

Modifizierung und Immobilisierung  
von Enzymen  
zur Herstellung  
neuartiger katalytischer Plattformen

Zur Erlangung des akademischen Grades eines  
DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN  
(Dr. rer. nat.)

Fakultät für Chemie und Biowissenschaften  
Karlsruher Institut für Technologie (KIT) - Universitätsbereich  
genehmigte

DISSERTATION

von

M. Sc. Dennis Martin Bauer

aus

Hamm-Westfalen

Dekan: Prof. Dr. Peter Roesky

Referent: PD Dr. Ljiljana Fruk

Korreferent: Prof. Dr. Christof M. Niemeyer

Tag der mündlichen Prüfung: 13.02.2015

*„Ich möchte ihnen nahe bringen, welches Gefühl ich angesichts der mathematischen Schönheit der Natur habe, angesichts dessen, was sie im Inneren zusammenhält. Zu wissen, dass die empirischen Phänomene auf der Komplexität der inneren Funktionsweise von Atomen basiert, ist dramatisch und wunderbar. Ich habe also ein Gefühl der Ehrfurcht angesichts der Pracht des Universums.“*

(Richard Phillips Feynman, Physiker und Nobelpreisträger)

\*11.Mai.1918-New York; † 15.Februar1988-Los Angeles

*Für meine Familie und meine Lebenspartnerin, die mich immer unterstützten.*

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Februar 2011 bis Dezember 2014 unter der Betreuung von Frau PD Dr. Ljiljana Fruk am DFG-Centrum für funktionelle Nanostrukturen (DFG-CFN) und am Institut für organische Chemie des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT) angefertigt.

## Inhaltsangabe

<b>1</b>	<b><i>Kurzzusammenfassung</i></b> .....	<b>10</b>
<b>2</b>	<b><i>Einleitung</i></b> .....	<b>12</b>
<b>2.1</b>	<b>DNA Nanotechnologie</b> .....	<b>12</b>
<b>2.2</b>	<b>Semisynthetische Protein-DNA Konjugate</b> .....	<b>16</b>
2.2.1	Nicht kovalente Bindungsstrategien .....	16
2.2.2	Kovalente Bindungsstrategien .....	20
<b>2.3</b>	<b>Anwendungen von semisynthetischen Protein-DNA Konjugaten</b> .....	<b>27</b>
<b>2.4</b>	<b>DNA Origami</b> .....	<b>30</b>
<b>2.5</b>	<b>Lichtgesteuerte Kontrolle von Biomolekülen</b> .....	<b>35</b>
<b>2.6</b>	<b>Aufgabenstellung</b> .....	<b>41</b>
<b>3</b>	<b><i>Ergebnisse und Diskussion</i></b> .....	<b>43</b>
<b>3.1</b>	<b>Die lichtinduzierte Protein-DNA Konjugation</b> .....	<b>43</b>
3.1.1	Das Prinzip der lichtinduzierten Protein-DNA Konjugation .....	43
3.1.2	Lösungsmiteleinfluss und Bestrahlungsstabilität.....	48
3.1.3	Synthese und Charakterisierung von Photoenol modifizierter ssDNA.....	54
3.1.4	Lichtinduzierte Konjugation von Photoenol modifizierter ssDNA mit Maleimid funktionalisierten Myoglobin .....	57
3.1.5	Berechnung des stöchiometrischen Verhältnisses des lichtinduzierten Myoglobin- ssDNA Konjugats .....	64
3.1.6	Hybridisierungsfähigkeit des lichtinduzierten Protein-DNA Konjugats .....	66
3.1.7	Aktivitätstest des lichtinduzierten DNA-Myoglobin Konjugats.....	69
3.1.8	DNA direkte Immobilisierung des lichtinduzierten DNA-Myoglobin Konjugats..	73
<b>3.2</b>	<b>Protein-DNA Konjugation über Tyrosin</b> .....	<b>75</b>
3.2.1	Bifunktionelle Linker für die chemische Tyrosin-Modifizierung.....	77
3.2.2	Fluorophor Modifizierung von Proteinen mittels Tyrosin bindenden hetero- bifunktionellen Linker.....	79
3.2.3	Synthese und Reinigung der Tyrosin modifizierten Protein-DNA Konjugate .....	84
3.2.3.1	Verknüpfung über eine Michael-Addition.....	86
3.2.3.2	Verknüpfung über die Kupfer katalysierte Azid-Alkin Cycloaddition.....	91

3.2.3.3	Verknüpfung über eine Kupfer freie spannungsvermittelte Azid-Alkin Cycloaddition.....	94
3.2.4	Hybridisierungstest der Tyrosin modifizierten Protein-DNA Konjugate .....	97
3.2.5	Aktivitätstests der Tyrosin modifizierten Myoglobin-DNA Konjugate .....	99
3.2.6	DNA vermittelte Immobilisierung der Tyrosin modifizierten Myoglobin-DNA Konjugate.....	104
<b>3.3</b>	<b>DNA-Origami als Immobilisierungsplattform .....</b>	<b>105</b>
3.3.1	Gestaltung eines rechteckigen DNA Origamis .....	106
3.3.2	Assemblierung und Charakterisierungen des DNA Origamis .....	112
3.3.3	Modifizierung des Origamis mit Fängeroligonukleotiden.....	115
3.3.4	Immobilisierung von Myoglobin-DNA Konjugaten.....	119
<b>3.4</b>	<b>Klonierung von rekombinanten Myoglobin .....</b>	<b>125</b>
3.4.1	Grundsätzliche Überlegungen zur Klonierungsmethode .....	127
3.4.2	Nomenklatur .....	131
3.4.3	Einführung von Cystein Modifikationen in natives Myoglobin .....	132
3.4.4	Expression und Reinigung der Myoglobin-Cystein Mutanten.....	141
3.4.5	Fluorophor-Modifizierung der Myoglobin-Cystein Mutanten.....	145
3.4.6	Aktivitätstests der Myoglobin-Cystein Mutanten .....	147
3.4.7	Einführung einer Polyhistidin-Markierungen in natives Myoglobin .....	148
3.4.8	Einführung eines Strep <i>Tag</i> II-Affinitäts- <i>Tags</i> in Cystein-Myoglobin Mutanten	152
3.4.9	Expression und Aufreinigung der StrepTagII markierten Myoglobin-Cystein Mutanten .....	155
3.4.10	Fluorophormodifizierung der StrepTag markierten Myoglobin-Cystein Mutanten ... .....	160
3.4.11	Aktivitätstest der StrepTag markierten Myoglobin-Cystein Mutanten.....	162
3.4.12	Immobilisierung der StrepTag modifizierten Myoglobinmutanten auf StrepTactin modifizierten Oberflächen .....	164
3.4.13	Klonierung eines Fusionsproteins mittels rekombinationsvermittelter Strategie .	166
<b>4</b>	<b><i>Zusammenfassung und Ausblick</i> .....</b>	<b>176</b>
<b>5</b>	<b><i>Experimenteller Teil</i>.....</b>	<b>179</b>
<b>5.1</b>	<b>Chemikalien und Lösungsmittel .....</b>	<b>179</b>
<b>5.2</b>	<b>Verwendete Methoden und Messgeräte .....</b>	<b>179</b>
5.2.1	Massenspektrometrie .....	179
5.2.2	UV-Vis Spektroskopie.....	179

