, T. (2016); *Allosteric communication between DNA-binding and light-responsive domains of diatom class I aureochromes*; **Nucleic acids research** 44 (12) 5957–5970.
- 58 Babitzke, P., Baker, C. S., Romeo, T. (2009); *Regulation of translation initiation by RNA binding proteins*; **Annual review of microbiology** 63 27–44.
- 59 Lee, E. R., Blount, K. F., Breaker, R. R. (2009); *Roseoflavin is a natural antibacterial compound that binds to FMN riboswitches and regulates gene expression*; **RNA biology** 6 (2) 187–194.
- 60 Mandal, M., Breaker, R. R. (2004); *Adenine riboswitches and gene activation by disruption of a transcription terminator*; **Nature structural & molecular biology** 11 (1) 29–35.
- 61 Wachsmuth, M., Findeiß, S., Weissheimer, N., Stadler, P. F., Mörl, M. (2013); *De novo design of a synthetic riboswitch that regulates transcription termination*; **Nucleic acids research** 41 (4) 2541–2551.
- 62 Losi, A., Ghiraldelli, E., Jansen, S., Gärtner, W. (2005); *Mutational effects on protein structural changes and interdomain interactions in the blue-light sensing LOV protein YtvA*; **Photochemistry and photobiology** 81 (5) 1145–1152.
- 63 Zayner, J. P., Sosnick, T. R. (2014); *Factors that control the chemistry of the LOV domain photocycle*; **PloS one** 9 (1) e87074.
- 64 Krüger, D. M., Neubacher, S., Grossmann, T. N. (2018); *Protein-RNA interactions: structural characteristics and hotspot amino acids*; **RNA (New York, N.Y.)** 24 (11) 1457–1465.
- 65 Rahman, M. M., Muhseen, Z. T., Junaid, M., Zhang, H. (2015); *The aromatic stacking interactions between proteins and their macromolecular ligands*; **Current protein & peptide science** 16 (6) 502–512.
- 66 Tsukuno, H., Ozeki, K., Kobayashi, I., Hisatomi, O., Mino, H. (2018); *Flavin-Radical Formation in the Light-Oxygen-Voltage-Sensing Domain of the Photozipper Blue-light Sensor Protein*; **The journal of physical chemistry. B** 122 (38) 8819–8823.
- 67 Zoltowski, B. D., Schwerdtfeger, C., Widom, J., Loros, J. J., Bilwes, A. M., Dunlap, J. C., Crane, B. R. (2007); *Conformational switching in the fungal light sensor Vivid*; **Science (New York, N.Y.)** 316 (5827) 1054–1057.
- 68 Glantz, S. T., Berlew, E. E., Jaber, Z., Schuster, B. S., Gardner, K. H., Chow, B. Y. (2018); *Directly light-regulated binding of RGS-LOV photoreceptors to anionic membrane phospholipids*; **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 115 (33) E7720-E7727.
- 69 Liu, S.-W., Li, F.-N., Qi, X., Xie, Y.-Y., Sun, C.-H. (2019); *Nakamurella deserti sp. nov., isolated from rhizosphere soil of Reaumuria in the Taklamakan desert*; **International journal of systematic and evolutionary microbiology** 69 (1) 214–219.
- 70 Yan, X.-R., Chen, M.-S., Yang, C., An, M.-B., Li, H.-Y., Shi, H.-C., Tuo, L. (2020); *Nakamurella flava sp. nov., a novel endophytic actinobacterium isolated from Mentha haplocalyx Briq*; **International journal of systematic and evolutionary microbiology** 70 (2) 835–840.
- 71 Altschul, S. (1997); *Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs*; **Nucleic acids research** 25 (17) 3389–3402.

- 72 Dietler, J., Stabel, R., Möglich, A. (2019); *Pulsatile illumination for photobiology and optogenetics*; **Methods in enzymology** 624 227–248.
- 73 Espah Borujeni, A., Mishler, D. M., Wang, J., Huso, W., Salis, H. M. (2016); *Automated physics-based design of synthetic riboswitches from diverse RNA aptamers*; **Nucleic acids research** 44 (1) 1–13.
- 74 Lin, Y., Protter, D. S. W., Rosen, M. K., Parker, R. (2015); *Formation and Maturation of Phase-Separated Liquid Droplets by RNA-Binding Proteins*; **Molecular cell** 60 (2) 208–219.
- 75 Sinumvayo, J. P., Zhao, C., Tuyishime, P. (2018); *Recent advances and future trends of riboswitches: attractive regulatory tools*; **World journal of microbiology & biotechnology** 34 (11) 171.
- 76 Kubala, M. H., Kovtun, O., Alexandrov, K., Collins, B. M. (2010); *Structural and thermodynamic analysis of the GFP:GFP-nanobody complex*; **Protein science : a publication of the Protein Society** 19 (12) 2389–2401.
- 77 Lewis, M., Chang, G., Horton, N. C., Kercher, M. A., Pace, H. C., Schumacher, M. A., Brennan, R. G., Lu, P. (1996); *Crystal structure of the lactose operon repressor and its complexes with DNA and inducer*; **Science (New York, N.Y.)** 271 (5253) 1247–1254.
- 78 Gomelsky, M. (2011); *cAMP, c-di-GMP, c-di-AMP and now cGMP: bacteria use them all!*; **Molecular microbiology** 79 (3) 562–565.
- 79 Hengge, R. (2009); *Principles of c-di-GMP signalling in bacteria*; **Nature reviews. Microbiology** 7 (4) 263–273.
- 80 Alexander Serganov, Yu-Ren Yuan, Olga Pikovskaya, Anna Polonskaia, Lucy Malinina, Anh Tuan Phan, Claudia Hobartner, Ronald Micura, Ronald R Breaker, Dinshaw J Patel (2004); *Regulation of Gene Expression by Adenine-and Guanine Sensing mRNAs*; **Chemistry & biology** 11 1729–1741.
- 81 Stewart, V., van Tilbeurgh, H. (2012); *Found: the elusive ANTAR transcription anti-terminator*; **PLoS genetics** 8 (6) e1002773.
- 82 Chengyi J. Shu and Igor B. Zhulin (2002); *ANTAR: an RNA-binding domain in transcription antitermination regulatory proteins*; **TRENDS in Biochemical Sciences** 27 (1) 3–4.
- 83 Zoltowski, B. D., Vaccaro, B., Crane, B. R. (2009); *Mechanism-based tuning of a LOV domain photoreceptor*; **Nature Chemical Biology** 5 (11) 827–834.
- 84 Heintz, U., Schlichting, I. (2016); *Blue light-induced LOV domain dimerization enhances the affinity of Aureochrome 1a for its target DNA sequence*; **eLife** 5 e11860.
- 85 Engelhard, C., Diensthuber, R. P., Möglich, A., Bittl, R. (2017); *Blue-light reception through quaternary transitions*; **Scientific reports** 7 (1) 1385.
- 86 Takahashi, F., Yamagata, D., Ishikawa, M., Fukamatsu, Y., Ogura, Y., Kasahara, M., Kiyosue, T., Kikuyama, M., Wada, M., Kataoka, H. (2007); *AUREOCHROME, a photoreceptor required for photomorphogenesis in stramenopiles*; **THE PLANT CELL ONLINE** 104 (49) 19625–19630.
- 87 Halavaty, A. S., Moffat, K. (2007); *N- and C-terminal flanking regions modulate light-induced signal transduction in the LOV2 domain of the blue light sensor phototropin 1 from Avena sativa*; **Biochemistry** 46 (49) 14001–14009.
- 88 Choe, Y.-K., Nagase, S., Nishimoto, K. (2007); *Theoretical study of the electronic spectra of oxidized and reduced states of lumiflavin and its derivative*; **Journal of computational chemistry** 28 (4) 727–739.
- 89 Kao, Y.-T., Saxena, C., He, T.-F., Guo, L., Wang, L., Sancar, A., Zhong, D. (2008); *Ultrafast dynamics of flavins in five redox states*; **Journal of the American Chemical Society** 130 (39) 13132–13139.
- 90 Climent, T., González-Luque, R., Merchán, M., Serrano-Andrés, L. (2006); *Theoretical insight into the spectroscopy and photochemistry of isoalloxazine, the flavin core ring*; **The journal of physical chemistry. A** 110 (50) 13584–13590.

- 91 Iuliano, J. N., Collado, J. T., Gil, A. A., Ravindran, P. T., Lukacs, A., Shin, S., Woroniecka, H. A., Adamczyk, K., Aramini, J. M., Edupuganti, U. R., Hall, C. R., Greetham, G. M., Sazanovich, I. V., Clark, I. P., Daryaee, T., Toettcher, J. E., French, J. B., Gardner, K. H., Simmerling, C. L., Meech, S. R., Tonge, P. J. (2020); *Unraveling the Mechanism of a LOV Domain Optogenetic Sensor: A Glutamine Lever Induces Unfolding of the Ja Helix* 10.
- 92 Kalvaitis, M. E., Johnson, L. A., Mart, R. J., Rizkallah, P., Allemann, R. K. (2019); *A Noncanonical Chromophore Reveals Structural Rearrangements of the Light-Oxygen-Voltage Domain upon Photoactivation*; **Biochemistry**;
- 93 Nash, A. I., Ko, W.-H., Harper, S. M., Gardner, K. H. (2008); *A conserved glutamine plays a central role in LOV domain signal transmission and its duration*; **Biochemistry** 47 (52) 13842–13849.
- 94 Möglich, A., Ayers, R. A., Moffat, K. (2009); *Design and signaling mechanism of light-regulated histidine kinases*; **Journal of molecular biology** 385 (5) 1433–1444.
- 95 Westberg, M., Etzerodt, M., Ogilby, P. R. (2019); *Rational design of genetically encoded singlet oxygen photosensitizing proteins*; **Current opinion in structural biology** 57 56–62.
- 96 Järvelin, A. I., Noerenberg, M., Davis, I., Castello, A. (2016); *The new (dis)order in RNA regulation*; **Cell communication and signaling : CCS** 14 9.
- 97 Shin, Y., Berry, J., Pannucci, N., Haataja, M. P., Toettcher, J. E., Brangwynne, C. P. (2017); *Spatiotemporal Control of Intracellular Phase Transitions Using Light-Activated optoDroplets*; **Cell** 168 (1-2) 159-171.e14.
- 98 Wall, M. A., Socolich, M., Ranganathan, R. (2000); *The structural basis for red fluorescence in the tetrameric GFP homolog DsRed*; **Nature structural biology** 7 (12) 1133–1138.
- 99 Kiebler, M. A., Bassell, G. J. (2006); *Neuronal RNA granules: movers and makers*; **Neuron** 51 (6) 685–690.
- 100 Ohashi, R., Shiina, N. (2020); *Cataloguing and Selection of mRNAs Localized to Dendrites in Neurons and Regulated by RNA-Binding Proteins in RNA Granules*; **Biomolecules** 10 (2).
- 101 Richter, F., Fonfara, I., Gelfert, R., Nack, J., Charpentier, E., Möglich, A. (2017); *Switchable Cas9*; **Current opinion in biotechnology** 48 119–126.
- 102 Dahlman, J. E., Abudayyeh, O. O., Joung, J., Gootenberg, J. S., Zhang, F., Konermann, S. (2015); *Orthogonal gene knockout and activation with a catalytically active Cas9 nuclease*; **Nature biotechnology** 33 (11) 1159–1161.
- 103 Elbashir, S. M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., Tuschl, T. (2001); *Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells*; **Nature** 411 (6836) 494–498.

## 6. Abkürzungsverzeichnis

ANTAR-Domäne	<i>AmiR and NasR Transcription Antitermination Regulation-domain</i>	Domäne der AmiR- und NasR Transkriptions-Anitterminations-Regulation Gruppe
APS		Ammoniumperoxodisulfat
bp		Basenpaare
BSA		Bovines Serum Albumin
DMSO		Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Desoxy Ribonucleic Acid</i>	Desoxyribonukleinsäure
DTT		Dithiothreitol
EYFP	<i>Enhanced yellow fluorescent protein</i>	Verstärkt gelb fluoreszierendes Protein
FCS	<i>Fluorescence Correlation Spectroscopy</i>	Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie
dGTP/ATP/CTP/TTP		Desoxyguanosin-/Adenosin-/Cytosin/-Thymidintriphosphat
IDR	<i>Intrinsically disordered regions</i>	Intrinsich ungeordnete Regionen
IEX	<i>Ion Exchange Chromatography</i>	Ionen-Austauscher Chromatographie
IPTG		Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
LB	<i>Lysogeny broth</i>	Komplexes Nährmedium nach Luria-Bertani
LLPS	<i>Liquid-liquid phase separation</i>	Flüssig-flüssig Phasenseparation
LOV-Domäne	<i>Light-oxygen-voltage sensing domain</i>	Licht-Sauerstoff-Spannungs-Sensordomäne
MALS	<i>Multi Angle Light Scattering</i>	Vielwinkellichtstreuung
MLO		Membranlose Organellen
mRNA	<i>Messenger RNA</i>	-
NAD		Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NSQ	<i>Neutral Semi Quinone</i>	Neutrales Semi-Chinon
nt		Nukleotide
NTA	<i>Nitrilotriacetic acid</i>	Nitrilotriessigsäure
ORF	<i>Open Reading Frame</i>	Offener Leserahmen
PAGE		Polyacrylamid Gelelektrophorese
PAL		PAS-ANTAR-LOV Protein
PAS-Domäne		Per-Arnt-Sim – Domäne
PAZ-Domäne	<i>Piwi-Argonaut-Zwille-domain</i>	Piwi-Argonaut-Zwille-Domäne
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>	Polymerase Kettenreaktion
PEG		Polyethylenglykol
PVDF-Membran		Polyvinylidenfluorid-Membran
q RT PCR		Quantitative Reverse Transkriptions-PCR
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>	Ribonukleinsäure

RNP	<i>Ribonucleoprotein particle</i>	Ribonukleo-Protein-Partikel
SEC	<i>Size Exclusion Chromatography</i>	Größenausschlusschromatographie
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulphate</i>	Natriumdodecylsulfat
SELEX	<i>Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment</i>	Systematische Ligandenentwicklung durch exponentielle Anreicherung
TAE	Tris-Acetat-EDTA Puffer	
TAMRA		Tetramethylrhodamin
TBS	<i>Tris Buffered Saline</i>	Tris gepufferte Salinelösung
TCEP		Tris(2-carboxyethyl)phosphin
TEMED		N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylenediamine
tRNA	<i>Transfer RNA</i>	Transfer-RNAs
5'-UTR		5'-untranslatierte Region (der RNA)
VE-Wasser		Vollentsalztes Wasser
w/V	<i>weight per Volume</i>	Masse pro Volumen

7. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Übersicht über natürlich vorkommende Photorezeptoren.....	2
Abbildung 2 Regulation zellulärer Prozesse durch Photorezeptoren.....	3
Abbildung 3 Photoreaktion und Struktur der LOV-Photorezeptordomäne AsLOV2.....	5
Abbildung 4 Struktur der ANTAR-Domäne und Mechanismus der Antitermination. ....	8
Abbildung 5 Kristallstruktur und Photozyklus von PAL.....	9
Abbildung 6 <i>In Vitro</i> Charakterisierung von PAL. ....	10
Abbildung 7 Entwicklung der RNA Motive .....	11
Abbildung 8 Überblick über das Gibson-Assemblierungsprotokoll .....	22
Abbildung 9 Überblick über das Blunt-End Ligations Protokoll.....	23
Abbildung 10 Überblick über das Restriktionsklonierungsverfahren .....	24
Abbildung 11 Prinzip der Anisotropie Messung. ....	40
Abbildung 12 PAL-Aptamer Interaktion - Dissoziationskonstanten, Konkurrenz und Stöchiometrie .....	42
Abbildung 13 PAL Aptamer Interaktion - Kinetik, pH- und Temperaturabhängigkeit.....	44
Abbildung 14 Aufbau des PAL-Reporterassays .....	45
Abbildung 15 Erstellung und Optimierung des bakteriellen Reporterassays .....	46
Abbildung 16 Analyse des bakteriellen Reporterassays .....	48
Abbildung 17 Mutationsanalyse - Deletionen.....	50
Abbildung 18 Mutationsanalyse der PAL-LOV Domäne.....	52
Abbildung 19 Mutationsanalyse der PAL-Signaltransduktion. ....	53
Abbildung 20 Mutationsanalyse der PAL-RNA Bindung .....	54
Abbildung 21 PAL C284 A und Elektronenspinresonanz Spektroskopie .....	56
Abbildung 22 Schema des PAL-Mechanismus.....	57
Abbildung 23 PAL Q347L im Reportersystem.....	58
Abbildung 24 Spektrale Untersuchung von PAL Q347L .....	59
Abbildung 25 Anisotropie Messung von PAL Q347L.....	60
Abbildung 26 Verwandtschaft der verschiedenen PAL- Homologen anhand der Proteinsequenz. ....	62
Abbildung 27 Multiples Sequenzalignment der verschiedenen PAL-Varianten .....	63
Abbildung 28 Analyse der Photochemie von NsPAL1 und NsPAL2.....	64
Abbildung 29 Analyse der Faltung und Stabilität von NsPAL1 und NsPAL2.....	66
Abbildung 30 Messung der Interaktion zwischen dem 04.17 Aptamer und NsPAL1 und 2. ...	67
Abbildung 31 Entwicklung und Optimierung des Einplasmidsystems.....	68
Abbildung 32 Analyse von NsPAL1 und Konstruktbibliotheken im Einplasmidsystem. ....	70
Abbildung 33 Prinzip der Flüssig-Flüssig Phasenseparation mithilfe von PAL.....	73
Abbildung 34 Synthese der Poly-Aptamer-Zielsequenzen .....	73
Abbildung 35 Spektrale Untersuchung der LLPS Komponenten .....	74
Abbildung 36 Anisotropie-Untersuchungen zur Interaktion von EYFP-PAL und Polyaptameren .....	75
Abbildung 37 Größenausschlusschromatographie und Vielwinkel-Lichtstreuung der Interaktion von EYFP und <i>nanobody-lacI</i> .....	77
Abbildung 38 Exemplarische Daten einer FCS-Messung von EYFP-PAL ohne und in Anwesenheit des EYFP- <i>nanobodies</i> .....	79
Abbildung 39 FCCS Kurven der einzelnen Messbedingungen .....	80
Abbildung 40 Zeitverlauf der FCCS-Messung .....	81

Abbildung 41 Kultivierung von <i>Nakamurella multipartita</i> .....	83
Abbildung 42: Vorkommen der Aptamersequenzen im Genom von <i>N. multipartita</i> .....	84
Abbildung 43: Sequenzalignment von NsPAL1 und einer Di-Guanylat-Cyclase .....	86
Abbildung 44 Sequenz und Sekundärstruktur des <i>nasF</i> -operon <i>leaders</i> als Terminator- und NasR-bindender Antiterminator .....	87
Abbildung 45 Vergleich der Strukturen von PAL und dem synthetischen Photorezeptor YF1 .....	91
Abbildung 46 Luciferase basierter HeLa-Zell Assay.....	93
Abbildung 47 Wasserstoffbrückennetzwerk im Bereich des Flavinchromophors von PAL ...	95
Abbildung 48 Schematische Darstellung denkbarer PAL-Anwendungen .....	100

## 8. Tabellenverzeichnis

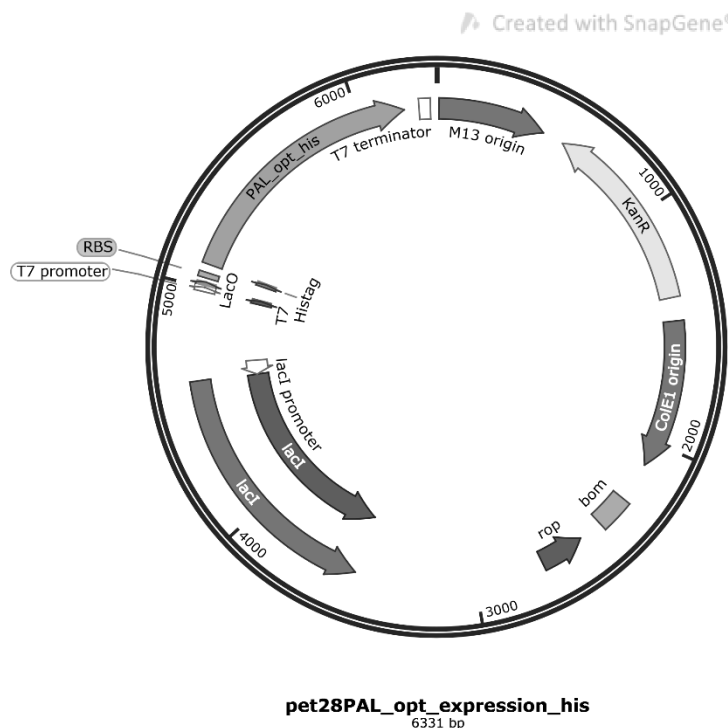
Tabelle 1: Feinchemikalien, Enzyme und Proteine.....	17
Tabelle 2: Komponenten der Polymerase Kettenreaktion.....	20
Tabelle 3: Protokoll der Polymerase-Kettenreaktion .....	21
Tabelle 4: Komponenten des Gibson-Assemblierungs-Master Mix .....	21
Tabelle 5: Zusammensetzung des Ligationsansatzes für die Restriktionsklonierung .....	24
Tabelle 6: Zusammensetzung der Stammlösungen für SDS-Polyacrylamid Gele.....	27
Tabelle 7: Zusammensetzung der SDS-Gele für Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Schägger .....	28
Tabelle 8: Komponenten der Reversen Transkriptionsreaktion - 1 .....	37
Tabelle 9: Komponenten der Reversen Transkriptionsreaktion - 2 .....	38
Tabelle 10: Zusammensetzung der q-PCR Ansätze .....	38
Tabelle 11: Protokoll der q-PCR-Reaktion .....	38
Tabelle 12: Berechnete mittlere Diffusionszeiten und assoziierte Standardabweichungen .....	80

## 9. Anhang

### 9.1 Plasmidkarten

#### Expressionsplasmid PAL

Verwendet für die Reinigung des PAL-Proteins aus *E.coli* cmpx13 Kulturen. Das Protein unterliegt der Kontrolle eines T7 Promotors und die Expression wird durch IPTG induziert. Die kodierte Kanamycin-Resistenz verhindert einen Verlust des Plasmids bei langer Kultivierungsdauer. Ein C-terminaler Hexahistidin-tag erlaubt die Reinigung des Proteins aus geklärem Zelllysat durch Nickel-NTA Affinitätschromatographie.