---

5.2.3	Schnelle Flüssigkeitschromatographie.....	180
5.2.4	Hochdruckflüssigkeitschromatographie.....	180
5.2.5	Elektrophorese .....	180
5.2.5.1	Polyacrylamidgelelektrophorese.....	180
5.2.5.2	Agarosegelelektrophorese .....	180
5.2.6	Bestimmung der Protein- und Konjugataktivitäten .....	181
5.2.7	Dialyse .....	181
5.2.8	Polymerase-Kettenreaktion.....	181
5.2.9	Schüttler, Inkubatoren, Zentrifugen und Hilfsgerätschaften.....	181
5.2.10	Lichtreaktionen .....	182
<b>5.3</b>	<b>Reagenzien und Puffer .....</b>	<b>182</b>
5.3.1	Bakterienstämme.....	182
5.3.2	Medien .....	183
5.3.3	Verwendete Enzyme .....	183
5.3.4	Verwendete DNA Stränge .....	184
5.3.5	Verwendete Sequenzierungsprimer .....	185
5.3.6	Pufferverzeichnis und Lösungen.....	185
<b>5.4</b>	<b>Allgemeine Arbeitsvorschriften (AAV) .....</b>	<b>187</b>
5.4.1	Analysen und Darstellungen der Protein-DNA Konjugate.....	187
AAV 1.	Reinigung der Protein DNA-Konjugate mittels Anionenaustauschchromatographie.....	187
AAV 2.	Nicht denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese (nPAGE) .....	187
AAV 3.	Berechnung des stöchiometrischen Verhältnisses der STV-DNA Konjugate	188
AAV 4.	Bestimmung der Peroxidaseaktivität der Myoglobin-DNA Konjugate .....	189
AAV 5.	Beschichtung von Mikrotiterplatten mit Streptavidin bzw. Streptactin.....	189
AAV 6.	Immobilisierung von Fängeroligonukleotiden auf Streptavidin beschichteten Mikrotiterplatten .....	190
AAV 7.	DNA vermittelte Immobilisierung von Protein-DNA Konjugaten.....	190
5.4.2	Färbemethoden von Polyacrylamid- und Agarosegelen .....	191
AAV 8.	Silberfärbung.....	191
AAV 9.	SYBR Gold Färbung.....	192
AAV 10.	Ethidumbromidfärbung .....	192
AAV 11.	Coomassie Blau Färbung .....	192
5.4.3	Molekularbiologische und genetische Methoden .....	193
AAV 12.	Ausstreichen von Bakteriensuspensionen auf Agarplatten .....	193
AAV 13.	Übertragung von Kolonien in Wachstumsmedium .....	193

AAV 14. Isolierung der Plasmide aus Bakterienzellen mittels Zyppy™ Plasmid Mini-Prep Kits.....	193
AAV 15. Restriktionsverdau von Plasmiden .....	194
AAV 16. Charakterisierung des Restriktionsverdaus mit Agarosegelelektrophorese ..	194
AAV 17. Sequenzierung der Plasmide .....	195
AAV 18. Herstellung von kompetenten Bakterienzellen.....	195
AAV 19. Transformationen kompetenter Bakterienzellen mittels Expressionsvektoren ... .....	196
AAV 20. Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	196
AAV 21. Analyse der PCR Produkte mittels Agarosegelelektrophorese .....	197
AAV 22. Isolierung der PCR-Produkte mittels präparativer Agarosegelelextraktion.....	197
AAV 23. Transformation von <i>Escherichia coli</i> mittels PCR-Produkte.....	198
AAV 24. Überexpression der rekombinanten Proteine .....	198
AAV 25. Aufschluss von Bakterienzellen mittels enzymatischer und mechanischer Behandlung .....	199
AAV 26. Ammoniumsulfatfällung von Proteinen .....	200
AAV 27. Dialyse des Zellysats.....	200
AAV 28. Reinigung rekombinanter Proteine mittels Anionenaustauschchromatographie. .....	201
AAV 29. Reinigung rekombinanter Proteine mittels StrepTactin®-Affinitäts- chromatographie.....	202
AAV 30. Charakterisierung der gereinigten rekombinanten Proteine mittels denaturierender SDS PAGE.....	203
AAV 31. Aktivitätstest der exprimierten und gereinigten Myoglobin Mutanten .....	203
<b>5.5 Detaillierte Arbeitsvorschriften (DAV) .....</b>	<b>204</b>
5.5.1 Experimenteller Aufbau der Licht gesteuerten Reaktion.....	204
DAV 1. Bestrahlungstest von nativen Myoglobin .....	204
DAV 2. Charaktersierung des bestrahlten DNA Einzelstranges mittels nicht denaturierender Polyacryamidgelelektrophorese .....	204
DAV 3. Hybridisierungstest des bestrahlten DNA Einzelstranges .....	205
DAV 4. Charakterisierung des bestrahlten DNA Einzelstranges mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie .....	206
DAV 5. Kupplung des Photoenolderivats an die DNA.....	206
DAV 5.1. Abspaltung der Dimethoxytrityl Schutzgruppe.....	206
DAV 5.2. Aktivierung der Carboxylgruppe des FMP-Derivats .....	207

DAV 5.3. Kupplung des FMP-Derivats an die ssDNA über die Festphasenstrategie.....	207
DAV 5.4. Reinigung und Charakterisierung der FMP modifizierten ssDNA .	207
DAV 6. Funktionalisierung von Myoglobin mittels Sulfosuccinimidyl 4-(N- maleimidomethyl)-cyclohexan-1-carboxylat.....	208
DAV 7. Lichtinduzierte Konjugation von FMP-D1 mit Mb-Mal .....	209
5.5.2 Kovalente DNA Kupplung über Tyrosine .....	209
DAV 8. Kupplung von Crosslinker BL-4, BL-5 und BL-6 an L-Tyrosin.....	209
DAV 9. Aktivierung der Tyrosin bindenden Crosslinker und anschließende Protein Kupplung .....	210
DAV 10. Fluorophorkupplung an Tyrosin modifizierten Streptavidin und Myoglobin .....	210
DAV 11. DNA Kupplung an die Tyrosin modifizierten Zielproteine.....	211
DAV 11.1. Protein-DNA Konjugation mittels einer Thiol-Michael Reaktion ....	211
DAV 11.2. Protein-DNA Konjugation mittels einer Kupfer katalysierten Alkin- Azid Cycloaddition (CuAAC) .....	212
DAV 11.3. Protein-DNA Konjugation mittels einer spannungsvermittelten Kupfer freien Cycloaddition .....	212
DAV 12. Charaktersisierung der gereinigten Protein-DNA Konjugate mit nicht denaturierender Polyacrylamidgelelektrophorese.....	213
DAV 13. Hybridisierungstest der Tyrosin modifizierten Protein-DNA Konjugate .	213
5.5.3 Methoden zur Analyse des DNA Origamis .....	214
DAV 14. Gestaltung und Assemblierung des DNA Origamis .....	214
DAV 15. Charakterisierung des DNA Origamis mit Agarosegelelektrophorese .....	214
DAV 16. Assemblierung des DNA Origamis mit Fängeroligonukleotiden.....	214
DAV 17. Charakterisierung der immobilisierten Myoglobin-DNA Konjugaten mittels Agarosegelelektrophorese.....	215
DAV 18. Charakterisierung des Origamis mittels Rasterkraftmikroskopie .....	215
<b>6 Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>216</b>
<b>7 Literaturverzeichnis .....</b>	<b>220</b>
<b>8 Danksagung.....</b>	<b>231</b>
<b>9 Publikationsliste .....</b>	<b>233</b>
<b>10 Konferenzbeiträge und Posterpräsentationen .....</b>	<b>234</b>