#### >pet28PAL\_opt\_expression\_his (6331 bp)

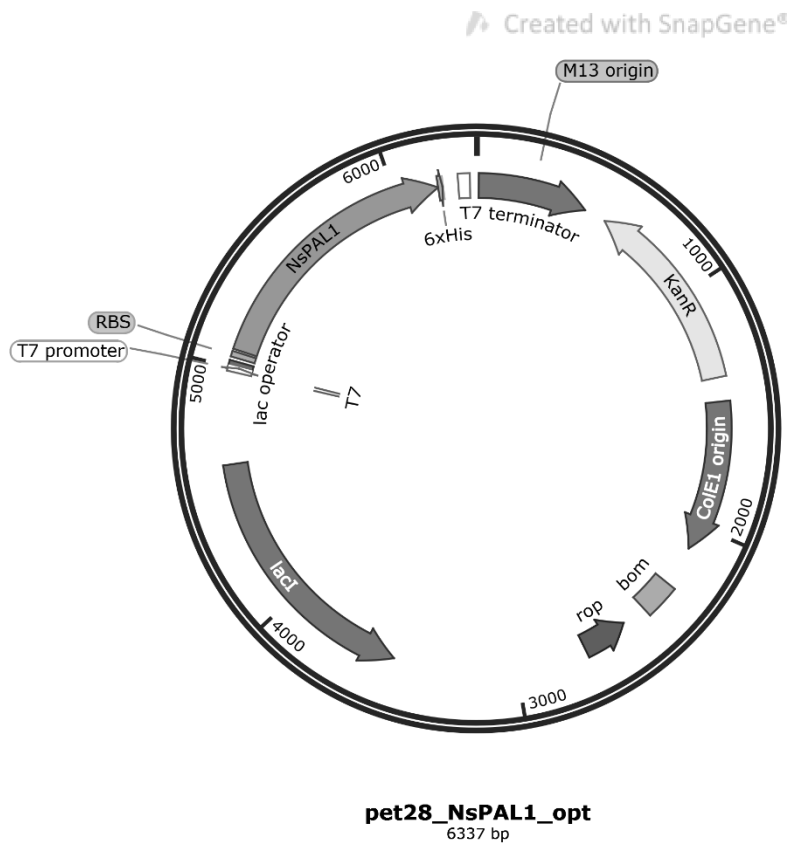
```
TGGCGAATGGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTG
CCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTTCGCTTTCTTCCCTTCTTCTCGCCACGTTCCGCCGGCTTTCCCGTCAAGCTCTA
AATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAATTGATTAGGGTGATGGTTC
ACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGT
TCCAAACTGGAACAACACTCAACCCATCTCGGTCTATTCTTTTGATTATAAGGGATTTTGCCGATTTCCGGCCTATTGG
TAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTTAACAAAAATTAACGTTTACAATTTCCAGTGCCACTTT
TCGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAATTAATTC
TAGAAAACTCATCGAGCATCAAATGAAACTGCAATTTATTCATATCAGGATTATCAATACCATATTTTTGAAAAAGCCG
TTTCTGTAATGAAGGAGAAAACACTCACCAGGCAGTTCCATAGGATGGCAAGATCCTGGTATCGGTCTGCGATTCCGACTC
GTCCAACATCAATACAACCTATTAATTTCCCTCGTCAAAAATAAGGTTATCAAGTGAGAAAATCACCATGAGTGACGACT
GAATCCGGTGAGAAATGGCAAAAGTTTATGCATTTCTTCCAGACTTGTTCAACAGGCCAGCCATTACGCTCGTCAATCAA
ATCACTCGCATCAACCAACCGTTATTCATTCGTGATTGCGCCTGAGCGAGACGAAATACGCGATCGCTGTAAAAGGAC
AATTACAACAGGAATCGAATGCAACCGGCGCAGGAACACTGCCAGCGCATCAACAATATTTTCCACGTAATCAGGATAT
TCTTCTAATACCTGGAATGCTGTTTTCCCGGGGATCGCAGTGGTGAGTAACCATGCATCATCAGGAGTACGGATAAAATG
CTTGATGGTTCGGAAGAGGCATAAATCCGTCAGCCAGTTTAGTCTGACCATCTCATCTGTAACATCATTGGCAACGCTAC
CTTTGCCATGTTTCAGAAACAACCTGGCGCATCGGGCTTCCCATCAATCGATAGATTGTCGCACCTGATTGCCCGACA
TTATCGCGAGCCCATTTATACCCATATAAATCAGCATCCATGTTTGGAAATTTAATCGCGGCCATAGAGCAAGACGTTTTCCCG
TTGAATATGGCTCATAACACCCCTTGATTAATGTTTATGTAAGCAGACAGTTTTTATTGTTTCATGACCAAAAATCCCTTAA
CGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGT
AATCTGCTGCTTGCAACAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTTGTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTTC
CGAAGGTAACCTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAATACTGTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACCTTCAAG
AATCTGTAGCACCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCT
```



TACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCCGGGCTGAACGGGGGGTTTCGTGCACACAGCCCA  
GCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGA  
AAGCGGACAGGTTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTA  
TCTTTATAGTCTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGCGGAGCCTAT  
GGAAAAACGCCAGCAACCGCGCCTTTTTACGGTTTCTGGCCTTTTTGTGGCCTTTTTGTGCACATGTTCTTTCTGCGTTA  
TCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGACGCCGAACGACCGAGCGCAG  
CGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCTGATGCGGTATTTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTACACCCGCA  
TATATGGTGCACCTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGTATACACTCCGCTATCGCTACGTGACTG  
GGTCATGGCTGCGCCCCGACACCCGCCAACACCCGCTGACGCGCCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCGGCATCCGCTTACA  
GACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTGACAGGTTTTACCGTTCATCACCGAAACGCGGAGGCGAGCTGCGG  
TAAAGCTCATCAGCGTGGTCTGTAAGCGATTACAGATGTCTGCCTTTCATCCGCTCCAGCTCGTTGAGTTTTCTCCAG  
AAGCGTTAATGTCTGGCTTCTGATAAAGCGGGCCATGTTAAGGGCGGTTTTTTCTGTTTGGTCACTGATGCCTCCGTGT  
AAGGGGATTTCTGTTTATGGGGTAAATGATACCGATGAAACGAGAGAGGATGCTCAGATACGGGTTACTGATGATGAA  
CATGCCCGGTTACTGGAACGTTGTGAGGGTAAACAACCTGGCGGTATGGATGCGGCGGACCAGAGAAAAATCACTCAGGG  
TCAATGCCAGCGCTTCGTTAATACAGATGTAGGTGTTCCACAGGGTAGCCAGCAGCATCTCGCATGCAGATCCGGAACA  
TAATGGTGCAGGGCGCTGACTTCCGCGTTTCCAGACTTTACGAAACCGGAAACCGAAGACCATTGTTGTTGCTCAG  
GTCGCAGACGTTTTGACGAGCAGTCGCTTACGTTTCGCTCGCGTATCGGTGATTTCATCTGCTAACCCAGTAAGGCAACC  
CCGCCAGCCTAGCCGGTCTCAACGACAGGAGCAGATCATGCGCACCCGTGGGGCCGCCATGCCGGCGATAATGGCCT  
GCTTCTCGCCGAAACGTTTTGGTGGCGGGACAGTGACGAAGGCTTGAGCGAGGGCGTGCAAGATTCCGAATACCGCAAGC  
GACAGGCCGATCATCTGCGCTCCAGCGAAAGCGTCTCGCCGAAAATGACCCAGAGCGCTGCCGGCACCTGTCTTAC  
GAGTTGCATGATAAAGAAGACAGTCAAGTGCAGGACGATAGTCAATGCCCGCGCCACCAGGAGGAGCTGACTGGGT  
TGAAGGCTCTCAAGGGCATCGGTGAGATCCCGTGCCTAATGAGTGAGCTAATTAATTAATGCGTTGCGCTCACTG  
CCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGCTGTCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGGGGAGAGGCGGTTTTGCGTAT  
TGGCGCCAGGGTGGTTTTTTCTTTTTACCAGTGAGACGGGCAACAGCTGATTGCCCTTACCAGCCTGGCCCTGAGAGAGT  
TGCAGCAAGCGGTCCACGCTGGTTTTGCCCCAGCAGGCGAAAATCCTGTTTGTGATGGTGGTTAACGGCGGGATATAACATGA  
GCTGTCTTCGGTATCGTCTGATCCCACTACCGAGATATCCGCACCAACGCGCAGCCCGGACTCGGTAATGGCGCGCATTG  
CGCCAGCGCCATCTGATCGTTGGCAACCAGCATCGCAGTGGGAACGATGCCCTCATTGAGCATTGTCATGGTTTTGTTGA  
AAACCGGACATGGCACTCCAGTCGCTTCCCGTTCGCTATCGGCTGAATTTGATTGCGAGTGAGATATTTATGCCAGCC  
AGCCAGCAGCGCAGCGCCGAGCAGAACTTAATGGGCCCCGTAACAGCGCGATTGCTGGTGACCCAATGCGACAGAT  
GCTCCAGCCCCAGTCGCTACCGTCTTCATGGGAGAAAATAACTGTTGATGGGTGTCTGGTCAGAGACATCAAGAAAT  
AACCGCGAAACATTTAGTGACAGGCGCTTCCACAGCAATGGCATCCTGGTCATCCAGCGGATAGTTAATGATCAGCCACT  
GACGCGTTGCGCGAGAAGATTGTGCACCGCGCTTTACAGGCTTCGACGCGCTTCGTTCTACCATCGACACCACCACGC  
TGGCACCCAGTTGATGCGCGGAGATTTAATCGCCGCGACAATTTGCGACGGCGCGTGACGGCCAGACTGGAGGTGGCA  
ACGCCAATCAGCAACGACTGTTTTGCCCGCCAGTTGTTGTGCCACGCGGTTGGGAATGTAATTCAGCTCCGCCATCGCCGC  
TTCCACTTTTTCCCGCTTTTTCGCAGAAACGTGGCTGGCCTGGTTACCACGCGGGAAACGGTCTGATAAGAGACACCGG  
CATACTCTGCGACATCGTATAACGTTACTGGTTTTACATTCACCACCCTGAATGACTCTCTTCCGGGCGCTATCATGCC  
ATACCGCGAAAGGTTTTGCGCATTTCGATGGTGTCCGGGATCTCGACGCTCTCCCTTATGCGACTCCTGCATTAGGAAGC  
AGCCAGTAGTAGGTTGAGGCGGTTGAGCACCGCCCGCAAGGAATGGTGCATGCAAGGAGATGGCGCCCAACAGTCCC  
CCGGCCACGGGGCTGCCACCATAACCCAGCCGAAACAAGCGCTCATGAGCCGAAGTGGCGAGCCCGATCTTCCCCATC  
GGTGTGTCGGCGATATAGGCGCCAGCAACCGCACCTGTGGCGCCGGTATGCCGGCCACGATGCGTCCGGCGTAGAGGA  
TCGAGATCTCGATCCCGCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGGAATTTGTGAGCGGATAACAATTTCCCTCTAGAAATAA  
TTTTGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACCATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCACAAAGTTAATCGTCCGGCAGA  
ACGTGCCAGCTTTGGTAGCTTTGTTCTGGATGCAGGTAGCGCACGTTTTGTTGGTAGTGATGAACCTGGCACTGGTTCTGG  
GTTTTGCACCGGGTATGTTGTTCTGACACCGCGAGTTGTTCTGGCACATCTGCATCCTGATGATCGTCTGGAATGGCAG  
GCAGGTCTGCAGCGTTGTCTGGCAACCGGTGCTCCGGTGGTTGTTAATCATCTGCTGCTGACCGCAGAGCAGAACCAGC  
TCCGGCAATGACAACCCTGACCGCACTGACCGAACAGGATCGTGTGCGTGCAGTTACCGGTGTTATTACCGATCTGAGCG  
ATCGTGTTCGTGTCGCAACCGAAGCAGAAATTCGTGAGGCGAGTTCGTGCAGCAGCAGCAACCCGTAGCGAAATGATCAG  
GCAAAAGGTATGTTATGGCAGCCTTTGATGTTGATGCAGATCAGGCATTTGCACTGCTGAAATGGCATAGCAGCCAGAG  
CAATCGTAAACTGCGTGCATCTGGCCACCGGATGATTGAAGGTCTGGCAGCAGCCAATAGCGCACTGCCGCTGCGTCTGCT  
GTCTGAGCACCGTTTTTACCAGATATGGGTTGTCCGGCACCGAGCACCAAGGTTGGACCGTTCCCGTGACCGATATTGGT  
CTGCCCTCCGACCAGCGGTCTGATTCGACAGCAGCTGCTGCCTGGTATTCTGACCCGTGCAGCACATGATGCAAGCGTTGC  
AATTACCGTTGACAGATGTTACCGCACCGGATCAGCCTCTGGTTTTATGCAAAATCCTGCATTTGAACGCTGACCGGTTATG  
CAGCAGCCGAAGTTCTGGGTCGTAATTGTCGTTTTCTGACAGCAGAAAGCGGTGATCCGCATGAACGTAGCGCAATTCGT  
AGCGCCATTGCAAAATGGTGCAGTGACCACACTGATTCGTAATTTTCGTGAGGATGGTCATGCCTTTTGGAAACGAATT  
TCATCTGAGTCCGGTTCGTAATGGTGCAGGTGCTGTTACCCATTACATTTGGTTATCAGCTGGATGTGACCGAACGTGTTG  
AACGTGATCAGCAGCTGGAACAGCTGGCAAGCTAAGATCCGGCTGCTAACAAAGCCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCT  
GCCACCGCTGAGCAATAACTAGCATAACCCCTTGGGGCCTCTAACACGGGCTTTGAGGGGTTTTTTGCTGAAAGGAGGAAC  
TATATCCGGAT

## Expressionsplasmid NsPAL1

Verwendet für die Reinigung des NsPAL1-Proteins aus *E.coli* cmpx13 Kulturen. Das Protein unterliegt der Kontrolle eines T7 Promotors und die Expression wird durch IPTG induziert. Die kodierte Kanamycin-Resistenz verhindert einen Verlust des Plasmids bei langer Kultivierungsdauer. Ein C-terminaler Hexahistidin-*tag* erlaubt die Reinigung des Proteins aus geklärtem Zelllysat durch Nickel-NTA Affinitätschromatographie.



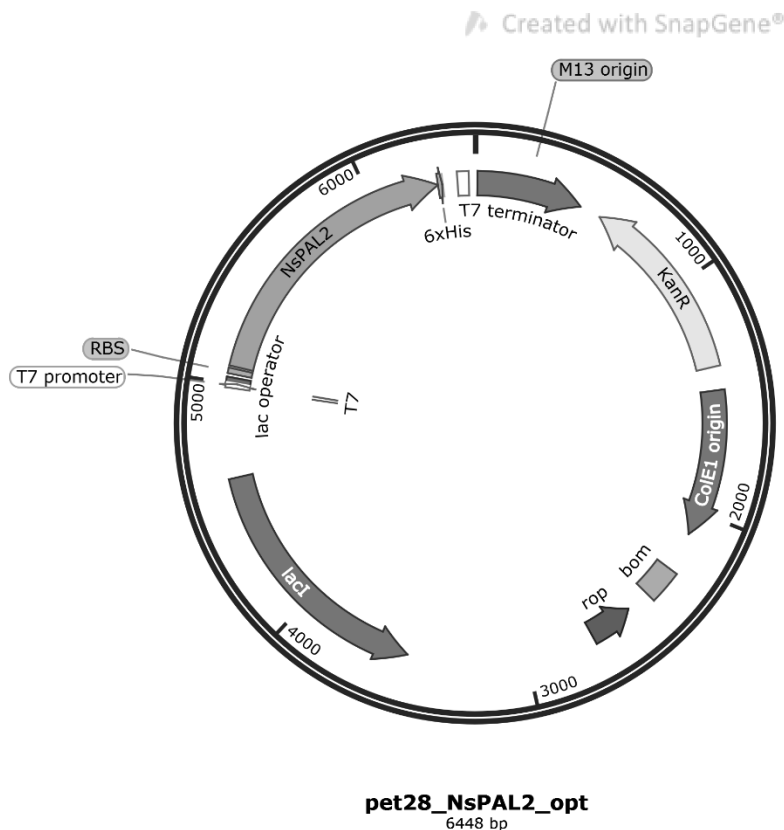
### >pet28NsPAL1\_opt\_expression\_his (6337 bp)

```
TGGCGAATGGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCCTACACTTG
CCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTTCGCTTTCTTCCCTTCCCTTTCTCGCCACGTTTCGCGGCTTTCCCCGTCAAGCTCTA
AATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCGATTTAGTGCCTTACGGCACCTCGACCCAAAAAACTTGATTAGGGTGATGGTTC
ACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGT
TCCAAACTGGAACAACACTCAACCCCTATCTCGGTCTATTCTTTTGATTTATAAGGGATTTTGCCGATTTTCGGCCTATTGG
TTAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTTAACAAAAATTTAACGTTTACAATTTTCAGTGGCCTTTT
TCGGGGAATGTGCGGGAACCCCTATTTGTTTTATTTTCTAAATACATTTCAAATATGTATCCGCTCATGAATTAATCT
TAGAAAACTCATCGAGCATCAAATGAAACTGCAATTTATTATATCAGGATTATCAATACCATATTTTGAAGGAGCCG
TTTCTGTAATGAAGGAGAAAACCTACCGAGGCAGTTCCATAGGATGGCAAGATCCTGGTATCGGTCTGCGATTCCGACTC
GTCCAACATCAATACAACCTATTAATTTCCCCTCGTCAAAAATAAGGTTATCAAGTGAGAAATCACCATGAGTGACGACT
GAATCCGGTGAGAATGGCAAAAGTTTATGCATTTCTTCCAGACTTGTTC AACAGGCCAGCCATTACGCTCGTCATCAA
ATCACTCGCATCAACCAACCGTTATTCATTCGTGATTGCGCCTGAGCGAGACGAAATACGCGATCGCTGTTAAAAGGAC
AATTACAACAGGAATCGAATGCAACCGGCGCAGGAACACTGCCAGCGCATCAACAATATTTTACCCTGAATCAGGATAT
TCTTCTAATACCTGGAATGCTTTTTCCCGGGGATCGCAGTGGTGAGTAACCATGCATCATCAGGAGTACGGATAAAAATG
CTTGATGGTTCGGAAGAGGCATAAATTCGTCAGCCAGTTTAGTCTGACCATCTCATCTGTAACATCATTGGCAACGCTAC
CTTTGCCATGTTTTCAGAAACAACCTGCGCATCGGGCTTCCCATACAATCGATAGATTGTCGCACCTGATTGCCCGACA
TTATCGCGAGCCCATTTATACCCATATAAATCAGCATCCATGTTGGAATTTAATCGCGGCTAGAGCAAGACGTTTCCCG
TTGAATATGGCTCATAACACCCCTTGTATTACTGTTTATGTAAGCAGACAGTTTTTATGTTTCATGACCAAAATCCCTTAA
CGTGAGTTTTCTGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTCTGCGCGT
AATCTGCTGCTTGCAAAACAAAAAACCCGCTACCAGCGGTGGTTTTGTTGCGCGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTTC
CGAAGGTAAGTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAATACTGTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCCTTCAAG
AACTCTGTAGCACCGCTACATAACCTCGCTCTGCTAATCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCT
TACCGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTTCGGGCTGAACGGGGGTTTCGTGCACACAGCCCA
GCTTGAGAGCAACGACCTACACCGAAGTACGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGTTCCCGAAGGGAGA
AAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAAACGCTGGTA
TCTTTATAGTCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTGCATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGGGAGCCCTAT
GAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCTTGGCCTTTTGTGTCGCTTTTGTTCACATGTTCTTCTGCGTTA
```

TCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGACGCCGAACGACCGAGCGCAG  
 CGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCTGATGCGGTATTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTACACCCGCA  
 TATATGGTGCACCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGATAGTTAAGCCAGTATACTCCGCTATCGCTACGTGACTG  
 GGTCATGGCTGCGCCCGACACCCGCAACACCCGCTGACGCGCCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCGGCATCCGCTTACA  
 GACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTGAGAGTTTTTACCCTCATCACCGAAACGCGCGAGGCAGCTGCGG  
 TAAAGCTCATCAGCGTGGTCTGAAGCGATTACAGATGTCTGCCTGTTTATCCGCTCCAGCTCGTTGAGTTTCTCCAG  
 AAGCGTTAATGTCTGGCTTCTGATAAAGCGGGCCATGTTAAGGGCGTTTTTTTCTGTTTGGTCACTGATGCCCTCCGCTG  
 AAGGGGATTTCTGTTTATGAGGGTAAATGATACCGATGAAACGAGAGAGGATGCTCAGGATACGGGTTACTGATGATGAA  
 CATGCCCGGTTACTGGAACGTTGTGAGGGTAAACAACCTGGCGGTATGGATGCGGCGGGACCAGAGAAAAATCACTCAGGG  
 TCAATGCCAGCGCTTCGTTAATACAGATGTAGGTGTTCCACAGGGTAGCCAGCAGCATCTCCGATGCAGATCCGGAACA  
 TAATGGTGCAGGGCGCTGACTTCCGCTTTCCAGACTTTACGAAACACGGAACCGAAGACCATTTCATGTTGTTGCTCAG  
 GTCGACAGCGTTTTTGCAGCAGCAGTCTTACGTTTCGCTCGCTATCGGTGATTCATTCTGCTAACCCAGTAAGGCAACC  
 CCGCCAGCCTAGCCGGTCTCAACGACAGGAGCAGATCATGCGCACCCGTTGGGGCCGCATGCCGGCGATAATGGCT  
 GCTTCTCGCCGAAACGTTTGGTGGCGGGACCAGTGACGAAAGGCTTGAGCGAGGGCGTGAAGATTCCGAAATACCGCAAGC  
 GACAGGCCGATCATCGTTCGCTCCAGCGAAAGCGTCTCGCCGAAATGACCCAGAGCGCTGCCGGCACCTGTCTTAC  
 GAGTTGCATGATAAAGAAGACAGTCATAAGTGCGGCGACGATAGTTCATGCCCGCGCCACCGGAAGGAGCTGACTGGGT  
 TGAAGGCTCTCAAGGCATCGGTCCGATCCCGGTGCCCTAATGAGTGAGCTAAGTACATTAATGCGTTGCGCTCAGT  
 CCGCTTTCCAGTCCGGAACCTGTGTCGAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTTGCGTAT  
 TGGGGCCAGGGTGGTTTTTTCTTTTACCAGTGAGACGGGCAACAGCTGATTGCCCTTACCAGCCTGGCCCTGAGAGAGT  
 TGCAGCAAGCGGTCCAGCTGGTTTTGCCCCAGCAGGCGAAATCCTGTTTATGATGGTGGTTAACGGCGGGATATAACATGA  
 GCTGCTTCCGTTATCGTGCATCCACTACCGAGATATCCGCACCAACGCGCAGCCCCGACTCGGTAATGGCGCGCATTG  
 CGCCAGCGCCATCTGATCGTTGGCAACCAGCATCGCAGTGGGAACGATGCCCTCATTTCAGCATTTCATGAGTTTGTGTA  
 AAACCGGACATGGCACTCCAGTGCCTTCCGTTCCGCTATCGGCTGAATTTGATTGCGAGTGAGATATTTATGCCAGCC  
 AGCCAGACGACAGCGCCGAGACAGAACTTAATGGGCCGCTAACAGCGCGATTTGCTGGTGACCCAAATGCGACCCAGAT  
 GCTCCACGCCAGTTCGCTACCGTCTTCATGGGAGAAAATAATACTGTTGATGGGTGTCTGGTCAGAGACATCAAGAAAT  
 AACGCCGAACATTAGTGCAGGCAGCTTCCACAGCAATGGCATCCTGGTTCATCCAGCGGATAGTTAATGATCAGCCACT  
 GACGGTTGCGCGAGAAGATTGTGCACCGCCGCTTTACAGGCTTCGACGCCGCTTCGTTCTACCATCGACACCACCACGC  
 TGGCACCCAGTTGATCGGCGCGAGATTTAATCGCCGCGACAATTTGCGACGGCGCGTGCAGGGCCAGACTGGAGGTGGCA  
 ACGCAATCAGCAACGACTGTTTTGCCCGCCAGTTGTTGTGCCACGCGGTTGGGAATGTAATTCAGCTCCGCCATCGCCCG  
 TTTCACTTTTTCCCGGTTTTTCGAGAAACGTGGCTGGCTGGTTTACCACGCGGGAAACGGTCTGATAAGAGACACCCG  
 CACTCTGCGACATCGTATAACGTTACTGGTTTTACATTCACCACCTGAATTGACTCTCTTCCGGGCGCTATCATGCC  
 ATACCCGAAAGGTTTTGCGCCATTCGATGGTGTCCGGGATCTCGACGCTCTCCCTTATGCGACTCTGCATTAGGAAGC  
 AGCCAGTAGTAGGTTGAGGCCGTTGAGCACCGCCCGCAAGGAATGGTGCATGCAAGGAGATGGCGCCCAACAGTCCC  
 CCGGCCACGGGGCTGCCACCATACCCAGCCGAAACAAGCGCTCATGAGCCGAAGTGGCGAGCCCGATCTTCCCCATC  
 GGTGATGTGGCGATATAGGCGCCAGCAACCGCACCTGTGGCGCCGGTATGCCCGCCAGATGCGTCCGGCGTAGAGGA  
 TCGAGATCTCGATCCCGGAAATTAATACGACTACTATAGGGGAATTTGTGAGCGGATAACAATTTCCCTCTAGAAATAA  
 TTTTGTAACTTTAAGAAGGAGATATACCATGGATCTGATCGTCCGACCAGCATGAATCCGAGCAGCGCCAGCTTTGT  
 TGTACAGGCGATCGTCCGGTCTGAGCGCAGCAACCGGCTGGCACGCTGTTAGGTTTTGGTATGGCCATGATCCGG  
 TTACCACCACCGCAGCATGGTCAGCACATCTGCCCTCGCTGGATCGTATCTGTGGTCAGCCCGTGCAGAAGAATGTCGT  
 AGCAGCGGCACACCGGAGTTCTGCGTTCATCGTCTGGTACCGCAGATGGCGGTGAACGTTGTTGTTGAGCACCTTTGT  
 TCCGGCAGCCGGTGTCTGTTGGTGTTCATGTTGTTGTGGCCGATCTGACCGATGAAGTTTCGTGAAGCAGCACGTCAC  
 AGACCCGTGAAGCCGTTAGCCGTGCAACCCAGACACGTTGAAGTTATGATCAGGCAAAAGGTATTATGATGGTTGTGCTG  
 GATCTGGATGCAGAACAGGCATTTGATCTGCTGCTGGCATAGCAGCCGTCGAATGTTAACTGCGCGATATTTGTG  
 AGCCGTTATTGATGAATGGCAGCGGGTGAACCCGCCACCCGACCTCGTCAGCGTCTGGCAGGCGTTTTTGCAGCACTGG  
 GTAGCACAGCACACCGGCTCTGGTTGGACCCGTAGCGCAGGTGAGAGCCGATGTCAGCAGCAGAGAAGCAGCCGAAAGC  
 GCAAGCCATATTCCTGCCACTGCTGCCTGGTATTTGACCCGTGCAGTTGCAGATGCAGCAGTTAGCATTACCGTTGC  
 AGATATGACCGTTCCGCATCGTCCGCTGGTTTTATGTTAATCCGGCATTTGAACGCTTGACCGGTTATGCAGCAGCCGATG  
 TTCTGGGTGCTAATTTGCTGTTTTCTGCAGGGTATCATACCAATGATGAACAGAATCAGGCAATTCGCGAAGCAATGCGT  
 GATGGCCGTAGCACCGATACACTGATTCGTAATTTTACAGCAGATGGCACCCCGTTTTTGAATGAATTTTCACTGAGTCC  
 GGTTCGTAATGTTTATGGTCTGACCCATTACATTTGGTTATCAGCTGGATGTTACCGAACGTTGGAACCTGAAGAAC  
 AGCTGCGTCTGCTGGCTTTTcacCATcacCATcactgaGATCCGGCTGCTAACAAAGCCGAAAGGAACTGAGTTG  
 GCTGCTGCCACCGTGAACAATAACTAGCATAAACCCTTGGGGCCTTAAACGGGCTTTGAGGGTTTTTTGCTGAAAGG  
 AGAACTATATCCGGAT

## Expressionsplasmid NsPAL2

Verwendet für die Reinigung des NsPAL2-Proteins aus *E.coli* cmpx13 Kulturen. Das Protein unterliegt der Kontrolle eines T7 Promotors und die Expression wird durch IPTG induziert. Die kodierte Kanamycin-Resistenz verhindert einen Verlust des Plasmids bei langer Kultivierungsdauer. Ein C-terminaler Hexahistidin-*tag* erlaubt die Reinigung des Proteins aus geklärtem Zellysate durch Nickel-NTA Affinitätschromatographie.



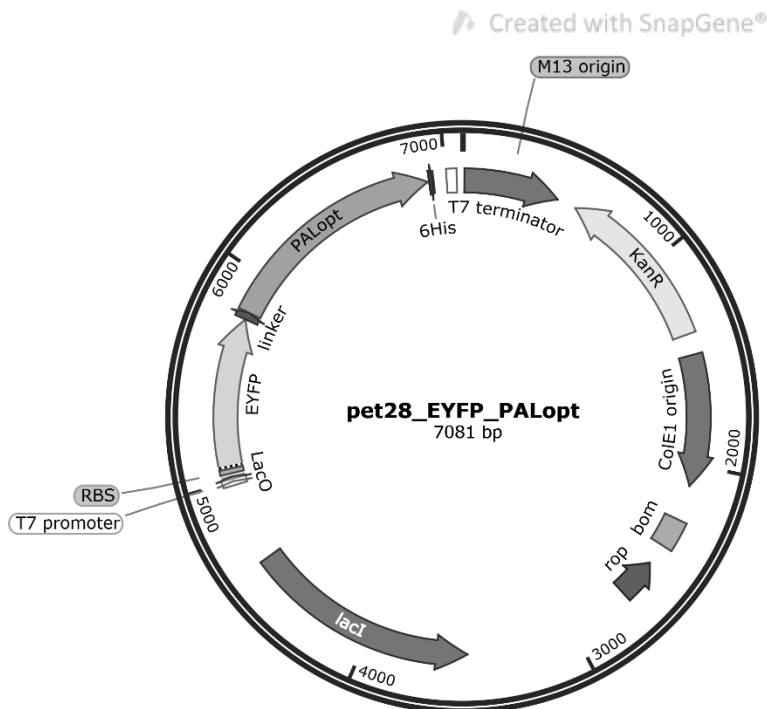
### >pet28NsPAL2\_opt\_expression\_his (6448 bp)

```
TGGCGAATGGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGCGGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTG
CCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTTCGCTTTCTTCCCTTCCCTTCTCGCCACGTTCCGCCGGCTTTCCCCGTC AAGCTCTA
AATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCGATTTAGTGTCTTACGGCACCTCGACCCAAAAAAGTTGATTAGGGTGATGGTTC
ACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGT
TCCAAACTGGAACAACACTCAACCCATCTCGGTCTATTCTTTTGATTTATAAGGGATTTTGCCGATTTCCGGCCTATTGG
TTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTTAACAAAAATTAACGTTTACAATTTCCAGTGGCACTTT
TCGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTTATTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAATTAATTTCT
TAGAAAACTCATCGAGCATCAAATGAAACTGCAATTTATTTCATATCAGGATTATCAATACCATATTTTTTGAAAAAGCCG
TTTTCTGTAATGAAGGAGAAAACTCACCAGGCAGTTCCATAGGATGGCAAGATCCTGGTATCGGTCTGCGATTCCGACTC
GTCCACATCAATACAACCTATTAATTTCCCCTCGTCAAAAATAAGGTTATCAAGTGAGAAAATACCATGAGTGACGACT
GAATCCGGTGAGAAATGGCAAAAAGTTTATGCATTTCTTTCCAGACTTGTTC AACAGGCCAGCCATTACGCTCGTCAATAA
ATCACTCGCATCAACCAAACCGTTATTCATTCGTGATTGCGCCTGAGCGAGACGAAATACGCGATCGCTGTTAAAAGGAC
AATTACAACAGGAATCGAATGCAACCGGCGCAGGAACACTGCCAGCGCATCAACAATATTTTCACCTGAATCAGGATAT
TCTTCTAATACCTGGAATGCTGTTTTCCC GGGGATCGCAGTGGTGAGTAACCATGCATCATCAGGAGTACGGATAAAATG
CTTGATGGTTCGGAAGAGGCATAAATCCGTCAGCCAGTTTAGTCTGACCATCTCATCTGTAACATCATTGGCAACGCTAC
CTTTGCCATGTTTCAGAAACAACCTTGCGCATCGGGCTTCCCATACAATCGATAGATTGTGCGCACCTGATTGCCCGACA
TTATCGCGAGCCCATTTATACCCATATAAATCAGCATCCATGTTGGAATTTAATCGCGCCCTAGAGCAAGACGTTTTCCCG
TTGAATATGGCTCATAACACCCCTTGTATTACTGTTTATGTAAGCAGACAGTTTTATTGTTTCATGACAAAAATCCCTTAA
CGTGAGTTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGT
AATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTTGTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTTC
CGAAGGTAACCTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAATACTGTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAG
AACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCTGTTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCT
TACCGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAAGCGCAGCGGTTCGGCTGAACGGGGGGTTTCGTGCACACAGCCCA
GCTTGGAGCGAACCGCTACACCGAAGTACGATACCTACAGCGTGTAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTTCCGAAGGGAGA
AAGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAAACGCTGGTA
TCTTTATAGTCTGTCGGGTTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTGCATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGGGAGCCAT
GGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCTTGGCCTTTTGTGTCACATGTTCTTCTCGCTT
```

TCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGACGCCGAACGACCGAGCGCAG  
 CGAGTCAGTGAGCGGAGGAAGCGGAAGAGCGCCTGATGCGGTATTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTACACCCGCA  
 TATATGGTGCACCTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGATAGTTAAGCCAGTATACACTCCGCTATCGCTACGTGACTG  
 GGTCATGGCTGCGCCCGGACACCCGCAACACCCGCTGACGCGCCCTGACGAAACCGAAGACCATTTCATGTTGTTGCTCAG  
 GACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTGAGAGTTTTTACCCTCATCACCGAAACGCGCGAGGCAGCTGCGG  
 TAAAGCTCATCAGCGTGGTCTGTAAGCGATTACAGATGTCTGCCTGTTTCATCCGCTCCAGCTCGTTGAGTTTCTCCAG  
 AAGCGTTAATGTCTGGCTTCTGATAAAGCGGGCCATGTTAAGGGCGTTTTTTCTGTTTGGTCACTGATGCCCTCCGTGT  
 AAGGGGATTTCTGTTTCATGGGGTAAATGATACCGATGAAACGAGAGAGGATGCTCAGGATACGGGTTACTGATGATGAA  
 CATGCCCGGTTACTGGAACGTTGTGAGGGTAAACAACCTGGCGGTATGGATGCGGCGGGACCAGAGAAAAATCACTCAGGG  
 TCAATGCCAGCGCTTCGTTAATACAGATGTAGGTGTTCCACAGGGTAGCCAGCAGCATCTCCGATGCAGATCCGGAACA  
 TAATGGTGCAGGGCCTGACTTCCGCTTTCCAGACTTTACGAAACCGGAAACCGAAGACCATTTCATGTTGTTGCTCAG  
 GTCGACAGCGTTTTGACGACGAGTCTGCTTACGTTTCGCTCGCTATCGGTGATTTCATCTGCTAACCCAGTAAGGCAACC  
 CCGCCAGCCTAGCCGGTCTCAACGACAGGAGCAGATCATGCGCACCCGTTGGGCGCCATGCCGCGATAATGGCCT  
 GCTTCTCGCCGAAACGTTTGGTGGCGGGACAGTGACGAAAGGCTTGAGCGAGGGCGTGCAAGATTCCGATACCGCAAGC  
 GACAGGCCGATCATCGTTCGCTCCAGCGAAAGCGTCTCGCCGAAATGACCCAGAGCGCTGCCGCGACCTGTCTTAC  
 GAGTTGCATGATAAAGAAGACAGTCATAAGTGCGGCGACGATAGTTCATGCCCGCGCCACCGGAAGGAGCTGACTGGGT  
 TGAAGGCTCTCAAGGCATCGGTGAGATCCCGGTGCCCTAATGAGTGAGTAACTTACATTAATTCGCTTGCCTCAGT  
 CCCGCTTTCCAGTCCGGAACCTGTGTCGAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGGGGAGAGGCGGTTTTGCGTAT  
 TGGGCGCCAGGGTGGTTTTTTCTTTTACCAGTGAGACGGGCAACAGCTGATTGCCCTTACCAGCCTGGCCCTGAGAGAGT  
 TGCAGCAAGCGGTCCAGCTGGTTTTGCCCCAGCAGGCGAAAATCCTGTTTATGATGGTGGTTAACGGCGGGATATAACATGA  
 GCTGTCTTCGGTATCGTGCATCCCACTACCGAGATATCCGCACCAACGCGCAGCCCCGACTCGGTAATGGCGCGCATTG  
 CGCCAGCGCCATCTGATCGTTGGCAACCAGCATCGCAGTGGGAACGATGCCCTCATTTCAGCATTTCATGGTTTTGTTGA  
 AAACCGGACATGGCACTCCAGTGCCTTCCGTTCCGCTATCGGCTGAATTTGATTGCGAGTGAGATATTTATGCCAGCC  
 AGCCAGACGACAGCGCCGAGACAGAACTTAATGGGCCGCTAACAGCGCGATTTCGTTGGTGACCCAAATGCGACCCAGAT  
 GCTCCACGCCAGTTCGCTACCGTCTTCATGGGAGAAAATAATACTGTTGATGGGTGTCTGGTCAGAGACATCAAGAAAT  
 AACGCCGAACATTAGTGCAGGCAGCTTCCACAGCAATGGCATCCTGGTTCATCCAGCGGATAGTTAATGATCAGCCCACT  
 GACGGTTGCGCGAGAAGATTGTGCACCGCCGTTTTACAGGCTTCGACGCCGCTTCGTTCTACCATCGACACCACCACGC  
 TGGCACCCAGTTGATCGGCGGAGATTTAATCGCCGCGACAATTTGCGACGGCGCGTGACAGGGCCAGACTGGAGGTGGCA  
 ACGCAATCAGCAACGACTGTTTTGCCCGCCAGTTGTTGTGCCACGCGGTTGGGAATGTAATTCAGCTCCGCCATCGCCCG  
 TCCACTTTTTCCCGGTTTTTCGAGAAACGTGGCTGGCTGGTTTACCACGCGGGAAACGGTCTGATAAGAGACACCCG  
 CATACTCTGCGACATCGTATAACGTTACTGGTTTTACATTCACCACCTGAATTGACTCTCTTCCGGGCGTATCATGCC  
 ATACCCGGAAAGGTTTTGCGCCATTCGATGGTGTCCGGGATCTCGACGCTCTCCCTTATGCGACTCTGCATTAGGAAGC  
 AGCCAGTAGTAGGTTGAGGCCGTTGAGCACCGCCCGCAAGGAATGGTGCATGCAAGGAGATGGCGCCCAACAGTCCC  
 CCGGCCACGGGGCTGCCACCATACCACGCGGAAACAAGCGCTCATGAGCCGAAGTGGCGAGCCCGATCTTCCCCATC  
 GGTGATGTGGCGATATAGGCGCCAGCAACCGCACCTGTGGCGCCGGTATGCCGGCCACGATGCGTCCGGCGTAGAGGA  
 TCGAGATCTCGATCCCGGAAATTAATACGACTACTATAGGGGAATTTGTGAGCGGATAACAATCCCCCTTAGAAATAA  
 TTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACCATGGGTGAGGGTAGCCGTTGTGGTAGCCGTAGCACCCGATGAAGTTCCGTCG  
 TGTTACCAGATACAAAAGCACCGTTCCGGGTGTTGAAGCAGCAGCAACCCATAGTCCGCCCTCCGGTCCGCCTTTTGGTC  
 GTTTTAGCCATGATGTTTCGTACCCGTCGTACCGTTTTGGACCGATCGTACCTATGGTATTTATGGTTTTGGTCCGGGTGAA  
 GTTGTTCGACACTGGATCTGATGAGCAGCATGTTTCATCCGGAAGATCGTCCGCGTTGGGATGCAGCAGTTGCAGGTAG  
 CCTGCAGACCGGTGCAACCTTTTTGTGAATGGCTGCGTCTGGTTGATACCCGTCGAAAGTTTCGTACCGTCTGGCAGTTG  
 GTTATGCAGCGGGTGCAGCCGGTGGTGTAGCGTTGTTAGCGTTTTGTTGTTGATCTGACCGCAGGTTCTGCGTCTCAT  
 CGTGAACAAGAAACCACAGTGCAGTTATTGATGCCGACGACCCGATGATCTGATTGAACAGGCAAAAAGGTATGATGAT  
 GGTGATTTTTGACCTGACCGAAGCACAGGCATTTGATCTGCTGCGTTGGCATAGCAGCCATAAATAACATTAATACTGCGTG  
 ATGTTGCGGCAACCCGTTGTTGAACGCTGGTTGATCCGGAACGAGCGGACCCGTCGCGTGAACGCTGACCGCCATT  
 CTGGCAGGTCTGAAAAAAGCGGTGGCACCGCACGTCGCCCTCTGCCTGCTCCGGTTGCAACACCGCGTCCGGCAACAGC  
 CACTCCGCGTACCGGTGGTACAACACCGGCAGGTCGTCGATATTAGCGGTGCCGATCTGCCTCGTACAATGGTTCTGTGCAG  
 TGAGCGTTGCAGCCGTTAGCATTACCATTCAGATTTGGCTGGACCCGGAACAGCCGCTGGTTTATGTTAATGATGCATTT  
 GCAACCCCTGACCGGTTATAGCAGTATGAAATTCGGGTCGTAATTCGCCGTTTTCTGCAGGGTCTGATAGCGATCAGCG  
 TGCCGTTAAAGAAATGCGTCAGGCCTGGATACCGGTCGTGATGTGCGTAGCGTTCTGCGTAATTATCGTAAAGATGGTA  
 CAGCCTTTTGAACGAAGTTCATCTGAGCGCAGTTTCGTGATGATGCAGGTCGATTTACCCATTACATTTGGTTATCAGAGT  
 GATGTTAGCGAACGTTGTTGAACGTGAAGAACAGCTGCGTAGCCTGGCATATcacCATcacCATcactgaGATCCGGC  
 TGCTAACAAAGCCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAATAACTAGCATAAACCCTTGGGCGCTCTA  
 AACGGTCTTGAGGGTTTTTTGCTGAAAGGAGGAACTATATCCGGAT