<b>11 Anhang</b> .....	<b>235</b>
<b>11.1 Lichtinduzierte Protein DNA Konjugation</b> .....	<b>235</b>
11.1.1 Reinigung des MbD1 <sub>Chem</sub> Konjugats.....	235
<b>11.2 DNA Modifizierung von Tyrosinen</b> .....	<b>236</b>
11.2.1 Einfluss von N-Bromsuccinimid und Pyridin auf die Stabilität der Modelproteine 236	
11.2.2 Fluorophormodifizierungen von Tyrosinen .....	237
11.2.3 Reinigung der synthetisierten Konjugate .....	238
11.2.4 Hybridisierungstests der gereinigten Protein-DNA Konjugate.....	242
11.2.5 Reinigung und Aktivitätstest der <sup>Mb</sup> sSMCC <sub>D2</sub> und <sup>Mb</sup> sSMCC <sub>D3</sub> Konjugate .....	246
<b>11.3 Origami</b> .....	<b>247</b>
11.3.1 Verwendete Helferstränge .....	247
<b>11.4 Klonierung von rekombinanten Myoglobin</b> .....	<b>253</b>
11.4.1 Daten und Analysen der mMbpUC19 PCR Produkte.....	253
11.4.2 Restriktionsverdau der isolierten mMbpUC19 Expressionsvektoren .....	254
11.4.3 Sequenzierungsdaten der mMbpUC19 Expressionsvektoren .....	255
11.4.4 Reinigung der rekombinanten mMb Proteine .....	257
11.4.5 Fluorophormodifizierung der rekombinanten mMb Proteine .....	260
11.4.6 Daten und Analysen der mMbpUC19STII PCR Produkte .....	260
11.4.7 Sequenzierungsdaten der mMbpUC19STII Expressionsvektoren.....	262

## ***1 Kurzzusammenfassung***

In der vorliegenden Arbeit konnten zwei neue Protein-DNA Konjugationsstrategien eruiert werden. In beiden Fällen wurde eine kovalente Strategie gewählt, welche sich auf die Modifizierung von natürlichen Aminosäuren konzentrierte. Hierzu wurden innerhalb der Arbeitsgruppe Fruk neu gestaltete heterobifunktionelle Crosslinker synthetisiert, welche für verschiedenste chemische Reaktionen zur Kupplung verwendet werden konnten.

Die erste Kupplungsstrategie basierte auf eine Licht gesteuerte Protein-DNA Konjugation. Hierzu wurde ein kurzer DNA Einzelstrang mittels eines spezifisch gestalteten Photoenolderivats (sog. eingesperrtes reaktives Dien) über eine Festphasensynthese modifiziert. Anschließend wurde die modifizierte DNA selektiv über eine lichtinduzierte [2+4] Cycloaddition mit einem Maleimid modifiziertem Myoglobin (Mb) kovalent verknüpft. Das gewonnene Konjugat zeigte eine deutliche Aktivitätssteigerung gegenüber nativem Myoglobin und konnte mittels einer DNA vermittelte Immobilisierung (DDI) auf Oberflächen „fixiert“ werden.

Eine zweite Strategie basierte auf die Anwendungen unterschiedlichster heterobifunktioneller Linker, welche eine kovalenten Verknüpfung von DNA an die Zielproteine Streptavidin (STV) und Mb über eine Tyrosinmodifizierung garantierten. Die Linker besaßen ein 4-Phenyl-1,2,4-triazolin-3,5-dion (PTAD) als funktionelle Gruppe, welche bereits in der Vergangenheit zur selektiven Modifizierung von Tyrosin eingesetzt werden konnte. Neben PTAD wurden die Linker mit zusätzlichen Gruppen ausgestattet, welches eine Modifizierung über eine Michael Addition (Maleimid), eine Kupfer katalysierte Klick Reaktion (Azid) und über einer Kupfer freie spannungsvermittelte Reaktion (Cyclooctin) gewährleistete. Insgesamt konnten 6 STV-DNA Konjugate bzw. 4 Mb-DNA Konjugate erfolgreich gereinigt und charakterisiert werden. Eine Kupfer katalysierte Reaktion zwischen Mb mit dem entsprechenden Azid Linker und den jeweiligen Alkin DNA Strängen verlief hierbei nicht erfolgreich. Weiterhin konnten alle Konjugate für einen Hybridisierungstest verwendet werden, wobei ferner die Mb-DNA Konjugate eine erhöhte Aktivität gegenüber nativen Mb besaßen und für eine selektive DNA vermittelte Immobilisierung auf Oberflächen verwendet werden konnten.

Neben der Entwicklung von neuen Protein-DNA Konjugationsstrategien wurde die DNA-Origamistrategie dazu verwendet, um als Immobilisierungsplattform für die synthetisierten Mb-DNA Konjugate zu dienen. Hierzu wurde zunächst eine DNA Origamistruktur in Form eines Rechteckes mittels der Computersoftware SARSE gestaltet. Die Origamistruktur konnte

erfolgreich assembliert, die Nanostruktur mit Fängeroligonukleotiden in Nanometerpräzision modifiziert und die Tyrosin modifizierten Mb-DNA Konjugate für eine selektive Immobilisierung verwendet werden. Die Immobilisierungen wurden mittels Gelelektrophorese charakterisiert und es wurden erste Ergebnisse einer Konjugatimmobilisation mittels Rasterkraftmikroskopie erzielt.

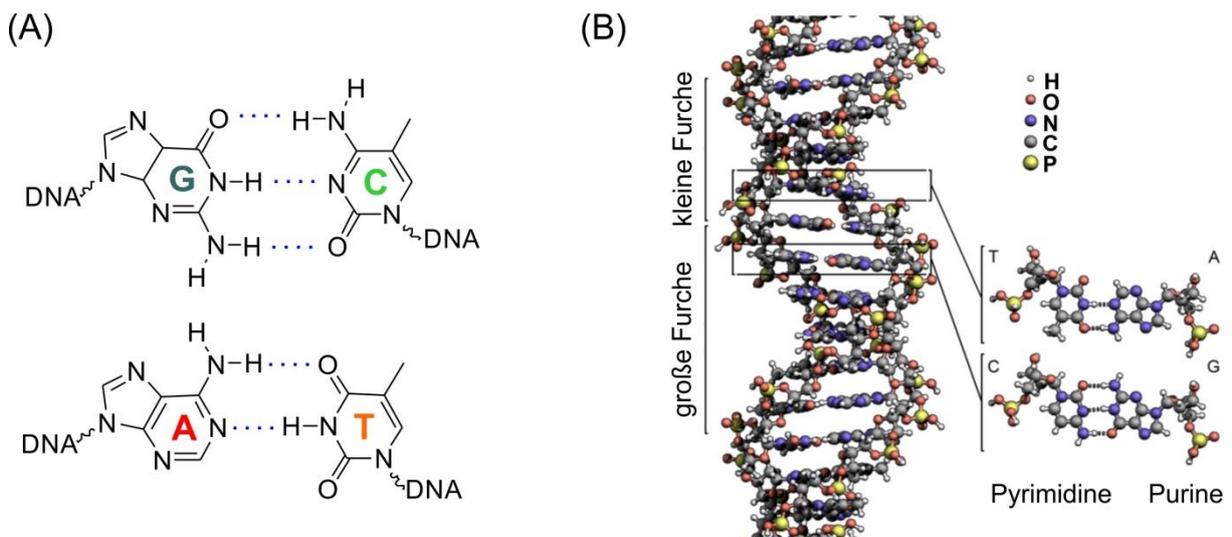
Zuletzt wurde eine Klonierungsmethode in den Arbeitskreis etabliert, welche eine Expression von rekombinanten Myoglobin-Cystein Mutanten ermöglichte. Die Wahl der Cysteinpositionen sollte zukünftige Anwendungen zur Kupplung eines Azobenzolderivats sicherstellen, um eine grundlegende Forschung über lichtsichtbare Myoglobine zu garantieren. Hierzu wurden zunächst die entsprechenden Expressionsvektoren über rekombinatorische Klonierungsmethoden erzeugt und zur Expression der Mutanten verwendet. Die Reinigungen der Mutanten konnte jedoch nur in geringen Ausbeuten und Reinheitsgraden mittels Anionenaustauschchromatographie durchgeführt werden. Aus diesem Grund wurde die integrierte Klonierungsmethode in einem nächsten Schritt zur Einführung von Reinigungstags verwendet und es konnten vier Mb-Cystein Mutanten erfolgreich mit einem StrepTag II modifiziert und in akzeptablen Ausbeuten gereinigt werden. Alle Mutanten zeigten Aktivität und konnten erfolgreich mittels eines Fluorophors markiert werden. Weiterhin konnte die selektive Bindung des StrepTags II an das Protein Streptactin dazu verwendet werden, die isolierten Mutanten auf StrepTactin modifizierte Oberflächen zu immobilisieren. Als Zusatz wurde die rekombinatorische Klonierungsmethode zur Herstellung eines Metallothionein-EGFP Fusionsproteins verwendet, welche zukünftigen Anwendungen zur Gold Nanopartikelmodifizierungen sicherstellen sollten.

## 2 Einleitung

Die Bionanotechnologie erlebte in den letzten Jahrzehnten ein rasantes Wachstum und vereint die naturwissenschaftlichen Grenzgebiete der Biologie, Chemie und Physik. Die Fähigkeit kleine Biomoleküle in Nanometer-Präzision zu manipulieren und deren natürlichen Funktionen und Aufgaben für einen kontrollierten Aufbau von synthetisch hergestellten Netzwerken zu verwenden, gilt hierbei als eines der größten Interessen. In dem nun folgenden Kapitel sollen unterschiedlichste Anwendungen und Methoden zur Manipulation von Biomolekülen dargestellt werden, wobei das spezifische Feld der DNA Nanotechnologie als Hauptvertreter dieser Arbeit im Mittelpunkt steht.

### 2.1 DNA Nanotechnologie

Die Aufklärung der Desoxyribonukleinsäurenstruktur (DNA) durch Watson und Crick im Jahre 1953 zeigte<sup>1</sup>, dass sich die sogenannten Nukleoside Adenosin (A), Thymin (T), Guanosin (G) und Cytosidin (C) innerhalb zweier langer Kettenmoleküle (Polymere) in Form einer Doppelhelix miteinander organisieren, indem die einzelnen Nukleoside eines Stranges über Phosphatbrücken verbunden sind. Hierbei wird die helikale Struktur durch einfache Wasserstoffbrückenbindungen und  $\pi$ - $\pi$ -Stapelwechselwirkung benachbarter Nucleobasen stabilisiert. Die Wasserstoffbrückenausbildung der Struktur folgt über spezifische Gesetze, indem T nur mit A bzw. G nur mit C paart (Abbildung 1A).

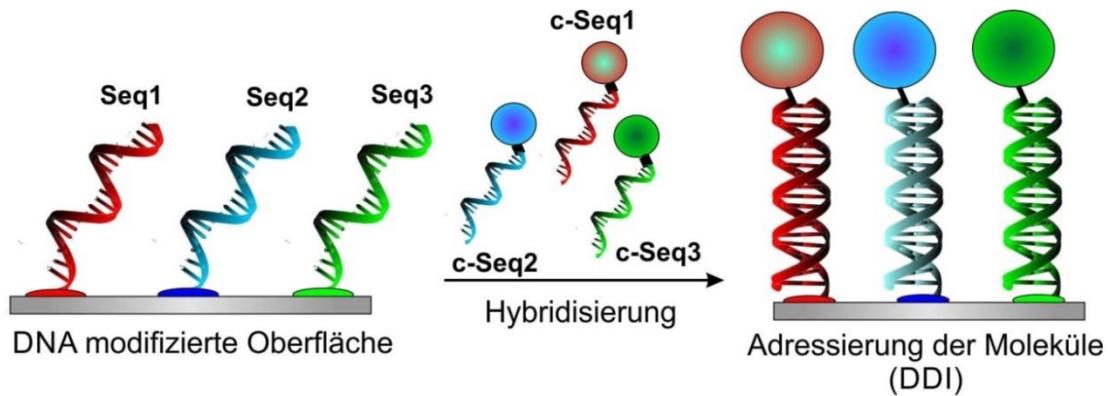


**Abbildung 1:** (A) Darstellung der Watson und Crick Basenpaarung zwischen Guanin (G) und Cytosin (C) bzw. Adenin (A) und Thymin (T). Die Wasserstoffbrücken sind blau gepunktet dargestellt worden. (B) Formierung einer Doppelhelix zwischen zwei komplementären DNA Einzelsträngen.

Die Spezifität der Paarung wird als Watson-Crick Basenpaarung bezeichnet, welche die Ausbildung zweier komplementärer DNA-Stränge zu einem DNA-Duplex garantieren (Abbildung 1B). Diese natürlichen Eigenschaften der DNA bilden eine wichtige Voraussetzung zur Verwendung des Makromoleküls im Bereich der Bionanotechnologie.