## Expressionsplasmid EYFP-PAL

Verwendet für die Reinigung des EYFP-PAL-Proteins aus *E.coli* cmpx13 Kulturen. Das Protein unterliegt der Kontrolle eines T7 Promotors und die Expression wird durch IPTG induziert. Die kodierte Kanamycin-Resistenz verhindert einen Verlust des Plasmids bei langer Kultivierungsdauer. Ein C-terminaler Hexahistidin-*tag* erlaubt die Reinigung des Proteins aus geklärtem Zellysate durch Nickel-NTA Affinitätschromatographie.



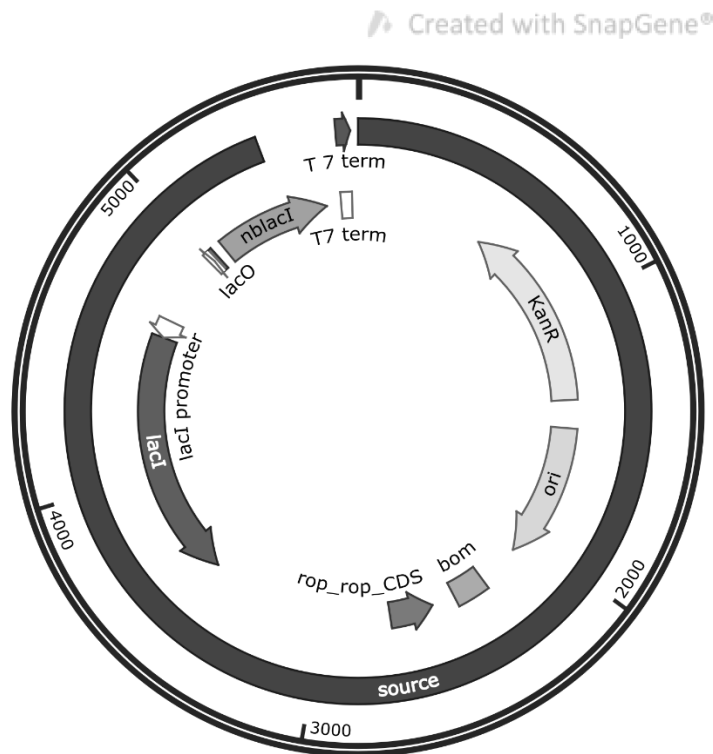
### >pet28EYFPAL\_opt\_expression\_his (7081 bp)

```
TGGCGAATGGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCCTACACTTG
CCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTTCGCTTTCTTCCCTTCTTCTCGCCACGTTTCGCCGGCTTTCCCCGTC AAGCTCTA
AATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAACTTGATTAGGGTGATGGTTC
ACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGT
TCCAAACTGGAACAACACTCAACCCATCTCGGTCTATTCTTTTGATTTATAAGGGATTTTGCCGATTTTCGGCCTATTGG
TTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTTAACAAAAATTTAACGTTTACAATTTTCAGTGGCACTTT
TCGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAATTAATTTCT
TAGAAAACTCATCGAGCATCAAATGAAACTGCAATTTATTATATCAGGATTATCAATACCATATTTTGGAAAAAGCCG
TTTCTGTAATGAAGGAGAAAACACTCACGAGGCAGTTCATAGGATGGCAAGATCCTGGTATCGGTCTGCGATTCCGACTC
GTCCAACATCAATACAACCTATTAATTTCCCTCGTCAAAAAATAAGGTTATCAAGTGAGAAATCACCATGAGTGACGACT
GAATCCGGTGAGAAATGGCAAAAGTTTATGCATTTCTTTCCAGACTTGTTC AACAGGCCAGCCATTACGCTCGTCACTAAA
ATCACTCGCATCAACCAAACCGTTATTCATTTCGTGATTGCGCCTGAGCGAGACGAAATACGCGATCGCTGTTAAAAGGAC
AATTACAACAGGAATCGAATGCAACCGGCGCAGGAACACTGCCAGCGCATCAACAATATTTTCACCTGAATCAGGATAT
TCTTCTAATACCTGGAATGCTGTTTTCCCGGGGATCGCAGTGGTGAGTAACCATGCATCATCAGGAGTACGGATAAAATG
CTTGATGGTTCGGAAGAGGCATAAATTCGTCAGCCAGTTTAGTCTGACCATCTCATCTGTAACATCATTGGCAACGCTAC
CTTTGGCATGTTTTAGAAAACAACACTTGGCGCATCCGGCTTCCCATAATCGATAGATTGTCGCACCTGATTGCCCGACA
TTATCGCGAGCCCATTTATACCCATATAAATCAGCATCCATGTTGGAATTTAATCGCGCCTAGAGCAAGACGTTTTCCCG
TTGAATATGGCTCATAACACCCCTTGATTA TACTGTTATGTAAGCAGACAGTTTTATTGTTTCATGACCAAAAATCCCTTAA
CGTGAGTTTTCGTTCCTACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTCTGCGCGT
AATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAACACCGCTACCAGCGGTGGTTTTGTTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTTC
CGAAGGTAACCTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAATACTGTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAG
AATCTGTAGCACCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCTGTCTCT
TACCGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGCGCGCAGCGGTTCGGGCTGAACGGGGGTTTCGTGCACACAGCCCA
GCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGA
AAGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCCGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGAAAACGCTGGTA
TCTTTATAGTCTGTGCGGTTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTGCATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGCGGAGCCTAT
GGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCTTGGCCTTTTTGTGGCCTTTTTGCTCACATGTTCTTCTGCGTTA
TCCCTGATTTCTGTGGATAACCGTATTACCGCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGACGCCAACGACCGAGCGCAG
CGAGTCACTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCTGATGCGGATTTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTACACCGCA
TATATGGTGCACCTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGATAGTTAAGCCAGTATACACTCCGCTATCCGCTACGTGACTG
GGTCAATGGCTGCGCCCCGACACCCGCCAACACCCGCTGACGCGCCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCGGCATCCGCTTACA
GACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTGTCAGAGTTTTACCGTCATCACCGAAACGCGGAGGCGAGCTGCGG
```

TAAAGCTCATCAGCGTGGTCTGTAAGCGATTACAGATGTCTGCCTGTTTCATCCGCGTCCAGCTCGTTGAGTTTCTCCAG  
 AAGCGTTAATGTCTGGCTTCTGATAAAGCGGGCCATGTTAAGGGCGGTTTTTCTCTGTTTGGTCACTGATGCCTCCGTGT  
 AAGGGGATTTCTGTTTATGATGGGGTAAATGATACCGATGAAACGAGAGAGGATGCTCACGATACGGGTTACTGATGATGAA  
 CATGCCCGGTTACTTGAACGTTGTGAGGGTAAACAACCTGGCGGTATGGATGCGGCGGGACCAGAGAAAAATCACTCAGG  
 TCAATGCCAGCGCTTCGTTAATACAGATGTAGGTGTCCACAGGGTAGCCAGCAGCATCCTGCGATGCAGATCCGGAACA  
 TAATGGTGCAGGGCGCTGACTTCCGCGTTTCCAGACTTTACGAAACACGGAAACCGAAGACCATTTCATGTTGTTGCTCAG  
 GTCGACAGCAGTTTTGACGAGCAGTGCCTTACGTTGCTCGCTATCGGTGATTTCATCTGCTAACAGTAAGGCAACC  
 CCGCCAGCCTAGCCGGTCTCAACGACAGGAGCAGCATCATGCGCACCCGTGGGGCCGCCATGCCGGCGATAATGGCCT  
 GCTTCTCGCCGAAACGTTTGGTGGCGGGACCAGTGACGAAGGCTTGAGCGAGGGCGTGCAAGATTCCGAATACCGCAAGC  
 GACAGGCCGATCATCGTCCGCTCCAGCGAAAGCGGTCCTCGCCGAAAATGACCCAGAGCGCTGCCGGCACCTGTCTTAC  
 GAGTTGCATGATAAAGAACAGTCAATAAGTGGCGGACGATAGTTCATGCCCCGCGCCACCAGAAAGGAGCTGACTGGGT  
 TGAAGGCTCTCAAGGGCATCGGTGAGATCCCGGTGCCAATGAGTGAGCTAACTTACATTAATTGCGTTGCGCTCACTG  
 CCCGCTTCCAGTCGGGAAACCTGTGCTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGGGGAGAGGGGTTTGGCTAT  
 TGGGCGCCAGGGTGGTTTTTCTTTTACCAGTGAGACGGGCAACAGCTGATTGCCCTTACCAGCCTGGCCTGAGAGAGT  
 TGCAGCAAGCGGTCCACGCTGGTTTTCCCCAGCAGGCGAAAATCCTGTTTGGATGGTGGTTAACGGCGGGATATAACATGA  
 GCTGCTTCCGTTATCGTGCATCCCACTACCGAGATATCCGCACCAACGCGCAGCCGGACTCGGTAATGGCGCGCATTG  
 CGCCAGCGCCATCTGATCGTTGGCAACCAGCATCGCAGTGGGAACGATGCCCTCATTACGATTTGCATGGTTTTGTGA  
 AAACCGGACATGGCACTCCAGTCCGCTTCCCGTTCCGCTATCGGCTGAATTTGATTGCGAGTGAGATATTTATGCCAGCC  
 AGCCAGACGACGCGCCGAGACAGAACTTAATGGGCCCGCTAACAGCGCGATTTGCTGGTGACCCAAATGCGACCAGAT  
 GCTCCACGCCCAGTCCGCTACCGTCTTCATGGGAGAAAATAATACTGTTGATGGGTGTCTGGTCAGAGACATCAAGAAAT  
 AACGCCGGAACATTAAGTGCAGGCAGCTTCCACAGCAATGGCATCCTGGTCATCCAGCGGATAGTTAATGATCAGCCCACT  
 GACGCGTTGCGCGAGAAGATTGTGCACCGCGCTTTACAGGCTTCGACGCGCGCTTCGTTTACCATCGACACACCACCGC  
 TGGCACCCAGTTGATCGGCGCGAGATTTAATCGCCCGCAACTTTGCGACGGCGCTGCAGGGCCAGACTGGAGGTGGCA  
 ACGCCAATCAGCAACGACTGTTTTGCCCGCCAGTTGTTGTGCCACGCGGTTGGGAATGTAATTCAGCTCCGCCATCGCCGC  
 TTCCACTTTTTCCCGCTTTTTCCGAGAAACGTTGGCTGGCTGGTTACCACGCGGGAAACGGTCTGATAAGAGACACCGG  
 CATACTCTGCGACATCGTATAACGTTACTGGTTTTACATTCACCACCCTGAATTGACTCTCTTCCGGGCGCTATCATGCC  
 ATACCGCGAAAGGTTTTGCGCCATTGATGGTGTCCGGGATCTCGACGCTCTCCCTTATGCGACTCCTGCATTAGGAAGC  
 AGCCAGTAGTAGGTTGAGGCGGTTGAGCACCAGCCGCGCAAGGAATGGTGCATGCAGGAGATGGCGCCCAACAGTCCC  
 CCGGCCACGGGCGCTGACCCATACCCACGCGCAACAAAGCGATCATGAGCCGAAGTGGCGAGCCGATCTTCCCCATC  
 GGTGATGTCCGCGATATAGGCGCCAGCAACCGCACCTGTGGCGCCGTTGATGCGCGCCACGATGCGTCCGCGTAGAGGA  
 TCGCAATCTCGATCCCGGAAATTAATACGACTCACTATAGGGGAATTTGTGAGCGGATAACAATCCCTCTAGAAATAA  
 TTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACCATGgtgagcaagggcgaggagctgttcaccggggtggtgcccacccctggt  
 cgagctggacggcgacgtaaacggccacaagttcagcgtgtccggcgagggcgagggcgatgccacctacggcaagctga  
 ccctgaagttcatctgaccaccggcaagctgcccgtgcccctggccaccctcgtgaccaccttcggctacggcctgcag  
 tgcttcgcccgtaccggaccacatgaagcagcagcacttcttcaagtcggccatgcccgaaggctacgtccaggagcg  
 caccatcttcttcaaggacgacggcaactacaagaccgcccggaggtgaagttcgagggcgacacctggtgaaccgca  
 tccagctgaagggcagctcagcttcaaggaggacggcaacatcctgggcaacagctggagtacaactacaacagccacaac  
 gtctatatcatggccgacaagcagaacggcatcaaggtgaacttcaagatccggccacaacatcgagggcagcgt  
 gcagctcgccgaccactaccagcagaacacccccatcgggcagcggccccgtgctgctgcccgacaaccactacctgagct  
 accagtcggccctgagcaagacccccaacgagaagcgcgcatcacatggtcctgctggagttcgtgaccgcccgggatc  
 actctcgcatggacgagctgtacaagtcggctctgctgctcctgctgagcagggcagcaatagcATGAAAGTTAATCGTCC  
 GGCAGAACGTGCCAGCTTTGGTAGCTTTGTTCTGGATGCAGGTAGCGCACGTTTTGTTGGTAGTGATGAACTGGCACTGG  
 TTCTGGGTTTTGCACGGGTGATGTTGTTCTGACACCGGCAGTTGTTCTGGCACATCTGCATCCTGATGATCGTCTGGAA  
 TGGCAGGCAGGTCTGCAGCGTTGCTGGCAACCGGTCTCCGGTGGTTGTTAATCATCTGCTGCTGACCCGAGAAGCAGA  
 ACCGCGTCCGGCAATGACAACCTGACCGCACTGACCGAACAGGATCGTGTGCGTGCAGTTACCGGTGTTATTACCGATC  
 TGAGCGATCGTGTCTGCTGCAACCGAAGCAGAAATTCGTCAGGCAGTTTCGTCAGCAGCAGCAACCCGTAGCGAAAT  
 GATCAGGCAAAAGGTATTGTTATGGCAGCCTTTGATGTTGATGCAGATCAGGCATTTGCACTGCTGAAATGGCATAGCAG  
 CCAGAGCAATCGTAAACTGCGTGATCTGGCCACCGGTATGATTGAAGGTCTGGCAGCAGCCAATAGCGCACTGCCGCTGC  
 GTCGTCGCTGAGCACCGTTTTTACCAGATATGGGTTGTCCGGCACCGAGCACCAAAGGTTGGACCGTTCCGGTGACCGAT  
 ATTTGGTCTGCCCTCCGACCAGCGGTCTGATTCGACAGCACTGCTGCCCTGGTATTCTGACCCGTGCAGCACATGATGCAAG  
 CGTTGCAATTACCGTTGCAGATGTTACCGCACCGGATCAGCCTCTGGTTTATGCAAACTCTGCATTTGAACGTCTGACCG  
 GTTATGCAGCAGCCGAAGTTCTGGGTCGTAATTGTCGTTTTCTGCAGGCAGAAAGCGGTGATCCGCATGAACGTAGCGCA  
 ATTCGTAGCGCCATTGCAAAATGGTGTGATGCAGTGACCACACTGATTCGTAATTTTCTGTCAGGATGGTCATGCCTTTTGGAA  
 CGAATTTTCATCTGAGTCCGGTTCGTAATGGTGCAGGTCGTGTTACCCATTACATTTGGTTATCAGCTGGATGTGACCGAAC  
 GTGTTGAACGTGATCAGCAGCTGGAACAGCTGGCAAGCctcgagcacCATcactCATcactgaGATCCGGCTGCTAAC  
 AAAGCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCCTGAGCAATAACTAGCATAACCCCTTGGGGCTCTAAACGGGT  
 CTTGAGGGGTTTTTCTGAAAGGAGGAACATATATCCGGAT

## Expressionsplasmid nanobody lacI

Verwendet für die Reinigung der Fusion aus EYFP-nanobody und lacI Helix aus *E.coli* cmpx13 Kulturen. Das Protein unterliegt der Kontrolle eines T7 Promotors und die Expression wird durch IPTG induziert. Die kodierte Kanamycin-Resistenz verhindert einen Verlust des Plasmids bei langer Kultivierungsdauer. Ein C-terminaler Hexahistidin-tag erlaubt die Reinigung des Proteins aus geklärtem Zelllysate durch Nickel-NTA Affinitätschromatographie.