Neben den natürlichen Eigenschaften spielt die chemische Modifizierung von DNA in der Gestaltung von DNA strukturierten Nanoelementen eine außerordentliche wichtige Rolle. Hierbei hat sich die Phosphoramidit Synthese nach Caruthers und Beaucage<sup>2</sup> fest etabliert. Der Einsatz von DNA Synthesizern<sup>3, 4</sup> und der Gebrauch der Phosphoramidit Chemie gewährleistet heutzutage eine schnelle und effektive Methode, um kurze DNA Einzelstränge (bis zu weniger als 100 Basen) mit reaktiven chemischen Gruppen zu versehen<sup>5</sup>. Längere modifizierte DNA Stränge können leicht über die Polymerasekettenreaktion (PCR) erzeugt werden, indem spezifisch modifizierte Primer bzw. Nucleosidtriphosphate eingesetzt werden. Die Möglichkeit, DNA mit chemisch funktionellen Gruppen zu markieren, erweiterte das Anwendungsspektrum von DNA in der Nanotechnologie bedeutsam. Die modifizierten DNA Stränge konnten zum Beispiel zur DNA Funktionalisierung von unterschiedlichsten Oberflächen eingesetzt werden und eröffneten somit das wissenschaftliche Gebiet der DNA-Microarraytechnologie<sup>6</sup>. Des Weiteren konnten unterschiedlichste (bio-) molekularer Spezies wie Proteine<sup>7</sup> (siehe Kapitel 2.2) und Zellen<sup>8-10</sup>, unterschiedlichste Metall-Nanopartikel<sup>11-13</sup> oder aber auch Makromoleküle wie Polymere<sup>14, 15</sup> mittels modifizierten DNA Einzelsträngen (ssDNA) über vielseitige Kupplungsmethoden markiert werden.

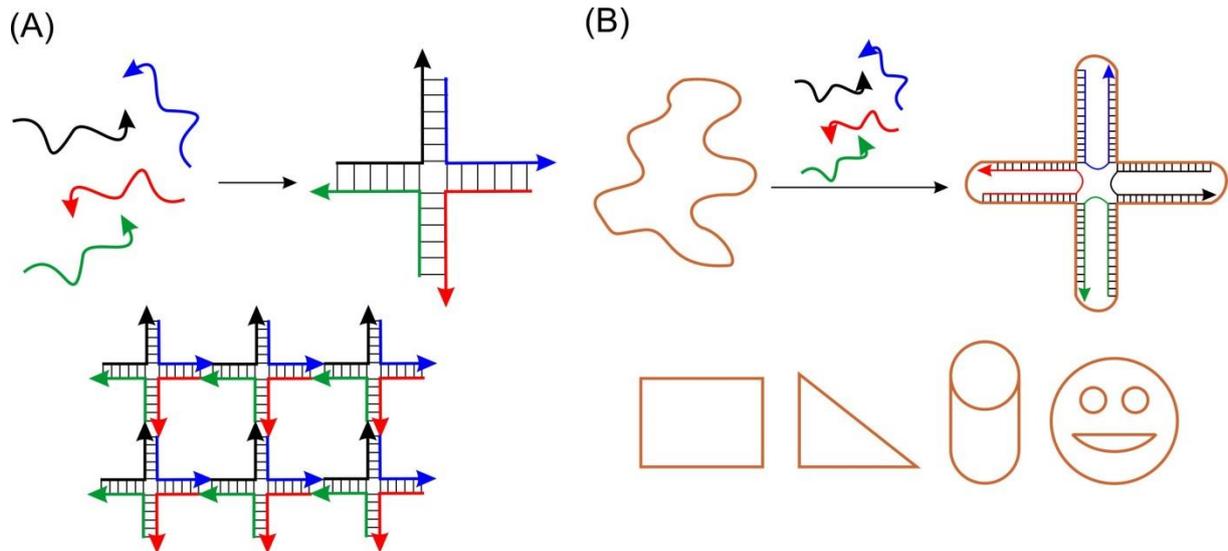
Die Modifizierung einzelner Spezies mit DNA ermöglicht grundlegend den Aufbau von klar strukturierten Netzwerken, indem die natürliche Eigenschaft der spezifischen Watson und Crick Basenpaarung ausgenutzt wird. Im Allgemeinen werden diese Netzwerke in Lösung oder auf Oberflächen konstruiert. Eine Technik, die den frühen neunziger Jahren ein rasantes Wachstum erlebte, wird als DNA vermittelte Immobilisierung (DDI; „*DNA directed Immobilization*“) bezeichnet (Abbildung 2). Hierbei wird eine Oberfläche gezielt mit DNA Einzelsträngen modifiziert, welche als sogenannte Fängeroligonukleotide dienen. Auf diese Weise können unterschiedliche Spezies, welche mit einem komplementären Einzelstrang modifiziert wurden (auch als Sonden DNA bezeichnet), gezielt auf den Oberflächen adressiert werden (Abbildung 2). Diese Methode konnte zum Beispiel für den Aufbau von biologischen Sensorsystemen wie der Immuno-PCR<sup>16, 17</sup>, zur Detektion von Mutation oder Polymorphismus auf Microarrays<sup>18</sup> bzw. zur zielgerichteten Immobilisierung von Biomolekülen für Funktionsstudien<sup>19, 20</sup> verwendet werden.



**Abbildung 2:** Schematische Abbildung der DNA vermittelten Immobilisierung (DDI). Eine mit DNA funktionalisierte Oberfläche wird dazu verwendet, die mit komplementären Sequenzen (c-Seq1, c-Seq-2 und c-Seq3) modifizierten Spezies durch Watson und Crick Basenpaarung auf der Oberfläche zu adressieren.

Weiterhin wurde bereits früh erkannt, dass sich die natürliche Eigenschaft der spezifischen Watson-Crick Basenpaarungen und die geometrische Form der DNA zur Assemblierung von definierten DNA-Strukturen in Nanometermaßstab verwenden lässt. Eine Pioniers-Arbeit wurde in diesem Zusammenhang Anfang der 80er Jahre durch N. C. Seeman durchgeführt.<sup>21</sup> Er erkannte, dass kurze DNA Einzelstränge (ssDNA, „*single stranded DNA*“) als Bausteine zur Assemblierung von definierten zwei- bzw. dreidimensionale Nanometerstrukturen verwendet werden können und eröffnete somit das Gebiet der strukturierten DNA Nanotechnologie.<sup>22-25</sup> Dieser wissenschaftliche Bereich wuchs schnell zu einem eigenen Forschungsgebiet heran und fand über die Jahrtausendwende hinaus zahlreiche Anwendungen innerhalb der Grenzgebiete Chemie, Biologie und Physik.<sup>26-28</sup> Die ersten komplexen DNA Strukturierungen zu maßgeschneiderten Formen und Muster erfolgten somit mit kurzen ssDNA Molekülen und wurden im englischen als „*multistranded approach*“ bezeichnet (Abbildung 3A).

Ein weiterer wichtiger Durchbruch wurde im Jahre 2006 von P. W. Rothemund erlangt.<sup>29</sup> Das relativ neue Forschungsgebiet wurde als DNA-Origami bezeichnet und leitet sich von der japanischen Papierfaltungstechnik Origami (von *Ori*: Faltung, *kami*: Papier) ab. Bei dieser Technik wird ein langer DNA-Gerüststrang (engl.: „*Scaffold strand*“) unter Zuhilfenahme von meist hunderten synthetisch hergestellten kurzen Helfersträngen (engl.: „*staple strands*“) in eine gewünschte Form und Struktur gefaltet. Der Faltungsprozess erfolgt grundsätzlich innerhalb von Minuten oder wenigen Stunden durch einen einfachen Abkühlungsprozess, indem erstaunlichen Ausbeuten erzielt werden können (Abbildung 3B).