**pet28c-his\_EYFPnanobody\_linker\_lacI**  
5692 bp

### >pet28EYFPnanobody-lacI\_expression\_his (5692 bp)

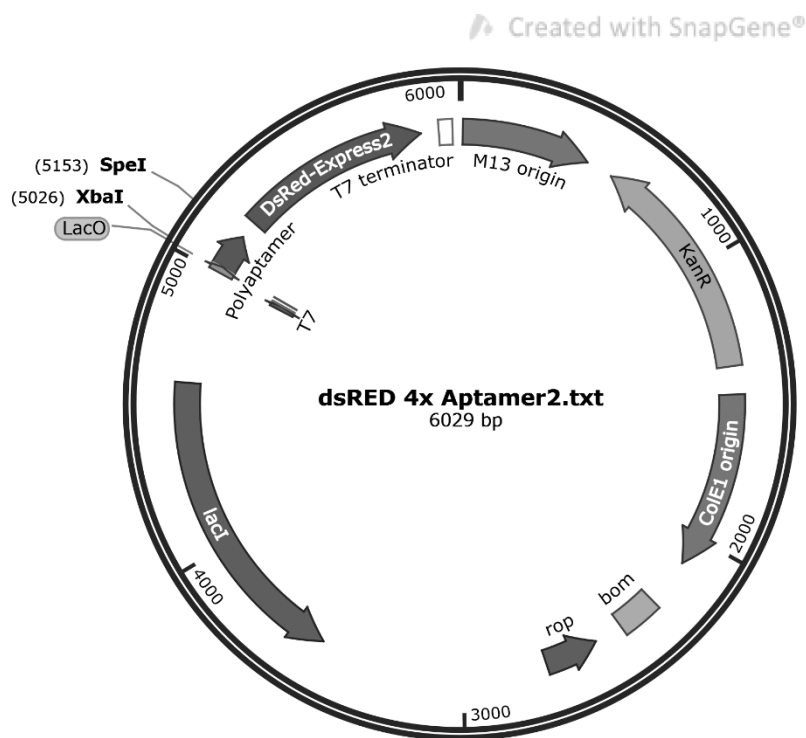
```
tggcgaatgggacgcgcctgtagcggcgattaaagcgcgggggtgtggtggttacgcgcagcgtgaccgctacacttg
ccagcgccttagcgcgcgcctctctctctctctctctctctctctctctctcccgctcccgctcaagctcta
aatcgggggctcccttaggggtccgatttagtgcttaacggcacctcgaccccccaaaattgattagggatgggtc
acgtagtgggccatcgccctgatagacgggtttttcgcccttgacgcttgagggtccacgctctttaaagtgactcctgt
tccaaactggaacaacactcaaccctatctcgggtctattcttttgattataagggattttgccgatttcggcctattgg
ttaaaaaatgagctgatttaacaaaaatttaacgcgaatttaacaaaaatattaacgtttacaatttcagggtggcacttt
tcggggaaatgtgcgcggaacccctatttgtttatcttaataacattcaaatatgtatccgctcatgaaatattct
tagaaaaactcatcgagcatcaaatgaaactgcaatttattcatatcaggattatcaataccatattttgaaaaagcgc
ttctgtaatgaaggagaaaactcaccgaggcagttccataggatggcaagatcctgggtatcggtctgcatccgactc
gtccaacatcaatacaacctatttaatttcccctcgtcaaaaaaagggtatcaagtgaagaaatcacatgagtgacgact
gaatccgggtgagaatggcaaaagtttatgcatcttccagacttggtcaacaggccagccattacgctcgtcatcaaa
atcactcgcacacccaaaccggttatcattcgtgattgcgccctgagcgcagacgaaatcgcgcacgctgtaaaaaggac
aattacaacaggaatcgaatgcaaccggcgaggaacactgccagcgcacacaaatattttcacctgaatcaggatatt
tcttcaataacctggaatgctggtttccgggggatcgagtggtgagtaaacatgcatcatcaggagtagcgataaaatg
cttgatggtcgaagaggcataaaatccgctcagcaggttttagctgaccatctcatctgtaacatcattggcaacgctac
ctttgccatgtttcagaaaactcggcgcatcggctcccataggaatacaaatcgatagattgctgcacacagcaca
ttatcgcgagcccatttatacccatataaatcagcatccatggttggaaatataatcgcgccctagagcaagacggttcccg
ttgaatagggctcataaacacccttgattactggttatgtaagcagacagttttattggtcatgacaaaaatcccttaa
cgtgagttttcgttccactgagcgtcagaccccgtagaaaagatcaaaggatcttcttgagatcctttttctgcgcgt
aatctgctgcttgcaaaaaaaaccaccgctaccagcgggtggtttgtttgcccggatcaagagctaccaactcttttc
cgaaggtaaactggcttcagcagagcgcagataccaataactgtcctctctagtgtagcctgtagttagggccaccactcaag
aactctgtagcaccctacatacctcgtctgctaactctgtttaccagtggtgctgctgcccagtgccgataaagctgtct
taccgggttggaactcaagacgatagttaccggataagggcgcagcggctcgggctgaacggggggttcgtgcacacagccca
gcttgagagcgaacgacctacaccgaactgagatacctacagcgtgagctatgagaaagcgcacgcttcccgaaggggaga
aaggcggacaggtatccggtaagcggcaggggtcggaacaggagagcgcacaggggagcttccagggggaacgcctggtgta
```



tctttatagtcctgtcgggttttcgccacctctgacttgagcgtcgatTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGGGAGCCTAT  
 ggaaaaacgccagcaacgcggcctttttacggttcctggcctttttgtcggcctttttgtcacatgttctttcctgcgta  
 tcccctgattctgtggataaacggtattaccgccttttagtgagctgataccgctcgcgcagccgaacgaccgagcgcag  
 cgagtcagtgagcgcggaagcggagcgcctgagcgggtattttccttacgcatctgtgcggtatttcacaccgca  
 tataatgggtgcactctcagtaacaatctgctctgatgcgcgatagtttaagccagtatacactccgctatcgctacgtgactg  
 ggtcatggctgcgccccgacaccgcgaacacccgctgacgcgcctgacgggcttgtctgctcccggcatccgcttaca  
 gacaagctgtgaccgtctccgggagctgcatgtgtcagaggTTTTACCCTCATCACCGAAACGCGCGAGGCAGCTGCGG  
 taaagctcatcagcgtggctgctgaagcgattcacagatgtctgcctgttcatccgcgtccagctcgttgagtttctccag  
 aagcgttaatgtctggcttctgataaagcgggcatgttaagggcggttttttctgcttgggtcactgatgcctccggtg  
 aaggggatttctgttcatgggggtaatgataccgatgaaacgagagaggatgctcacgatacgggttactgatgatgaa  
 catgcccggttactggaacgttgtgagggtaaacaactggcggtatggatgcccgggaccagagaaaaatcactcagg  
 tcaatgccagcgtctcgtaatacagatgtagggtgtccacagggtagccagcagcatcctgcgatgcagatccggaaca  
 taatgggtgcagggcgctgacttccgcgtttccagactttacgaaacacggaaaccgaagaccattcatgttgggtgctcag  
 gtcgcagacgTTTTGCAGCAGCAGTCGCTTCCAGTTCGCTCGCGTATCGGTGATTCATCTGCTAACCGTAAGGCAACC  
 CGCCAGCCTAGCCGGTCTCAACGACAGGAGCAGTATCGCGCACCCGTGGGGCCCGCATGCCGGGATAATGGCT  
 gcttctcgcgaaacgTTTTGGTGGCGGGACCAGTGACGAAGGCTTGAGCGAGGGCGTGAAGATTCCGAATAACCGAAGC  
 GACAGGCCGATCATCGTCGCTCCAGCGAAAGCGTCTCGCGAAAATGACCCAGAGCGCTGCCGGCACCTGTCTCTAC  
 GAGTTGCATGATAAAGAAGACAGTCATAAGTGCGGCGACGATAGTCATGCCCGCGCCACCAGGAGGCTGACTGGGT  
 TGAAGGCTCTCAAGGGCATCGGTGAGATCCCGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTTACATTAATTGCGTTGCGCTCACTG  
 CCCGCTTCCAGTCGGGAAACCTGTCTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGCGGTTTTGCGTAT  
 TGGGCGCCAGGGTGGTTTTCTTTTACCAGTGAGACGGGCAACAGCTGATTGCCCTTACCGCCTGGCCTGAGAGAGT  
 TGCAGCAAGCGGTCCACGCTGGTTTTCCCCAGCAGGCGAAAATCCTGTTGATGGTGGTTAACGGCGGGATAATAATGA  
 GCTGTCTTCGGTATCGTCGTATCCCACTACCAGATATCCGCACCAACGCGCAGCCCGACTCGGTAATGGCGCGCATTG  
 CGCCAGCGCCATCTGATCGTTGGCAACCAGCATCGCAGTGGGAACGATGCCCTCATCAGCATTGCGTGGTTTTGTTGA  
 AAACCGGACATGGCACTCCAGTCGCCTTCCGTTCCGCTATCGGCTGAATTTGATTGCGAGTGAGATATTTATGCCAGCC  
 AGCCAGACGCAGACGCGCGGAGACAGAACTTAATGGGCCGCTAACAGCGGATTTGCTGGTGACCAATGCGACCAGAT  
 GCTCCACGCCAGTCGCTACCCTCTCATGGGAGAAAATAATACTGTTGATGGGTGCTGGTCCAGAGACATCAAGAAAT  
 AACGCCGGAACATTAGTGCAGGCAGCTCCACAGCAATGGCATCCTGGTCATCCAGCGGATAGTTAATGATCAGCCCACT  
 GACCGGTTGCGCGAGAAGATTGTGCACCGCGCTTTACAGGCTTCGACGCGCTTCTGTTCTACCATCGACACCACCAGC  
 TGGACCCAGTTGATCGGCGCGAGATTTAATCGCCCGACAATTTGCGACGGCGCGTGCAAGGGCCAGACTGGAGGTGGCA  
 ACGCCAATCAGCAACGACTGTTTCCCGCCAGTTGTTGTGCCACGCGGTTGGGAATGTAATCAGCTCCGCCATCGCGC  
 TTCCACTTTTTCCCGCTTTTCCGAGAAAACGTTGGCTGGCTGGTTTACCACGCGGGAAACGGTCTGATAAGAGACCCGG  
 CATACTCTGCGACATCGTATAACGTTACTGGTTTTACATTCACCACCCTGAATTGACTCTCTTCCGGGCGCTATCATGCC  
 ATACCCGAAAAGTTTTGCGCCATTCGATGGTGTCCGGGATCTCGACGCTCTCCCTTATGCGACTCCTGCATTAGGAAGC  
 AGCCAGTAGTAGGTTGAGGCGGTTGAGCACCGCGCGCAAGGAATGGTGCATGCAAGGAGATGGCGCCCAACAGTCCC  
 CGGGCAACGGGGCTGCCACCATACCCACGCCGAAACAAGCGTCTATGAGCCCGAAGTGGCGAGCCCGATCTTCCCATC  
 GGTGATGTCGGGATATAGGCGCCAGCAACCAGCCTGTGGCGCGGTGATGCCGGCCAGATGCGTCCGGCGTAGAGGA  
 TCGAGATCTCGATCCCGGAAATTAACGACTCACTATAGGGGAATTTGTGAGCGGATAACAATCCCTCTAGAAATAA  
 TTTGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACCATGGGCGAGCCATCATCATCATCACCCAGGTGCAGCTGCAGGAATC  
 GGGTGGTGCCTGGTTCAGCCGGGTGGTAGCCTGCGTCTGTGCTGCTGCGTCCGGTTTTCCGGTTAACCGTTATAGCA  
 TCGTGGTACCCTCAGGCACCGGTTAAGAACGTGAATGGGTGCGGGCATGAGCTCTGCCGGTATCGTAGTTCCTAT  
 GAAGACTCAGTGAAAGGTCGTTTTACATTTCCGCTGATGACGCACGCAACACGGTGTACCTGCAATGAATAGTCTGAA  
 ACCGGAAGATACCGCTGTTTATTACTGTAATGTTAATGTGGCTTTGAATACTGGGGTCAAGGCACGAGGTACCCTCT  
 CCTCACATCGATGCGTACCCGGGATGCTCGAGTCCGGTCTGCTCTCGTGCTCTGGCAGATTCTTGATGCAGCTG  
 GCACGCCAGGTGCTCGTCTGGAATCTGGCCAGTgagatccggctgctaacaaagcccgaaggaagctgagttggctgc  
 TGCCACCCTGAGCAATAACTAGCATAACCCCTTGGGGCTCTAACGGGCTTGGAGGGTTTTTTGCTGAAAGGAGGAA  
 CTATATCCGGAT

## Expressionsplasmid 4x-Polyaptamer

Verwendet für die Extraktion der Polyaptamer DNA aus *E.coli* Dh10B Kulturen. Die kodierte Kanamycin-Resistenz verhindert einen Verlust des Plasmids bei langer Kultivierungsdauer. Die DsRed kodierende Sequenz war für die Verwendung in der Arbeit nicht relevant, durch das Einbringen der Polyaptamersequenzen ist von einer Störung der Interaktion mit den Ribosomen auszugehen.



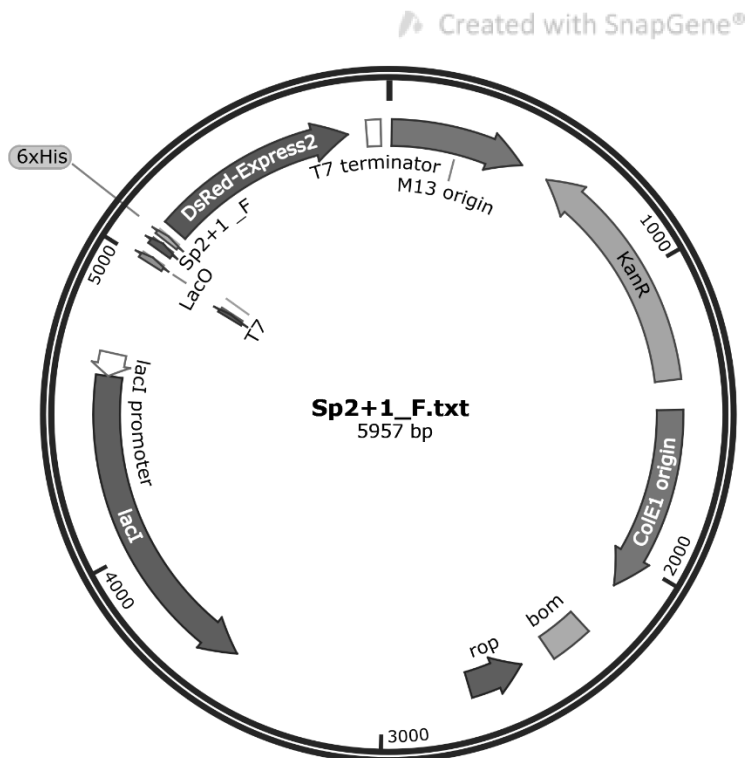
### >pet28dsRED4xAptamer\_expression\_his (6029 bp)

```
TGGCGAATGGGACGCGCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTG
CCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTTCGCTTTCTTCCCTTCTTTCTCGCCACGTTTCGCGGCTTTCCCGTCAAGCTCTA
AATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAACTTGATTAGGGTGATGGTTC
ACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGT
TCCAAACTGGAACAACACTCAACCCATCTCGGTCATTCTTTTGATTATAAGGGATTTGCCGATTTCCGGCCTATTGG
TTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTTAACAAAAATTTAACGTTTACAATTTACAGTGGCCTTT
TCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAATTAATCT
TAGAAAACTCATCGAGCATCAAATGAACTGCAATTTATTCATATCAGGATTATCAATACCATATTTTGAAAAAGCCG
TTTCTGTAATGAAGGAGAAAATCACCAGGCGAGTTCCATAGGATGGCAAGATCCTGGTATCGGTCTCGGATTCGACT
GTCCAACATCAATAACAACCTATTAATTTCCCTCGTCAAAAAAAGGTTATCAAGTGAAGAAATCACCATGAGTGACGACT
GAATCCGGTGAGAAATGGCAAAAGTTTATGCATTTCTTCCAGACTTGTCAACAGGCCAGCCATTACGCTCGTCATCAA
ATCACTCGCATCAACCAACCGTTTATTCATTCGTGATTGCGCCTGAGCGAGACGAAATACGCGATCGCTGTTAAAAGGAC
AATTACAAAACAGGAATCGAATGCAACCGGCGCAGGAACACTGCCAGCGCATCAACAATATTTTACCTGAATCAGGATAT
TCTTCTAATACCTGGAATGCTGTTTTCCCGGGGATCGCAGTGGTGAGTAACCATGCATCATCAGGAGTACGGATAAAATG
CTTGATGGTTCGGAAGGCGATAAATCCGTCAGCCAGTTTAGTCTGACCATCTCATCTGTAACATCATTGGCAACGCTAC
CTTTGCCATGTTTCAGAAAACACTCTGGCGCATCGGGCTTCCCATACAATCGATAGATTGTGCGACCTGATTGCCCGACA
TTATCGCGAGCCCATTTATACCCATATAAATCAGCATCCATGTTGGAATTTAATCGCGCCTAGAGCAAGAGCTTTCCCG
TTGAATATGGCTCATAACACCCCTTGTATTACTGTTTATGTAAGCAGACAGTTTTATTGTTTCATGACCAAAAATCCCTTAA
CGTGAGTTTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGT
AATCTGCTGCTTGCAAAACAAAAAACACCGCTACCAGCGGTGGTTTTGTTGCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTTC
CGAAGGTAACCTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAACTACTGTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACCTTCAAG
AACTCTGTAGCACCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCT
TACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCCGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCA
GCTTGGAGCGCAACGACCTACACCGAAGTGAATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGA
AAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTA
TCTTTATAGTCTGTGCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTAT
GGAAAAACGCCAGCAACCGGGCCTTTTTACGGTTCTTGGCCTTTTGTGTCGCTTTTGTCTCACATGTTCTTTCTGCGTTA
TCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAAGTATACCGCTCGCCGAGCCGAACGACCGAGCGCAG
CGAGTCAGTGAGCGGAGGAAGCGGAAGAGCGCCTGATGCGGTATTTTTCTCTTACGCATCTGTGCGGTATTTTACACCGCA
TATATGGTGCACCTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGTATACACTCCGCTATCGCTACGTGACTG
```

GGTCATGGCTGCGCCCCGACACCCGCCAACACCCGCTGACGCGCCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCGGCATCCGCTTACA  
GACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTGTCAGAGGTTTTTACCCTGCATCACCAGAAACGCGCGAGGCAGCTGCGG  
TAAAGCTCATCAGCGTGGTCTGTAAGCGATTACAGATGTCTGCCTGTTTATCCCGCTCCAGCTCGTTGAGTTTTCTCCAG  
AAGCGTTAATGTCTGGCTTCTGATAAAGCGGGCCATGTAAAGGGCGGTTTTTTTCTGTTTGGTCACTGATGCCTCCGTT  
AAGGGGATTTCTGTTTATGTTGGGTAATGATACCGATGAAACGAGAGAGGATGCTCACGATACGGGTTACTGATGATGAA  
CATGCCCGGTTACTGGAACGTTGTGAGGGTAAACAACCTGGCGGTATGGATGCGGCGGGACCAGAGAAAAATCACTCAGGG  
TCAATGCCAGCGCTTCTGTTAATACAGATGTAGGTGTCCACAGGGTAGCCAGCAGCATCCTGCGATGCAGATCCGGAACA  
TAATGGTGCAGGGCGCTGACTTCCGCGTTTTCCAGACTTTACGAAACACGAAACCGAAGACCATTTCATGTTGTTGCTCAG  
GTCGACAGCCTTTTGCAGCAGCAGTTCGCTTACGTTTCGCTCGCGTATCGGTGATTCATTCTGCTAACCGTAAGGCAACC  
CCGCCAGCCTAGCCGGTCTCAACGACAGGAGCAGATCATGCGCACCCGTGGGGCCGCCATGCCGGCGATAATGGCCCT  
GCTTCTCGCCGAAACGTTTTGGTGGCGGGACCAGTGACGAAGGCTTGAGCGAGGGCGTGCAAGATTCCGAATACCGCAAGC  
GACAGGCCGATCATCGTTCGCGCTCCAGCGAAAGCGGCTCTCGCCGAAAAATGACCCAGAGCGCTGCCGGCACCTGTCTAC  
GAGTTGCATGATAAAGAAGACAGTCATAAGTGCGGCGACGATAGTTCATGCCCCGCGCCACCGGAAGGAGCTGACTGGGT  
TGAAGCTCTCAAGGGCATCGGTTCGAGATCCCGGTGCTAATGAGTGAGCTAACTTACATTAATTGCGTTGCGCTCACTG  
CCCGCTTTCCAGTCCGGAAACCTGTCTGTCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGCGGTTTTGCGTAT  
TGGGGCCAGGGTGGTTTTTTCTTTTACCAGTGAGACGGGCAACAGCTGATTGCCCTTACCAGCTGGCCCTGAGAGAGT  
TGCAGCAAGCGGTCCACGCTGGTTTTGCCCCAGCAGGCGAAAAATCCTGTTTGTGATGGTGGTTAACGGCGGGATATAACATGA  
GCTGTCTTCGGTATCGTTCGATCCCACTACCGAGATATCCGCACCAACGCGCAGCCCCGACTCGGTAATGGCGCGCATTG  
CGCCAGCGCCATCTGATCGTTGGCAACCAGCATCGCAGTGGGAACGATGCCCTCATTGACATTTGCATGGTTTTGTTGA  
AAACCGGACATGGCACTCCAGTTCGCTTCCCCTTCCGCTATCGGCTGAATTTGATTGCGAGTGAGATATTTATGCCAGCC  
AGCCAGACGCGAGACGCGCCGAGACAGAAGTAAATGGCCCCGCTAACAGCGCGATTTGCTGGTGACCCAAATGCGACCCAGAT  
GCTCCACGCCCAGTTCGCTACCGTCTTCATGGGAGAAAAATAATACTGTTGATGGGTGTCTGGTCCAGAGACATCAAGAAAT  
AACGCCGAACATAGTGCAGGCAGCTTCCACAGCAATGGCATCCTGGTTCATCCAGCGGATAGTTAATGATCAGCCCACT  
GACGCGTTGCGCGAGAAGATTGTGCAACCGCCGCTTTACAGGCTTCGACGCGCTTCGTTCTACCATCGACACCACCACGC  
TGGCACCCAGTTGATCGGCGCGAGATTTAATCGCCGCGACAATTTGCGACGCGCGTGCAGGGCCAGACTGGAGGTGGCA  
ACGCCAATCAGCAACGACTGTTTGGCCGCGAGTTGTTGTGCCACGCGGTTGGGAATGTAATTCAGCTCCGCCATCGCCGC  
TTCCACTTTTTTCCCGGTTTTTTCGAGAAACGTTGGCTGGCCTGGTTTACCACGCGGGAAACGGTCTGATAAGAGACACCGG  
CATACTCTGCGACATCGTATAACGTTACTGGTTTTACATTCACCACCCTGAATTTGACTCTCTTCCGGGCGCTATCATGCC  
ATACCCGAAAGGTTTTGCGCCATTCGATGGTGTCCGGGATCTCGACGCTCTCCCTTATGCGACTCCTGCATTAGGAAGC  
AGCCAGTAGTAGGTTGAGGCCGTTGAGCACCGCCGCGCAAGGAATGGTGCATGCAAGGAGATGGCGCCCAACAGTCCC  
CCGGCCACGGGGCTGCCACCATACCCACGCCGAAACAAGCGCTCATGAGCCGAAGTGCGGAGCCCGATCTTCCCATC  
GGTGTGTCGGCGATATAGGCGCCAGCAACCGCACCTGTGGCGCCGGTATGCCGGCCACGATGCGTCCGGCGTAGAGGA  
TCGAGATCTCGATCCCGGAAATTAATACGACTCACTATAGGGGAATTTGTGAGCGGATAACAATTTCTAGAACTAGACAT  
GCATCAAGCAGAGGTGCCCAACTGAGTCATTGAAGCAGACGATGAATAATCTTGTGACTGAAGCAGACGGTCTTAACTTT  
ACACCTTCAAGCAGAGGAGGAGATATACCATGACTAGTGGCAGCAGCCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCTGGTG  
CCGCGCGCAGCCATATGGATAGCACTGAGAACGTCATCAAGCCCTTTCATGCGCTTCAAGGTGCACATGGAGGGCTCCGT  
GAACGGCCACGAGTTCGAGATCGAGGGCGAGGGCGAGGGCAAGCCCTACGAGGGCACCCAGACCGCCAAAGTGCAGGTGA  
CCAAGGGCGCCCCCTGCCCTTCCGCTGGGACATCCTGTCCCCCAGTTCAGTACGGCTCCAAGGTGTACGTGAAGCAC  
CCCGCCGACATCCCCGACTACAAGAAGCTGTCTTCCCCGAGGGCTTCAAGTGGGAGCGCGTATGAACTTCGAGGACGG  
CGGCGTGGTGACCGTGACCCAGGACTCCTCCCTGCAGGACGGCACCTTCATCTACCAGTGAAGTTTCATCGGCGTGAAC  
TCCCCTCCGACGGCCCCGTAATGCAGAAAGAGACTTGGGCTGGGAGCCCTCCACCGAGCGCCTGTACCCCCGCGACGGC  
GTGCTGAAGGGCGAGATCCACAAGGCGCTGAAGCTGAAGGGCGGGCCACTACCTGGTGGAGTTCAAGTCAATCTACAT  
GGCCAAAGAAGCCGTAAGCTGCCCGGCTACTACTAGTGGACTCCAAGCTGGACATCACCTCCCACAAAGGACTACA  
CCGTGGTGGAGCAGTACGAGCGCGGAGGCCCGCCACCACCTGTTCCAGTAGGATCCGGCTGCTAACAAAGCCCCGAAAG  
GAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAATAACTAGCATAACCCCTTGGGGCTCTAAACGGGCTTGTAGGGGTTT  
TTTGCTGAAAGGAGGAACATATCCGGAT