**Abbildung 3:** Schematische Abbildung zweier Hauptfaltungstechniken zur Gestaltung von DNA Nanostrukturen. **(A)** Formierung einer Kachel aus vier kurzen und komplementären Einzelsträngen nach der von Seeman beschriebenen mehrsträngigen Faltungstechnik („*multistranded approach*“).<sup>[21]</sup> Besitzen die Kacheln komplementäre Überhänge, können sie Kachelnetzwerke ausbilden. **(B)** Darstellung der Origamitechnik nach Rothemund.<sup>[29]</sup> Ein langer (meist zirkulärer) Einzelstrang (braun) wird mittels hunderter teilkomplementärer kurzer Stränge in die gewünschte zwei- bzw. dreidimensionale Form gefaltet. Aufgrund der Übersicht wurde das präsentierte Beispiel nur mit vier kurzen Hefersträngen dargestellt. Die Pfeilspitzen stellen das 3'-Ende der kurzen Oligonukleotide dar, während der Ursprung das 5'-Ende repräsentiert.

Neben unterschiedlichen Faltungstechniken zur Herstellung von DNA-Nanostrukturen in gewünschten Formen und Strukturen, spielt die Geometrie der Doppelstrang DNA (dsDNA: „*double stranded DNA*“) innerhalb dieser Strukturen eine weitaus wichtige Rolle<sup>30</sup>. Dadurch, dass die Position jeder einzelnen Nukleobase innerhalb der Strukturen bekannt ist, können durch Modifikationen einzelner Positionen gezielt unterschiedliche (bio-)molekulare DNA markierte Spezies, wie Proteine<sup>31</sup> oder auch Nanopartikel<sup>32</sup> auf den Nanostrukturen immobilisiert werden. Die Positionierung kann in Nanometermaßstab erfolgen, indem chemische bzw. Hybridisierungstechniken verwendet werden und eröffnet somit zahlreiche interessante Anwendungsgebiete (vgl. hierzu Kapitel 2.4).

Die beschriebenen Techniken und Eigenschaften der DNA zeigen, dass das wissenschaftliche Feld der DNA Nanotechnologie eine Vielfalt an Möglichkeiten zum Aufbau neuer nanostrukturierter Systeme bietet. Zur Gestaltung dieser Systeme müssen jedoch unterschiedlichste Modifizierungsprinzipien zur Herstellung von DNA konjugierten Spezies bereitgestellt werden. Auch in dieser Arbeit werden zwei neue Konjugationsmethoden zur synthetischen Herstellung von Protein-DNA Konjugaten gezeigt. Aus diesem

Grund sollen als Überblick einige bereits angewandte Prinzipien kurz erläutert und deren Vor- und Nachteile aufgezeigt werden.

## 2.2 Semisynthetische Protein-DNA Konjugate

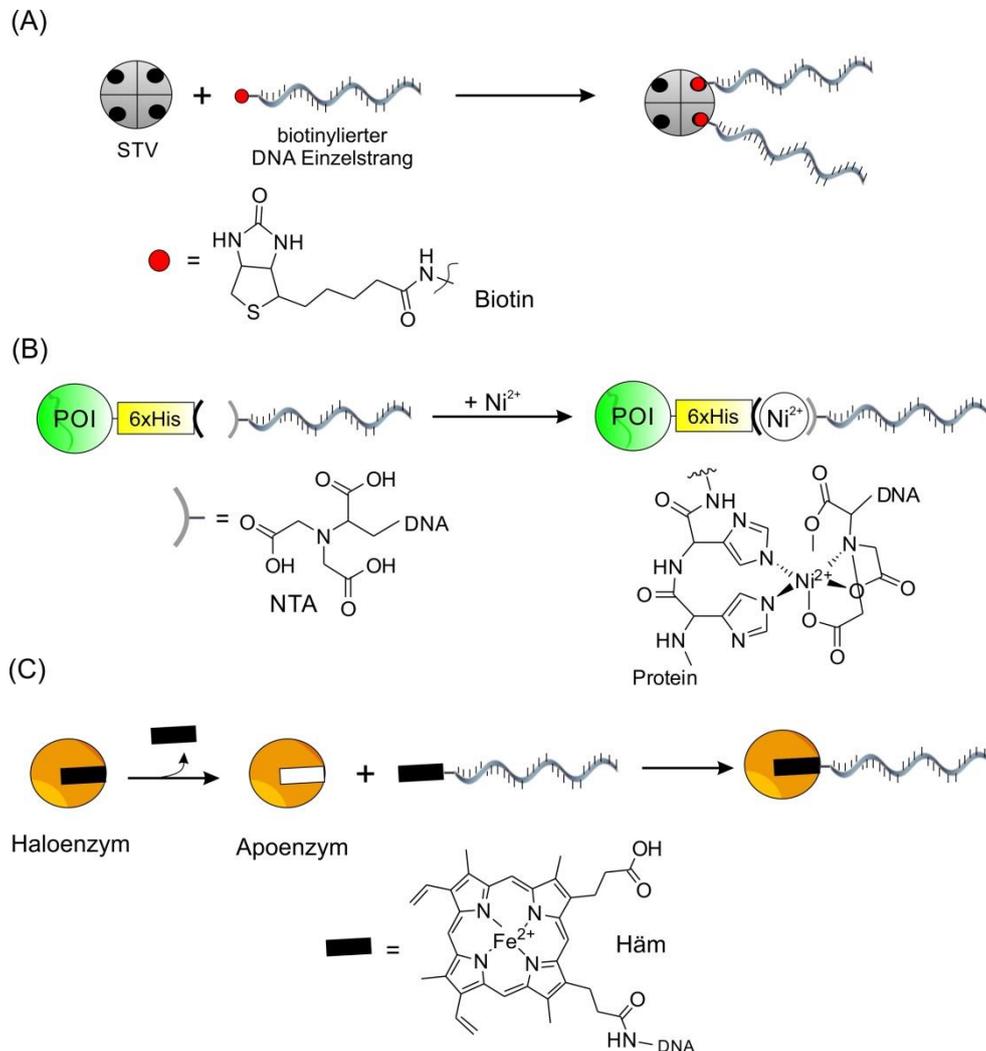
Die synthetische Herstellung von Protein-DNA Konjugaten ermöglicht eine Kombination unterschiedlichster natürlicher Eigenschaften. Hierbei gewährleistet die natürliche Eigenschaft der DNA eine zielgerichtete Adressierbarkeit, indem die Spezifität der Watson und Crick Basenpaarung als Erkennungsmerkmal zur Hybridisierung dient. Proteine hingegen übernehmen in der Natur eine fast unendliche Vielfalt an Funktionen, indem sie z.B. als Katalysatoren chemischer Reaktionen wirken, als strukturgebende Elemente dienen oder zum Transport bzw. Speichern unterschiedlichster Moleküle bereitstehen.<sup>33</sup> Die Vereinigung beider Funktionalitäten erweitert somit die Anwendungsbereiche innerhalb der Bionanotechnologie bedeutsam und unterstreicht zugleich die Wichtigkeit neue und milde Kupplungsstrategien zu entwickeln. Aus diesem Grund sollten auch in dieser Arbeit neue Konjugationsstrategien erprobt und grundlegend analysiert werden.