## Assay 2 P System

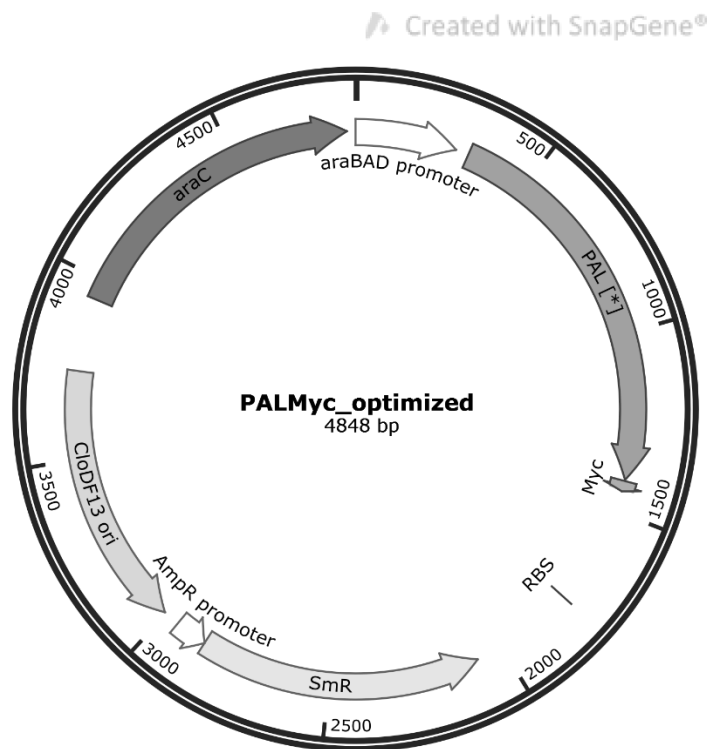
Das 2 Plasmid System besteht aus einem IPTG-induzierbaren, für DsRed kodierendem Plasmid mit Kanamycin Resistenz, und einem Arabinose-induzierbarem, für codonoptimiertes PAL kodierendem Plasmid mit Streptomycin Resistenz. Das für DsRed kodierende Plasmid enthält das durch SELEX identifizierte PAL-Bindemotiv SP2+1F, das PAL kodierende Plasmid einen C-terminal am Protein fusionierten Myc-tag, um den Nachweis der Expression von PAL Varianten zu erlauben.



## &gt;pet28\_Sp2+1F\_DsRed (5957 bp)

```
TGGCGAATGGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAGCGGCGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCCTACACTTG
CCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTTCGCTTCTTCCCTTCTTTCTCGCCACGTTTCGCGCGCTTTCCCGTCAAGCTCTA
AATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAACTTGATTAGGGTGATGGTTC
ACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGT
TCCAAACTGGAACAACACTCAACCCATCTCGGTCTATTCTTTTGATTATAAGGGATTTTGCCGATTCGGCCTATTGG
TTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTTAACAAAAATTAACGTTTACAATTTCAGGTGGCACTTT
TCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTTATTTTCTAAATACATCAAAATATGTATCCGCTCATGAATTAATCT
TAGAAAAACTCATCGACATCAAATGAACTGCAATTTATTCATATCAGGATTATCAATACCATATTTTGAAAAAGCCG
TTTTCTGTAATGAAGGAGAAAACTCACCGAGGCAGTTCCATAGGATGGCAAGATCCTGGTATCGGTCTGCGATTCCGACTC
GTCCAACATCAATACAACCTATTAATTTCCCTCGTCAAAAAATAAGTTATCAAGTGAGAAATCACCATGAGTGACGACT
GAATCCGGTGAGAATGGCAAAAGTTTATGCATTTCTTCCAGACTTGTCAACAGGCCAGCCATTACGCTCGTCATCAAA
ATCACTCGCATCAACCAACCGTTATTCATTCGTGATTGCGCCTGAGCGAGACGAAATACGCGATCGCTGTTAAAAGGAC
AATTACAACAGGAATCGAATGCAACCGGCGCAGGAACACTGCCAGCGCATCAACAATATTTTACCCTGAATCAGGATAT
TCTTCTAATACCCTGGAATGCTGTTTTCCCGGGGATCGCAGTGGTGAATACCATGCATCATCAGGAGTACGGATAAAAATG
CTTGATGGTCGGAAGAGGCATAAATCCGTCAGCCAGTTTAGTCTGACCATCTCATCTGTAACATCATTTGGCAACGCTAC
CTTTGCCATGTTTTAGAAAACAACCTGCGCATCGGGCTTCCCATACAATCGATAGATTGTCGCACCTGATTGCCCGACA
TTATCGGAGCCCATTTATACCCATATAAATCAGCATCCATGTTGGAATTTAATCGCGCCTAGAGCAAGACGTTTCCCG
TTGAATATGGCTCATAACACCCCTTGTATTACTGTTATGTAAGCAGACAGTTTTATGTTTCATGACCAAAATCCCTTAA
CGTGAGTTTTTCCCTGAGCGTTCAGACCCCGTAGAAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGT
AATCTGCTGCTTGCAAAAACCAACCCGCTACCAGCGGTGGTTTTGTTGCGCGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTTC
CGAAGGTAACCTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAATACTGTCTTCTAGTGTAGCGGTAGTTAGGCCACCACTTCAAG
AACTCTGTAGCACCGCTACATACCTCGCTCTGCTAATCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCT
TACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTGGGCTGAACGGGGGGTTTCGTGCACACAGCCCA
GCTTGAGGCGAAGCAGCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGA
AAGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTCCAGGGGGAACCGCTGGTA
TCTTTATAGTCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGGCGGAGCCTAT
GGAAAAACGCCAGCAACCGCGCCTTTTTACGGTTCTTGGCCTTTTGTGCGCCTTTTGTCTCACATGTTCTTCTGCGTTA
TCCCTGATTTCTGTGGATAAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGACGCCAAGCAGCCGAGCGCAG
CGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCTGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTACACCGCA
TATATGGTGCACCTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGTATACACTCCGCTATCGCTACGTGACTG
```

GGTCATGGCTGCGCCCCGACACCCGCCAACACCCGCTGACGCGCCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCGGCATCCGCTTACA  
GACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTGAGAGGTTTTACCCGTCATCACCGAAACGCGCGAGGCAGCTGCGG  
TAAAGCTCATCAGCGTGGTCTGTAAGCGATTACAGATGTCTGCCTGTTTATCCGCGTCCAGCTCGTTGAGTTTTCTCCAG  
AAGCGTTAATGTCTGGCTTCTGATAAAGCGGGCCATGTTAAGGGCGGTTTTTTTCCGTGTTGGTCACTGATGCCTCCGTGT  
AAGGGGGATTTCTGTTTATGAGGGTAAATGATAACCGATGAAACGAGAGAGGATGCTCACGATACGGGTTACTGATGATGAA  
CATGCCCGGTTACTGGAACGTTGTGAGGGTAAACAACCTGGCGGTATGGATGCGGCGGGACCAGAGAAAAATCACTCAGGG  
TCAATGCCAGCGCTTCGTTAATACAGATGTAGGTGTCCACAGGGTAGCCAGCAGCATCCTGCGATGCAGATCCGGAACA  
TAATGGTGCAGGGCGCTGACTTCCGCGTTTTCCAGACTTTACGAAACACGGAAACCGAAGACCATTTCATGTTGTTGCTCAG  
GTCGACAGCTTTTTGACAGCAGCAGTCGCTTCACGTTTCGCTCGCGTATCGGTGATTTCATTCTGCTAACCGTAAGGCAACC  
CCGCCAGCCTAGCCGGTCTCAACGACAGGAGCAGATCATGCGCACCCGTGGGGCCGCCATGCCGGCGATAATGGCCCT  
GCTTCTCGCCGAAACGTTTTGGTGGCGGGACCAGTGACGAAGGCTTGAGCGAGGGCGTCAAGATTCCGAATACCGCAAGC  
GACAGGCCGATCATCGTCGCGCTCCAGCGAAAGCGGCTCCTCGCCGAAAATGACCCAGAGCGCTGCCGGCACCTGTCTTAC  
GAGTTGCATGATAAAGAAGACAGTCATAAGTGCGGCGACGATAGTTCATGCCCCGCGCCACCGGAAGGAGCTGACTGGGT  
TGAAGCTCTCAAGGGCATCGGTGAGATCCCGGTGCTAATGAGTGAGCTAACTTACATTAATTGCGTTGCGCTCACTG  
CCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTGCTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGCGGTTTTGCGTAT  
TGGGGCCAGGGTGGTTTTTTCTTTTACCAGTGAGACGGGCAACAGCTGATTGCCCTTACCAGCTGGCCCTGAGAGAGT  
TGCAGCAAGCGGTCCACGCTGGTTTTGCCCGAGCAGGCGAAAATCCTGTTTGTGATGGTGGTTAACGGCGGGATATAACATGA  
GCTGTCTTCGGTATCGTCGATCCCACTACCGAGATATCCGCACCAACGCGCAGCCCCGGACTCGGTAATGGCGCGCATTG  
CGCCAGCGCCATCTGATCGTTGGCAACCAGCATCGCAGTGGGAACGATGCCCTCATTACGATTTGTCATGGTTTTGTTGA  
AAACCGGACATGGCACTCCAGTCGCTTCCCCTTCCGCTATCGGCTGAATTTGATTGCGAGTGAGATATTTATGCCAGCC  
AGCCAGACGCGAGACGCGCCGAGACAGAAGTAAATGGCCCCGCTAACAGCGCGATTTGCTGGTGACCCAAATGCGACCCAGAT  
GCTCCACGCCCAGTCGCGTACCGTCTTCATGGGAGAAAATAATACTGTTGATGGGTGTCTGGTCAGAGACATCAAGAAAT  
AACGCCGAACATAGTGCAGGCGAGCTTCCACAGCAATGGCATCCTGGTTCATCCAGCGGATAGTTAATGATCAGCCCAC  
GACGCGTTGCGCGAGAAGATTGTGCACCGCCGCTTTACAGGCTTCGACGCGCTTCGTTCTACCATCGACACCACCACGC  
TGGCACCCAGTTGATCGGCGCGAGATTTAATCGCCGCGACAATTTGCGACGCGCGTGCAGGGCCAGACTGGAGGTGGCA  
ACGCCAATCAGCAACGACTGTTTGGCCGCGAGTTGTTGTGCCACGCGGTTGGGAATGTAATTCAGCTCCGCCATCGCCGC  
TTCCACTTTTTTCCCGGTTTTTCCGAGAAACGTGGCTGGCTGGTTTACCACGCGGGAAACGGTCTGATAAGAGACACCGG  
CATACTCTGCGACATCGTATAACGTTACTGGTTTTACATTCACCACCCTGAATTGACTCTCTTCCGGGGCGCTATCATGCC  
ATACCGCGAAAGGTTTTGCGCCATTCGATGGTGTCCGGGATCTCGACGCTCTCCCTTATGCGACTCCTGCATTAGGAAGC  
AGCCAGTAGTAGGTTGAGGCCGTTGAGCACCAGCCGCGCAAGGAATGGTGCATGCAAGGAGATGGCGCCCAACAGTCCC  
CCGGCCACGGGGCCTGCCACCATACCCACGCCGAAACAAGCGCTCATGAGCCCGAAGTGGCGAGCCCGATCTTCCCATC  
GGTGTGTCGGCGATATAGGCGCCAGCAACCGCACCTGTGGCGCCGGTATGCCGGCCACGATGCGTCCGGCGTAGAGGA  
TCGAGATCTCGATCCCGCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGGAATTTGTGAGCGGATAACAATCCCCTCTAGAAATAA  
TTTTGTTAACTTTAAACCTTCAAGCAGAGGAGGAGATATACCATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCACAGCAGCG  
GCCTGGTGGCGCGCGCAGCCATATGGATAGCACTGAGAACGTCATCAAGCCCTTCATGCGCTTCAAGGTGCACATGGAG  
GGCTCCGTGAACGGCCACGAGTTCGAGATCGAGGGCGAGGGCGAGGGCAAGCCCTACGAGGGCACCCAGACCGCCAAGCT  
GCAGGTGACCAAGGGCGGCCCTTGCCTTCGCTTGGGACATCCTGTCCCCCAGTTCCAGTACGGCTCCAAGGTGTACG  
TGAAGCACCCCGCCGACATCCCCGACTACAAGAAGCTGTCTTCCCCGAGGGCTTCAAGTGGGAGCGCGTATGAACTTC  
GAGGACGGCGGCGTGGTGACCGTGACCCAGGACTCCTCCCTGCAGGACGGCACCTTCATCTACCACGTGAAGTTTCATCGG  
CGTGAACCTTCCCCTCCGACGGCCCCGTAATGCAGAAAGACTCTGGGCTGGGAGCCCTCCACCGAGCGCTGTACCCCC  
CGCAGCGCGTGTGAAGGGCGAGATCCACAAGGCGCTGAAGCTGAAGGGCGCGGCCACTACCTGGTGGAGTTCAAGTCA  
ATCTACATGGCCAAGAAGCCCGTGAAGCTGCCCGGCTACTACTACGTGGACTCCAAGCTGGACATCACCTCCCACAACGA  
GGACTACACCGTGGTGGAGCAGTACGAGCGCGCCGAGCCCGCCACCACCTGTTCCAGTAGGATCCGGCTGCTAACAAAG  
CCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAATAACTAGCATAAACCCTTGGGGCCTCTAACCGGGTCTTG  
AGGGGTTTTTGTGAAAGGAGGAACATATCCGGAT



### >pCDFDuett\_PALMycoptimized (4848 bp)

```

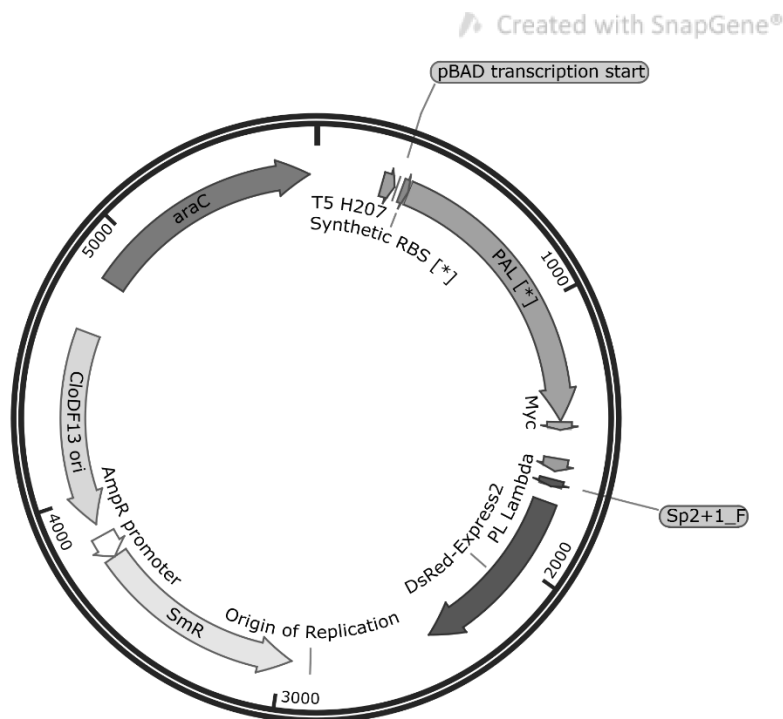
AAGAAACCAATTGTCCATATTGCATCAGACATTGCCGTCCTACTGCGTCTTTTACTGGCTCTTCTCGCTAACCAAACCGGTA
ACCCCGCTTATTAAGCATTCTGTAAACAAAGCGGGACCAAAGCCATGACAAAAACCGGTAACAAAAGTGTCTATAATCA
CGGCAGAAAAGTCCACATTGATTATTTGCACGGCGTCACACTTTGCTATGCCATAGCATTTTTATCCATAAGATTAGCGG
ATCCTACCTGACGCTTTTTATCGCAACTCTTACTGTTTCTCCATACCCGTTTTTTGGGCTAACAGGAGGAATTAACCAT
GAAAGTTAATCGTCCGGCAGAACGTGCCAGCTTTGGTAGCTTTGTTCTGGATGCAGGTAGCGCACGTTTTGTTGGTAGTG
ATGAACTGGCAGCTGTTCTGGGTTTTGCACCGGGTATGTTGTTCTGACACCGGCAGTTGTTCTGGCACATCTGCATCCT
GATGATCGTCTGGAATGGCAGGCAGGTCTGCAGCGTGTCTGGCAACCGGTCGTCGGTGGTTGTTAATCATCTGCTGCT
GACCCGAGAAGCAGAACCGGTCGGCAATGACAACCTGACCGCACTGACCGAACAGGATCGTGTGCGTGCAGTTACCG
GTGTTATTACCGATCTGAGCGATCGTGTTCGTCGTGCAACCGAAGCAGAAATTCGTCAGGCAGTTTCGTGCAGCAGCAGCA
ACCGTAGCGAAATGATCAGGCAAAGGTATTGTTATGGCAGCCTTTGATGTTGATGCAGATCAGGCATTTGCACTGCT
GAAATGGCATAGCAGCCAGAGCAATCGTAAACTGCGTGATCTGGCCACCGGATGATTGAAGGTCTGGCAGCAGCCAATA
GCGCACTGCCGCTGCGTCTGCTGTCGTCGACACCGTTTTTACCAGATGGGTTGTCCGGCACCGAGCACCAAAGGTTGGACC
GTTCCGGTGACCGATATTGGTCTGCCGCCACCGAGCGGTCTGATTCGACAGCACTGCTGCGTGGTATTCTGACCCGTGC
AGCACATGATGCAAGCGTTGCAATTACCGTTGCAGATGTTACCGCACCGGATCAGCCTCTGGTTTTATGCAAATCCTGCAT
TTGAACGCTGACCGGTTATGCAGCAGCCGAAGTTCTGGGTCGTAATTTGTCGTTTTCTGCAGGCAGAAACCGGTGATCCG
CATGAACGTAGCGCAATTCGTAGCGCCATTGCAAATGGTGATGCAGTGACCACACTGATTCGTAATTTTCGTCAGGATGG
TCATGCCCTTTTGGAAACGAATTTTCATCTGAGTCCGGTTCGTAATGGTGCAAGGTGCTGTTACCCATTACATTTGGTTATCAGC
TGGATGTGACCGAACGTTGTAACGTGATCAGCAGCTGGAACAGCTGGCAAGCGAACGAAACTGATTTCTGAAGAAGAT
CTGtaacggccGCATCGAGAGCTTGGCTGTTTTGGCGGATGAGAGAAGATTTTTAGCCTGATACAGATTAATCAGAAC
GCAGAAGCGGTCTGATAAAAACAGAAATTTGCCTGGCGGCAGTAGCGCGTGGTCCCACCTGACCCCATGCCAACTCAGAA
GTGAAAACCGCGTAGCGCCGATGGTAGTGTGGGGTCTCCCCATGCGAGAGTAGGGAACCTGCCAGGCATCAAATAAACGAA
AGGCTCAGTCGAAAGACTGGGCCTTTTCGTTTTATCTGTTGTTGTCGGTGAACGCTCTCTGAGTAGGACAAATCCGCCG
GGAGCGGATTTGAACGTTGCGAAGCAACGGCCCCGAGGGTGGCGGGCAGGACGCCCGCCATAAACTGCCAGGCATCAAAT
TAAGCAGAAGGCCATCCTGACGGATGGCCTTTTTGCGTTTTCTACAAACTCTTTTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAA
TATGTATCCGCTCATGGaactgcttccggtagtcaataaaccggtaaaccagcaatagacataagcggctatthaacga
ccctgccctgaaccgacgaccgggtcatcgtggccggatcttgccggccctcggccttgaacgaattgtagacattatth
gccgactaccttggtgatctcgcctttcacgtagtggacaaattctccaactgatctgcgcgcgaggccaagcgatctt
cttctgtccaagataagcctgtctagcttcaagatgacgggctgatactgggcccggcaggcgcctccattgcccagtcg
gcagcgacatccttcggcgcgattttgcccgttactgcccgtgacccaatgcccggacaaacgtaagcactacatttcgctc
atcgcagcccagtcgggcccggagttccatagcgttaaggtttcatttagcgcctcaaatagatcctgttcaggaaccg
gatcaaagagttctccgcccgtggacctaccaaggcaacgctatgttctcttgcctttgtcagcaagatagccagatca
atgctgatcgtggctggctgcaagatacctgcaagaatgctattgctgctgccattctccaaattgcaagttcggccttagc
tggataacgcccaggaatgatgctcgtgcacaacaatggtgactctacagcgcggagaatctcgtctctctccagggg
aagccgaagtttccaaaggctcgttgatcaaagctcgcgcggttggtttcatcaagccttacgggtcaccgtaaccagcaaa
tcaatatactgtgtggttccaggccgccatccactgcccggagccgtacaaatgtacggccagcaacgctcggttcgagatg
gcgctcgatgacgccaactacctctgatagttgagtcgatacttcggcgatcaccgctccctcatactcttctcttttc
aatattattgaagcatttatcagggttattgtctcatgagcggatacatatttgatgtatttagaaaaataaacaata
gctagctcactcggctcgtacgctccgggctgagactgcccgggcccgtgcccggacacatacaaagttaccacagattc
cgtggataagcaggggactaacatgtgaggcaaaacagcagggcccgcgcccgggtggcgtttttccataggctccgcccctc

```

tgccagagttcacataaacagacgcttttccggtgcatctgtgggagccgtgaggctcaacatgaatctgacagtacgg  
gcgaaacccgacaggacttaaagatccccaccgtttccggcggtcgctccctcttgctctcctgttccgaccctgcc  
gtttacccgataacctgttccgcctttctcccttacgggaagtgtggcgctttctcatagctcacacactggatctcggc  
tcggtgtaggtcgttcgcctccaagctgggtgtaagcaagaactccccgttcagcccactgctgccttatccggtaact  
gttcaacttgagtccaacccggaaaagcacggtaaaaacgccactggcagcagccattggttaactgggagtctgcagaggat  
ttgtttagctaaacacgcggttgccttgaagtgtgcgcaaaagtccggctacactggaaggacagatttggttgctgtg  
ctctgcgaaagccagtaccacggttaagcagttccccactgacttaaccttcgatcaaaccacctcccagggtggtt  
tttcgtttacaggcaaaagattacgcgcagaaaaaaggatctcaagaagatcctttgatcttttctactgaaccgctc  
tagatttcagtgcaatttatctcttcaaagttagcacctgaagtcagccccatacgatataagttgtaattctcatgtta  
gtcatgccccGCATGCATAATGTGCCTGTCAAATGGACGAAGCAGGGATTCTGCAAACCTATGCTACTCCGTCAAGCCG  
TCAATTGTCTGATTCTGTTACCAATTATGACAACCTTGACGGCTACATCATTCACTTTTCTTCAACCCGGCACGGAAC  
GCTCGGGCTGGCCCCGGTGCATTTTTTAAATACCCGCGAGAAATAGAGTTGATCGTCAAAAACCAACATTGCGACCGACGG  
TGCGGATAGGCATCCGGGTGGTGTCAAAAAGCAGCTTCGCCTGGCTGATACGTTGGTCTCGCGCCAGCTTAAGACGCTA  
ATCCCTAACTGCTGGCGGAAAAGATGTGACAGACGCGACGGCGACAAGCAAACATGCTGTGCGACGCTGGCGATATCAAA  
ATTGCTGTCTGCCAGGTGATCGCTGATGTACTGACAAGCCTCGCGTACCCGATTATCCATCGGTGGATGGAGCGACTCGT  
TAATCGCTTCCATGCGCCGAGTAACAATTGCTCAAGCAGATTTATCGCCAGCAGCTCCGAATAGCGCCCTTCCCCTTGC  
CCGGCTTAATGATTTGCCCAAACAGGTGCTGAAATGCGGCTGGTGCCTTCATCCGGGCGAAAGAACCCCGTATTGGC  
AAATATTGACGGCCAGTTAAGCCATTCATGCCAGTAGGCGCGGACGAAAAGTAAACCCACTGGTGATACCATTGCGGAG  
CCTCCGATGACGACCGTAGTGATGAATCTCTCCTGGCGGGAACAGCAAAATATCACCCGGTCCGCAAAACAAATTTCTCGT  
CCCTGATTTTTTACCACCCCCTGACCGGAATGGTGAATGAGAATATAACCTTTTATCCAGCGGTGGTTCGATAAA  
AAAATCGAGATAACCGTTGGCCTCAATCGGCGTTAAACCCGCCACCAGATGGGCATTAACGAGTATCCCGGCAGCAGGG  
GATCATTTTTGCGCTTCAGCCATACTTTTCATACTCCCGCCATTAGAG

### Assay 1 P System

Das 1 Plasmid System besteht aus einem einzigen, für codonoptimiertes PAL-Myc und Aptamer-DsRed kodierendem und konstitutiv exprimierendem Plasmid mit Streptomycin Resistenz. Im Rahmen der Assayoptimierung wurde für PAL ein T5 H207-Promotor und für DsRed ein PL-Lambda Promotor in des System eingebracht, zudem wurde die Sequenz zwischen Promotorregion und Ribosomenbindestelle zugunsten einer stärkeren Expression angepasst. Für diese Optimierung wurde die *RBS Calculator* Software verwendet. Die für DsRed kodierende Sequenz enthält das durch SELEX identifizierte PAL-Bindemotiv SP2+1F, die PAL kodierende Sequenz einen C-terminal am Protein fusionierten Myc-tag, um den Nachweis der Expression von PAL Varianten zu erlauben



**PALMycOpt\_synthRBS20\_H207\_dsRED\_PL\_Lambda**  
5732 bp

#### >pCDFDuett\_sRBS20\_H207\_PALMycOpt\_PLambda\_DsRed (5732 bp)

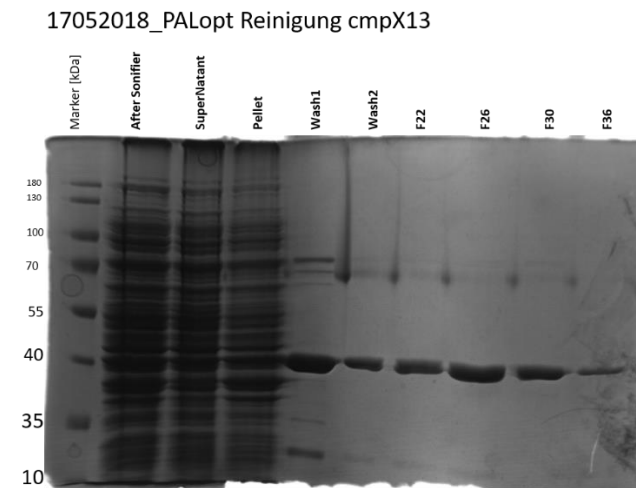
```
AAGAAACCAATTGTCCATATTGCATCAGACATTGCCGTCAGTGCCTCTTTACTGGCTCTTCTCGCTAACCAAACCGGTA
ACCCCGCTTATTAAGCATTCTGTAAACAAAGCGGGACAAAGCCATGACAAAAACCGGTAACAAAAGTGTCTATAATCA
CGGCAGAAAAGTCCACATTGATTATTTGCACGGCGTCACACTTTGCTATGCCATAGCATTTTTATCCATAAGATTAGCGG
ATCCTACCTTTTTTAAAAAATTCATTTGCTAAACGCTTCAAATTTCTCGTATAAATTACTTTTCTCCATACCCGTTTTTTGGG
CTAACCCGCCGAAACCTAAGGAAATACATAGTATGAAAGTTAATCGTCCGGCAGAACGTGCCAGCTTTGGTAGCTTTGTT
CTGGATGCAGGTAGCGCACGTTTTGTTGGTAGTGATGAAGTGGCACTGGTCTGGGTTTTGCACCGGGTGATGTTGTTCT
GACACCGGCAGTTGTCTGGCACATCTGCATCCTGATGATCGTCTGGAATGGCAGGCAGGTCTGCAGCGTTGTCTGGCAA
CCGGTTCGTCGGGTGGTTGTTAATCATCTGCTGCTGACCGCAGAAGCAGAACCGGTCGGCAATGACAACCTGACCGCA
CTGACCGAACAGGATCGTGTGCGTGCAGTTACCGGTGTTATTACCGATCTGAGCGATCGTGTTCGTCGTGCAACCGAAGC
AGAAATTCGTCAGGCAGTTCGTGCAGCAGCAGCAACCCGTAGCGAAAATTGATCAGGCAAAAGGTATTGTTATGGCAGCCT
TTGATGTTGATGCAGATCAGGCATTTGCACTGCTGAAATGGCATAGCAGCCAGAGCAATCGTAAACTGCGTGATCTGGCC
ACCGGTATGATTGAAGGTCTGGCAGCAGCCAATAGCGCACTGCCGCTGCGTCGTCGTCGAGCACCGTTTTTACCGATAT
GGGTGTCCGGCACCGAGCACCAAAGGTTGGACCGTTCCGGTGACCGATATTGGTCTGCCTCCGACCAGCGGTCTGATTC
CGACAGCACTGCTGCCTGGTATTCTGACCCGTGCAGCACATGATGCAAGCGTTGCAATTACCGTTGCAGATGTTACCGCA
CCGGATCAGCCTCTGGTTTATGCAAATCCTGCATTTGAACGCTGACCGGTTATGCAGCAGCCGAAGTTCTGGGTCTGTA
TTGTCGTTTTCTGCAGGCAGAAAGCGGTGATCCGCATGAACGTAGCGCAATTCGTAGCGCCATTGCAAAATGGTGATGCAG
TGACCACACTGATTTCGTAATTTTCGTCAGGATGGTATGCCTTTTGGAAACGAATTTTCATCTGAGTCCGGTTCGTAATGGT
GCAGGTCTGTTACCCATTACATTTGGTTATCAGCTGGATGTGACCGAACGTGTTGAACGTGATCAGCAGCTGGAACAGCT
GGCAAGCGAACAGAACTGATTTCTGAAGAAGATCTGtaacggccGCACTCGAGAGCTTGCTGTTTTGGCGGATGAGAG
AAGATTTTCAGCCTGATACAGATTAATCAGAACGCAGAAGCGGTCTGATAAAACAGAAATTTGCCGGTGTGACATAAAT
ACCACTGGCGGTGATACTGAGCACATCAGCAGGCCCTCTAGAAATAATTTGTTTAACTTTAAACCTTCAAGCAGAGGA
GGAGATATACCATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCACAGCAGCGGCTGGTGCCGCGCGGCAGCCATATGGATAGC
ACTGAGAACGTCATCAAGCCCTTCATGCGCTTCAAGGTGCACATGGAGGGCTCCGTGAACGGCCACAGGTTCGAGATCGA
GGGCGAGGGCGAGGGCAAGCCCTACGAGGGCACCCAGACCGCAAGCTGCAGGTGACCAAGGGCGGCCCCCTGCCCTTCG
CCTGGGACATCCTGTCCCCCAGTTCAGTACGGCTCCAAGGTGTACGTGAAGCACCCCGCCGACATCCCCGACTACAAG
```



AAGCTGTCTCCCTCCCGAGGGCTTCAAGTGGGAGCGCGTGATGAACTTCGAGGACGGCGCGTGGTGACCGTGACCCAGGA  
 CTCCTCCCTGCAGGACGGCACCTTCATCTACCACGTGAAGTTCATCGGCGTGAACCTCCCTCCGACGGCCCCGTAATGC  
 AGAAGAAGACTCTGGGCTGGGAGCCCTCCACCGAGCGCCTGTACCCCGCGACGGCGTGTGAAGGGCGAGATCCACAAG  
 GCGCTGAAGCTGAAGGGCGGGCCACTACCTGGTGGAGTCAAGTCAATCTACATGGCCAAGAAGCCCGTGAAGCTGCC  
 CGGCTACTACTACGTGGACTCCAAGCTGGACATCACCTCCACAACGAGGACTACACCGTGGTGGAGCAGTACGAGCGCG  
 CCGAGGCCCGCCACCACCTGTTCCAGTAGGATCCCTGGCGGCAGTAGCGGGTGGTCCACCTGACCCCATGCCGAACCTC  
 AGAAGTGAAACGCCGTAGCGCCGATGGTAGTGTGGGTCTCCCATGCGAGAGTAGGGAAGTCCAGGCATCAAATAAAA  
 CGAAAGGCTCAGTCGAAAGACTGGGCTTTTCGTTTTATCTGTTGTTTGTGCGGTGAACGCTCTCCTGAGTAGGACAAATCC  
 GCCGGGAGCGGATTTGAACGTTGCGAAGCAACGGCCCGGAGGGTGGCGGGCAGGACGCCCCGCATAAACTGCCAGGCATC  
 AAATTAAGCAGAAGGCCATCTGACGGATGGCCTTTTTCGCTTCTACAAACTCTTTTGTATTATTTTCTAAATACATT  
 CAAATATGTATCCGTCATGGacactgcttccggtagtcaataaaccggtaaaccagcaatagacataagcggctatтта  
 acgacctgacctgaaccgacgaccgggtcatcgtgcccggatcttgcggcccctcgcttgaacgaattgtagacatt  
 atttgccgactaccttggtgatctcgcctttcacgtagtggacaaattcttccaactgatctgcgcgagggccaagcga  
 tcttcttctgttccaagataagcctgtctagcttcaagatgacgggctgatactggcgcgagggcgtccattgccc  
 gtcgagcgcacatcttccggcgcgattttgcccgttactgcgctgtacaaatgcccggacaacgtaagcactacatttc  
 gctcatcgccagccagtcggggcgagttccatagcgttaaggtttcatttagcgcctcaaatagatcctggttcagga  
 accgatcaaagatctctccgctggacctaccaaggaacgctatggtctctgtctttgtcagcaagatagccag  
 atcaatgtcgatcgtggtgctcgaagatacctgcaagaatgtcattgcgctgccattctccaaattgcagttcgcgct  
 tagctggataacgccacggaatgatgctgctgcaacaatggtgacttctacagcgggagaatctcgctctctcca  
 ggggaagccgaagtttccaaaaggtcgttgatcaaagctcgccgctgttttcatcaagccttacggtaaccgtaaccag  
 caaatcaatatcactgtgtggttccagccgcatccactgcccagccgtacaaatgtacggccagcaacgctcggttcga  
 gatggcgtcgtgacgccaactacctgatagttgagtcgatacttccgggatcaccgcttccctcactcttctcct  
 tttcaatattttgaagcattttatcagggttattgtctcatgagcggatacatatttgaatgtatttagaaaaataaaca  
 aatagctagctcactcggctcgtctacgctccggcgctgagactgcccggcgctgcccggacacatacaaaagttaccacag  
 attccgtggataagcaggggactaacatgtgaggcaaaacagcagggccgcccggctggcgtttttccataggctccgccc  
 ctctgcccagagttcacataaacagacgcttttccggctgcatctgtgggagccgtgaggtcaacctgaatctgacagt  
 accggcgaaaccgacaggaactaaagatcccaccgcttccggcggtcgctccctctgcgctctcctgttccgacc  
 tgcgctttaccggatacctgttccgcttctcccttacgggaagtgtggcgcttctcatagctcacacactggtatct  
 cggctcgggtgtaggtcgttccgctcaagctgggctgtaagcaagaactccccgttcagcccgactgctgccttatccggt  
 aactgttcaactgagtcacaaccggaaaagcagcgttaaacgccactggcagcagccattggttaactgggagttcgcaga  
 ggatttggtttagctaaacacgcggttgcctttgaagtgtgcccgaagtccggctacactggaaggacagatttgggtgc  
 tgtgctctgcaaaagccagttaccacggttaagcagttccccactgacttaaccttcgatcaaacacctcccaggtg  
 gtttttgcgtttacagggcaaaagattacgcgcaaaaaaaggatctcaagaagatcctttgatcttttctactgaacc  
 gctctagatttcagtgcaatttatctcttcaaatgtagcactgaagtcagcccatacagatataagttgtaattctcat  
 gttagtcagccccGCATGCATAATGTGCCTGTCAATGGACGAAGCAGGGATTCTGCAAACCTATGCTACTCCGTCAA  
 GCCGTC AATTGTCTGATTTCGTTACCAATTATGACAACCTTGACGGCTACATCATTCACTTTTCTTACACAACCGGCACGGA  
 ACTCGCTCGGGCTGGCCCCGGTGCATTTTTTAAATACCCCGCAGAAAATAGAGTTGATCGTCAAAAACCAACATTCGCGACCG  
 ACGGTGGCGATAGGCATCCGGGTGGTGCTCAAAAAGCAGCTTCGCCTGGCTGATACGTTGGTCTCGCGCCAGCTTAAGAC  
 GCTAATCCCTAACTGCTGGCGGAAAAGATGTGACAGACGCGACGGCGACAAGCAAACATGCTGTGCGACGCTGGCGATAT  
 CAAAATTGCTGTCTGCCAGGTGATCGCTGATGTACTGACAAGCCTCGCGTACCCGATTATCCATCGGTGGATGGAGCGAC  
 TCGTTAATCGCTTCCATGCGCCGCAAGCAATTCGCAAGCAGATTTATCGCCAGCAGCTCCGAATAGCGCCCTTCCCC  
 TTGCCCGGCGTTAATGATTTGCCCAAACAGGTGCTGAAATGCGGCTGGTGGCTTCAATCCGGGCGAAAAGAACCCCGTAT  
 TGGCAAATATTGACGGCCAGTTAAGCCATTCATGCCAGTAGCGCGCGGACGAAAAGTAAACCCACTGGTGATACCATTCG  
 CGAGCCTCCGGATGACGACCGTAGTGATGAATCTCTCTGGCGGGAACAGCAAAATATCACCCGGTCCGCAAAAACAAATTC  
 TCGTCCCTGATTTTTCACCACCCCTGACCGCAATGGTGAGATTGAGAATATAACCTTTTCAATCCAGCGGTGCGTTCGA  
 TAAAAAATCGAGATAACCGTTGGCCTCAATCGGCGTTAAACCCGCCACCAGATGGGCATTAACGAGTATCCCGGCAGC  
 AGGGATCATTTTTGCCTTCAGCCATACTTTTTCATACTCCCGCCATTTCAGAG

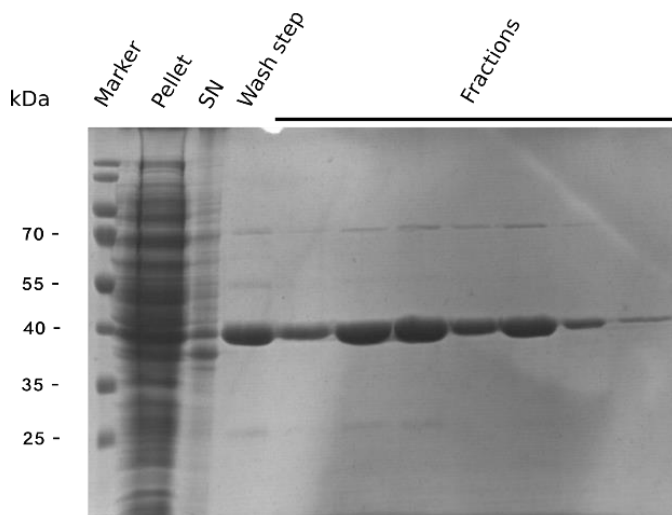
## 9.2 Protein-Reinigungs-Gele

### PAL\_opt\_his



**Grafik 1:** Überblick über den Reinigungsverlauf des Codonoptimierten PAL Konstrukts mit Hexahistidin-tag: Es ist ein Coomassie-gefärbtes 12,5 %-iges SDS-Polyacrylamidgel des Reinigungsverlaufs gezeigt. Aufgetragen wurden Proben des *E.coli* Zellysats zu verschiedenen Zeitpunkten der Reinigung. Von links nach rechts sind zu sehen: Größenstandard, Zellysat nach Ultraschallaufschluss, Überstand nach Zentrifugation, Pellet nach Zentrifugation, Waschfraktionen der Reinigung auf dem ÄKTA-Chromatographiesystem sowie Eluatfraktionen.