Die Herstellung von Protein-DNA Konjugaten kann allgemein in zwei unterschiedliche Kupplungsstrategien eingeteilt werden. Hierzu zählen sowohl kovalente als auch nicht kovalente Bindungsmethoden, welche über chemische bzw. molekularbiologische Verfahren durchgeführt werden können. Eine Zusammenfassung unterschiedlichster Strategien zur Herstellung und Anwendung von Protein-DNA Konjugaten ist in einem ausführlichen Übersichtsartikel von Niemeyer gezeigt<sup>7</sup>, wobei einige Konjugationsmethoden in diesem Kapitel nochmals kurz erläutert und ihre Vor- und Nachteile gezeigt werden sollen.

### 2.2.1 Nicht kovalente Bindungsstrategien

Zu einer der wichtigsten nicht kovalenten Bindungsstrategien zählt die stabile Interaktion zwischen dem Molekül Biotin (Vitamin H) und dem tetrameren Protein Streptavidin (STV) aus der Bakterienspezies *Streptomyces avidinii*. Das Protein besteht aus vier gleichen Untereinheiten, welche jeweils ein Biotinmolekül mit einer Dissoziationskonstante  $K_d$  von ca.  $10^{-15}$  M binden können, eine der höchsten bekannten biologischen Bindungskonstanten.<sup>34</sup> Die heute zur Verfügung stehenden automatisierten Syntheseprozessen der Phosphoramidit Strategie bzw. Polymerasekettenreaktion (PCR) machen es leicht möglich, gezielt DNA mit Biotin zu modifizieren und somit ein stabiles DNA-STV Konjugat zu erzeugen. Hierbei können die beiden Komponenten unter schonenden und milden Bedingungen einfach

zusammengegeben werden um eine Konjugation hervorzurufen, ohne dass harsche Reaktionsbedingungen erforderlich sind<sup>16</sup> (Abbildung 4A). Ferner kann eine mono-, bi- oder tri- DNA konjugierte STV Spezies zusätzlich mit weiteren biotinylierten (Bio-)molekülen versehen werden, welche anschließend mittels DDI auf Oberflächen fixiert werden können.



**Abbildung 4:** Schematische Darstellung einiger nicht kovalenter Protein-DNA Konjugationsstrategien. (A) STV-Biotin Strategie.<sup>[16]</sup> (B) Konjugation über Ni<sup>2+</sup> und 6xHis markiertes POI bzw. NTA modifizierte DNA nach Goodman *et al.*<sup>[40]</sup> (C) Rekonstitution des DNA modifizierten Kofaktors Häm nach Fruk *et al.*<sup>[42]</sup>

Ein Nachteil der STV-Biotin Strategie ist das meist unkontrollierbare stöchiometrische Verhältnis zwischen STV und biotinylierter DNA, welches zur Anwendungen von aufwendigen Reinigungsprozessen und somit zu Verlusten von Ausbeuten führt. Speziell bei der Gestaltung von Nanostrukturen, welche ein bestimmtes stöchiometrisches Verhältnis voraussetzen, könnte eine unkontrollierbare Konjugation zu einem Nachteil führen.<sup>35</sup> Eine Lösung könnten hier molekularbiologische Ansätze bieten.<sup>36</sup> Die Herstellung von

heterotetrameren STV wurde als erstes von Chilkoti *et al.* durchgeführt<sup>37</sup>, indem mutierte nicht aktive Monomere *in vitro* mit aktiven Wildtyp Monomeren gefaltet wurden. Somit konnten STV Varianten mit einem Verhältnis der nativen und mutierten Monomere von 1:1 erhalten werden. Eine ähnliche Strategie wurde letztendlich von Howarth *et al.* eingeführt<sup>38</sup>, indem ein monovalentes Tetramer erhalten wurde, welches sich aus drei inaktiven Monomeren und einem aktiven Monomer zusammensetzte. Eine nicht kovalente Monokonjugation zwischen monovalenten STV und biotinylierter DNA würde jedoch keine weiteren Anwendung bieten, da keine weiteren Bindungsstellen für biotinylierten (Bio-) Moleküle zum Aufbau von z.B. Bioreaktoren zur Verfügung stehen würden. In diesem Fall bieten kovalente Bindungsstrategien für STV einen größeren Vorteil (vgl. hierzu Kapitel 2.2.2).

Um die stochiometrischen Problematiken zu umgehen, haben Wissenschaftler nach neuen Konjugationsstrategien gesucht. In den Fokus rückte eine Strategie, welche zur Affinitätsreinigung von hexa Histidin (6xHis-Tag) markierten Proteinen über eine Nitrilotriessigsäuregruppe (NTA; „*nitriloacetic acid*“) verwendet wird. In der von Schacher *et al.* entwickelten Methode<sup>39</sup> wird ein Ni<sup>2+</sup>-Ion von NTA funktionalisierten Harz und 6xHis-Tag terminal modifizierten Zielprotein (POI; „*protein of interest*“) komplexiert. Die an der Säule gebundenen 6xHis-Tag markierten Proteine können somit nach ihrer Expression durch einfache Waschprozesse von Zellysate abgetrennt werden. Anschließend kann durch den Einsatz von Ni<sup>2+</sup>-Chelatoren, wie Ethylendiamintetraacetat (EDTA), das Protein leicht vom Harz abgespalten werden. Diese spezifische und nicht kovalente Bindung konnte von Goodman *et al.* dazu verwendet werden, ein mit 6xHis-Tag modifiziertes grün fluoreszierendes Protein (GFP; „*green fluorescent protein*“) über NTA modifizierte DNA zu verknüpfen<sup>40</sup> (Abbildung 4B). Hierbei wurden unterschiedliche DNA Oligonukleotide mit bis zu drei NTA Gruppen modifiziert und hinsichtlich ihrer Bindungseffizienz gegenüber 6xHis-Tag modifizierten GFP untersucht. Diese Strategie birgt einige Vorteile, da die Einführung eines 6xHis-Tags in Proteine eine Standardmethode in biochemischen Laboren darstellt und die Verknüpfung leicht durch Ni<sup>2+</sup>-Chelatoren reversibel gebrochen werden kann.<sup>40</sup> Des Weiteren können somit Protein-DNA Monokonjugate hergestellt werden, welche eine hohe Regioselektivität aufweisen.