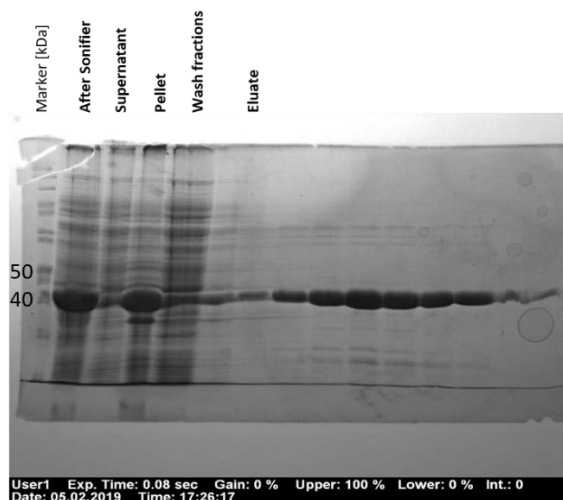
### PALC234A



**Grafik 2:** Überblick über den Reinigungsverlauf des Codonoptimierten PALC284A Konstrukts mit Hexahistidin-tag: Es ist ein Coomassie-gefärbtes 12,5 %-iges SDS-Polyacrylamidgel des Reinigungsverlaufs gezeigt. Aufgetragen wurden Proben des *E.coli* Zellysats zu verschiedenen Zeitpunkten der Reinigung. Von links nach rechts sind zu sehen: Größenstandard, Pellet nach Zentrifugation, Überstand nach Zentrifugation, Waschfraktion der Reinigung auf dem ÄKTA-Chromatographiesystem sowie Eluatfraktionen.

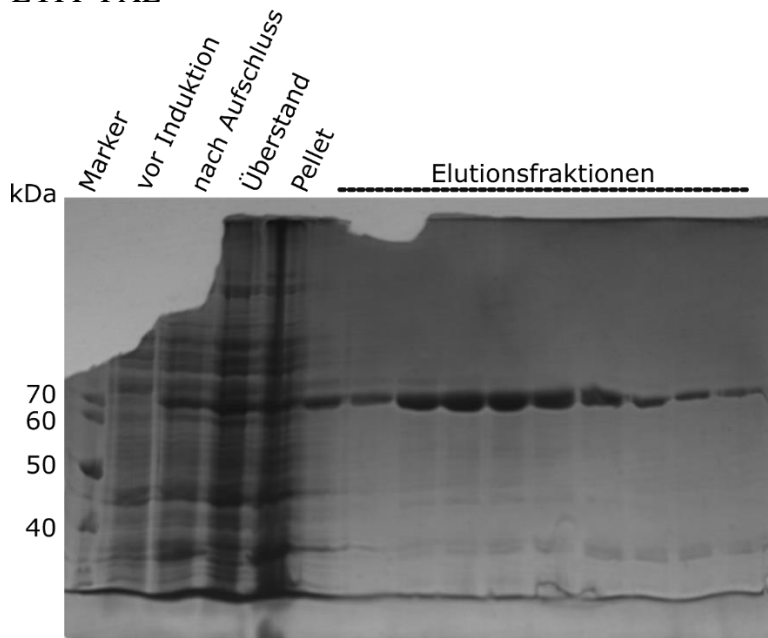
## PALQ347L

31072018\_PALQ347L Reinigung cmpX13



**Grafik 3: Überblick über den Reinigungsverlauf des Codonoptimierten PALQ347L Konstrukts mit Hexahistidin-tag:** Es ist ein Coomassie-gefärbtes 12,5 %-iges SDS-Polyacrylamidgel des Reinigungsverlaufs gezeigt. Aufgetragen wurden Proben des *E.coli* Zelllysats zu verschiedenen Zeitpunkten der Reinigung. Von links nach rechts sind zu sehen: Größenstandard, Zelllysats nach Ultraschallaufschluss, Überstand nach Zentrifugation, Pellet nach Zentrifugation, Waschfraktionen der Reinigung auf dem ÄKTA-Chromatographiesystem sowie Eluatfraktionen.

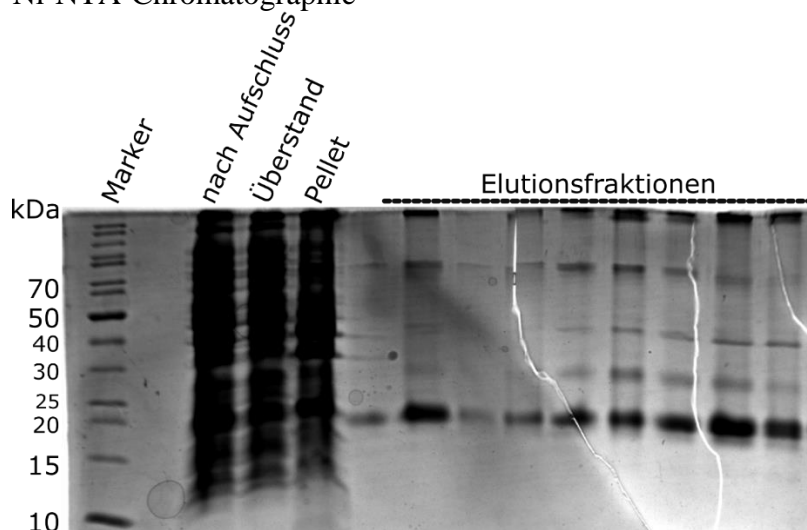
## EYFP-PAL



**Grafik 4: Überblick über den Reinigungsverlauf des Codonoptimierten EYFP-PAL Fusionskonstrukts mit Hexahistidin-tag:** Es ist ein Coomassie-gefärbtes 12,5 %-iges SDS-Polyacrylamidgel des Reinigungsverlaufs gezeigt. Aufgetragen wurden Proben des *E.coli* Zelllysats zu verschiedenen Zeitpunkten der Reinigung. Von links nach rechts sind zu sehen: Größenstandard, Zelllysats vor Induktion, Zelllysats nach Ultraschallaufschluss, Überstand nach Zentrifugation, Pellet nach Zentrifugation sowie Eluatfraktionen der Reinigung auf dem ÄKTA-Chromatographiesystem.

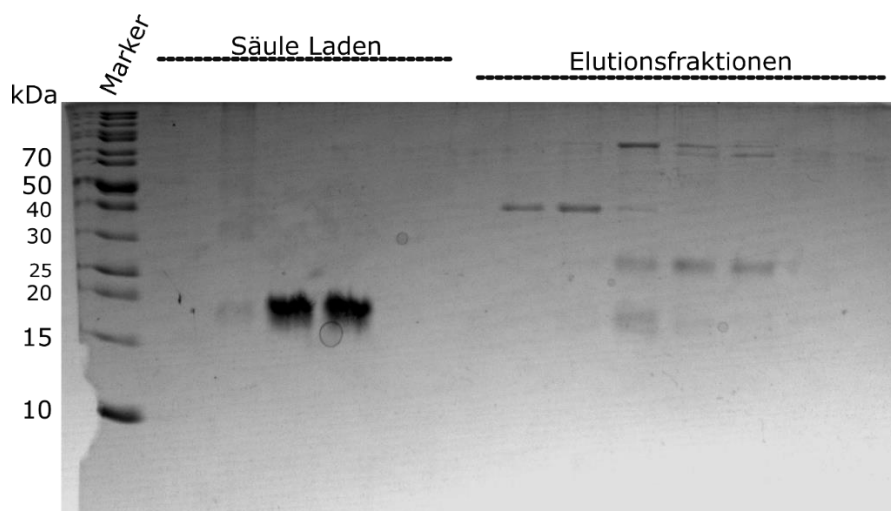
Nanobody\_lacI

Ni-NTA-Chromatographie



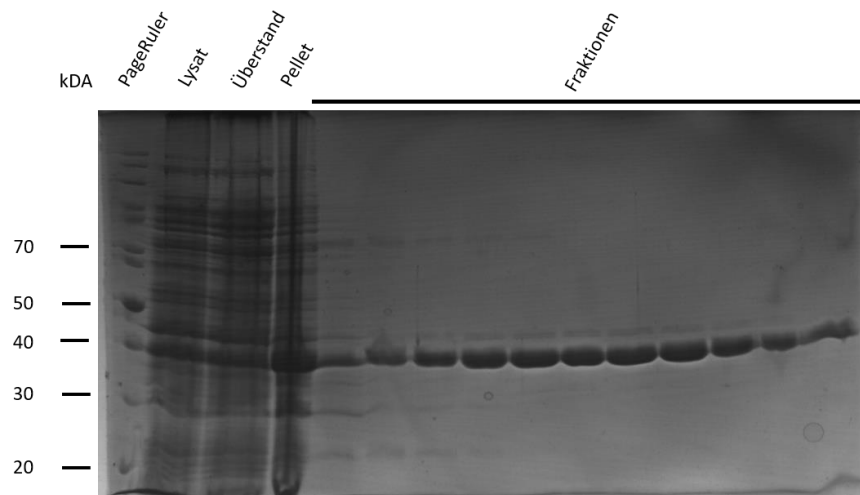
**Grafik 4:** Überblick über den Reinigungsverlauf des Nanobody-lacI Fusionskonstrukts mit Hexahistidin-tag: Es ist ein Coomassie-gefärbtes SDS-Polyacrylamidgel nach Schägger des Reinigungsverlaufs gezeigt. Aufgetragen wurden Proben des *E. coli* Zellsats zu verschiedenen Zeitpunkten der Reinigung. Von links nach rechts sind zu sehen: Größenstandard, Zellsatz nach Ultraschallaufschluss, Überstand nach Zentrifugation, Pellet nach Zentrifugation sowie Eluatfraktionen der Reinigung auf dem ÄKTA- Chromatographiesystem.

Anionentauscher-Chromatographie:



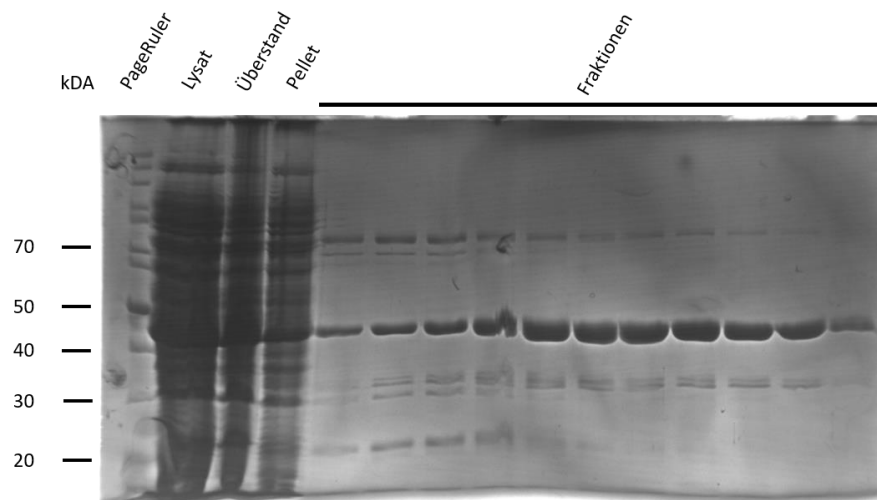
**Grafik 5:** Überblick über den Reinigungsverlauf des Nanobody-lacI Fusionskonstrukts mit Hexahistidin-tag: Es ist ein Coomassie-gefärbtes Polyacrylamidgel nach Schägger des Reinigungsverlaufs gezeigt. Aufgetragen wurden Eluate im Verlauf der Anionentauscherchromatographie, wobei das Zielprotein beim Laden der Säule eluierte während die Verunreinigungen später durch einen Puffertausch von der Säule entfernt wurden.

## NsPAL1



**Grafik 6: Überblick über den Reinigungsverlauf des NsPAL1 Konstrukts mit Hexahistidin-tag:** Es ist ein Coomassie-gefärbtes 12,5 %-iges SDS-Polyacrylamidgel des Reinigungsverlaufs gezeigt. Aufgetragen wurden Proben des *E.coli* Zelllysats zu verschiedenen Zeitpunkten der Reinigung. Von links nach rechts sind zu sehen: Größenstandard, Zelllysats vor Induktion, Zelllysats nach Ultraschallaufschluss, Überstand nach Zentrifugation, Pellet nach Zentrifugation sowie Eluatfraktionen der Reinigung auf dem ÄKTA- Chromatographiesystem.

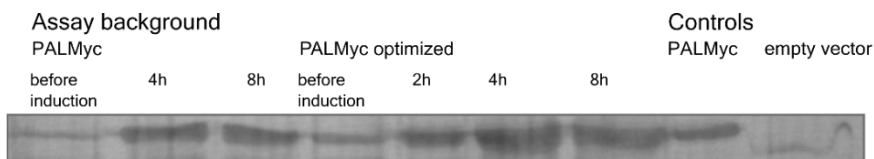
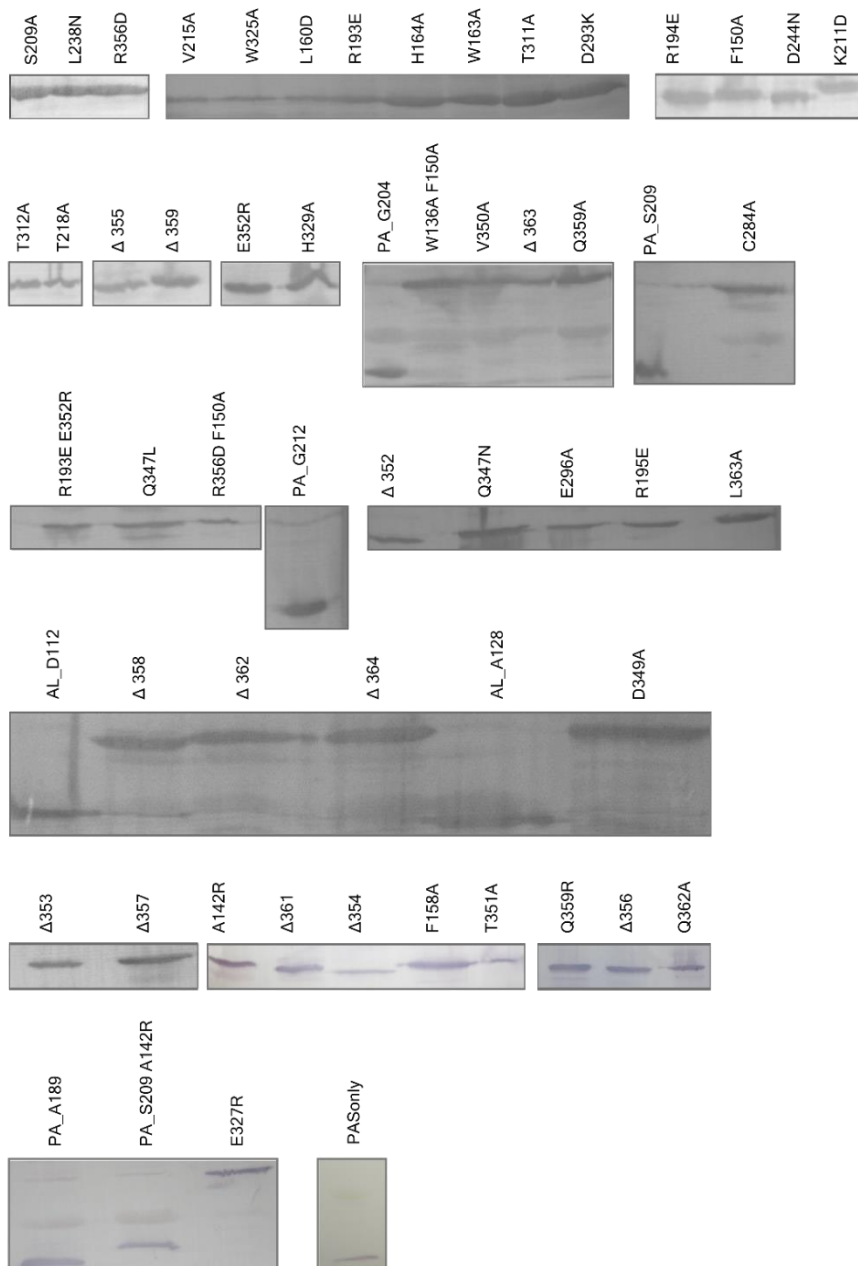
## NsPAL2



**Grafik 6: Überblick über den Reinigungsverlauf des NsPAL2 Konstrukts mit Hexahistidin-tag:** Es ist ein Coomassie-gefärbtes 12,5 %-iges SDS-Polyacrylamidgel des Reinigungsverlaufs gezeigt. Aufgetragen wurden Proben des *E.coli* Zelllysats zu verschiedenen Zeitpunkten der Reinigung. Von links nach rechts sind zu sehen: Größenstandard, Zelllysats vor Induktion, Zelllysats nach Ultraschallaufschluss, Überstand nach Zentrifugation, Pellet nach Zentrifugation sowie Eluatfraktionen der Reinigung auf dem ÄKTA- Chromatographiesystem.

## 10.3 Western Blots zum Expressionsnachweis

## Mutanten

Assay background  
PALMyc optimized

**Grafik 7: Expressionsnachweis von PAL Varianten im Assay-System durch Anti-Myc Western Blot:** Es sind die durch Antikörpernachweis verifizierten Expressionsbanden der entsprechenden PAL Varianten aus Lysatproben des bakteriellen Reporterassays, die nach der Messung der optischen Dichte und der Fluoreszenz gewonnen wurden, gezeigt.

## 10. (Eidesstattliche) Erklärungen und Versicherungen

Hiermit versichere ich eidesstattlich, dass ich die Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe (vgl. Art. 64 Abs. 1 Satz 6 BayHSchG).

Hiermit erkläre ich, dass ich die Dissertation nicht bereits zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht habe und dass ich nicht bereits diese oder eine gleichartige Doktorprüfung endgültig nicht bestanden habe.

Hiermit erkläre ich, dass ich Hilfe von gewerblichen Promotionsberatern bzw. –vermittlern oder ähnlichen Dienstleistern weder bisher in Anspruch genommen habe noch künftig in Anspruch nehmen werde.

Hiermit erkläre ich mein Einverständnis, dass die elektronische Fassung der Dissertation unter Wahrung meiner Urheberrechte und des Datenschutzes einer gesonderten Überprüfung unterzogen werden kann.

Hiermit erkläre ich mein Einverständnis, dass bei Verdacht wissenschaftlichen Fehlverhaltens Ermittlungen durch universitätsinterne Organe der wissenschaftlichen Selbstkontrolle stattfinden können.

Ludwigshafen, 03.11.2020, .....  
Ort, Datum, Unterschrift