Ein Bindungsglied zwischen nicht kovalenten und kovalenten Strategien stellt eine DNA-Protein Kupplungsmethode dar, welche zur kovalenten Modifizierung von organischen Kofaktoren (prosthetische Gruppen) angewandt wird. Enzyme, welche einen Kofaktor für ihre

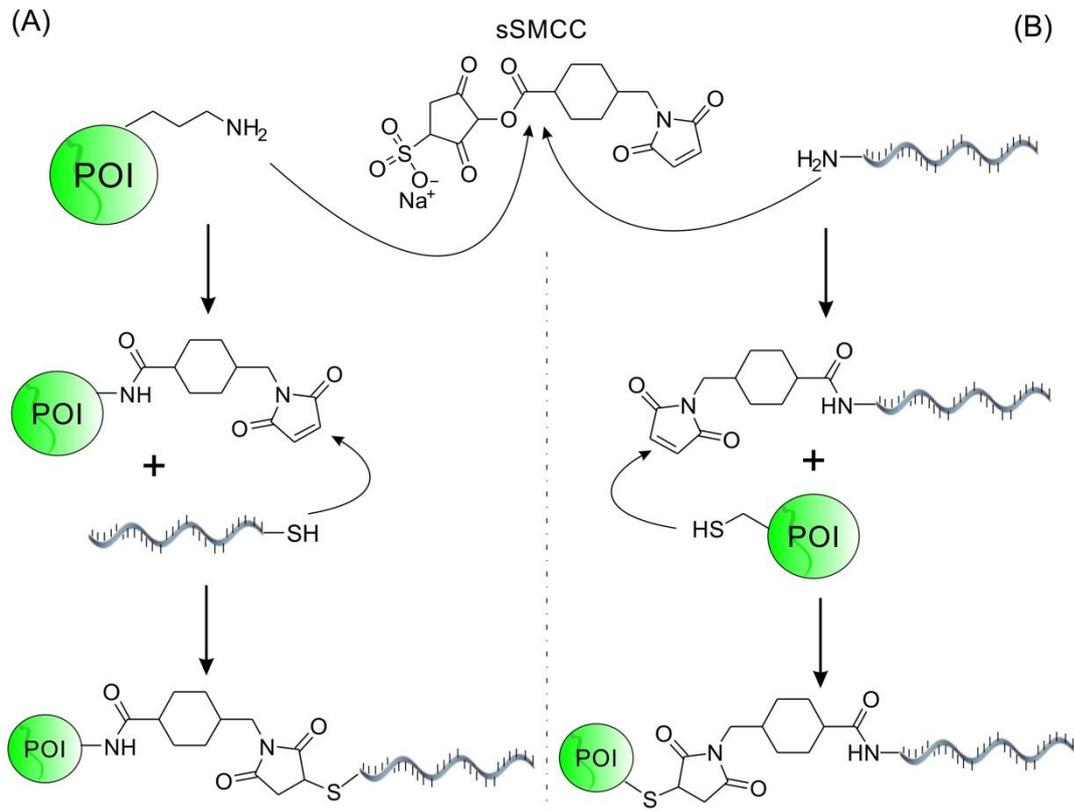
Aktivität benötigen, werden als Holoenzyme bezeichnet, wobei der Kofaktor im aktiven Zentrum eines Holoenzym lokalisiert vorliegt. Die nativen Kofaktoren können aus den Enzymen entfernt werden, wobei die somit gewonnen Apoenzyme leicht mit modifizierten Kofaktoren rekonstituiert werden können (Abbildung 4C). Diese Methode fand bereits eine große Anwendung im Bereich der Biotechnologie und ein ausführlicher Übersichtsartikel ist von Fruk *et al.* zusammengefasst worden.<sup>41</sup>

Ein Konzept basiert auf die regiospezifische Modifizierung des Kofaktors Häm (Protoporphyrin IX) und konnte erfolgreich zur Herstellung von vollständig aktiven Protein-DNA Konjugaten eingesetzt werden (Abbildung 4C). Hierzu wurde der Kofaktor Häm mit DNA Einzelsträngen kovalent modifiziert und zur Rekonstitution der Peroxidasen Apo-Myoglobin (Apo-Mb)<sup>42</sup> bzw. Apo-Meerrettichperoxidase (Apo-HRP; „*horseradish peroxidase*“)<sup>43</sup> verwendet. Die generierten synthetischen Protein DNA-Konjugate konnten erfolgreich zur Immobilisierung auf DNA modifizierten Oberflächen mittels DDI verwendet werden<sup>42, 44, 45</sup>, indem unterschiedlichste Oberflächen mit komplementären Oligonukleotiden modifiziert wurden. Die immobilisierten Proteine konnten zur Gestaltung von elektrochemischen Biosensoren<sup>45</sup> bzw. zur kinetischen Analysen der Häm Rekonstitution mittels Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie (SPR, „*surface plasmon resonance*“)<sup>44</sup> angewandt werden. Ebenfalls konnten interessante Daten bezüglich der Aktivität der Protein-DNA Konjugate gewonnen werden. Hierbei zeigte sich, dass z.B. die hergestellten Myoglobin-DNA Konjugate eine höhere Aktivität gegenüber dem nativen Myoglobin aufwiesen.<sup>42, 43</sup> In späteren Untersuchung von Glettenberg *et al.*<sup>46</sup> konnte weiterhin gezeigt werden, dass ungleiche Sequenzen und DNA Längen, welche zur Modifizierung des Häm Kofaktors verwendet wurden, einen unterschiedlichen Effekt auf die Proteinaktivitäten ausüben. Diese Erkenntnisse machen das Protein Myoglobin zu einem interessanten Modelprotein für eine DNA-Protein Konjugation und wurde aus diesem Grund auch in dieser Arbeit verwendet.

Nicht kovalente Bindungen zwischen DNA und Protein bringen jedoch einige Nachteile mit sich. Meist sind sie reversibel und stark anfällig für Dissoziationen, welches eine Charakterisierung der Konjugate erschwert und eine Anwendung unter spezifischen Bedingungen nicht ermöglicht. Eine Lösung stellen hier kovalente Strategien dar und einige Methoden werden im nächsten Kapitel kurz erläutert.

### 2.2.2 Kovalente Bindungsstrategien

Eine chemisch kovalente Bindungsstrategie basiert auf den Einsatz von kleinen organischen Molekülen, welche zwei orthogonale funktionelle Gruppen tragen. Diese sogenannten heterobifunktionellen Linker (*Crosslinker*) können dazu verwendet werden, zwei unterschiedliche (Bio-)Moleküle miteinander zu „verbrücken“ und somit kovalent zu verknüpfen. Eines der meist angewandten Strategien basiert hierbei auf die Nutzung des kommerziell erhältlichen Linkers sulfosuccinimidyl-4-(N-maleimido-methyl)-cyclohexan-1-carboxylat (sSMCC). Der Crosslinker verfügt über einen N-Hydroxysuccinimidyl- (NHS) Aktivester und einer Maleimidgruppe, welche gezielt zu einer orthogonalen Kupplung eingesetzt werden können. Der Aktivester reagiert hierbei unter Ausbildung einer Amidbindung mit primären oder sekundären Aminen und kann zur Modifizierung von Lysinen auf der Proteinoberfläche verwendet werden. Die modifizierten Proteine besitzen somit eine Maleimid funktionalisierte Oberfläche, welche in einem nächsten Schritt selektiv über den Mechanismus einer Michael-Reaktion mit Thiol modifizierter DNA umgesetzt werden kann<sup>47-49</sup> (Abbildung 5A). Die mit Thiol modifizierte DNA ist hierbei leicht synthetisch zugänglich. Ein Nachteil dieser Reaktion ist, dass die meisten Proteine eine Vielzahl von Lysinen auf ihrer Proteinoberfläche aufweisen und die Konjugation generell nicht regiospezifisch erfolgen kann. Des Weiteren werden meist mehrfach DNA konjugierte Spezies erhalten, welches wiederum mit Reinigungsschritten verbunden ist.

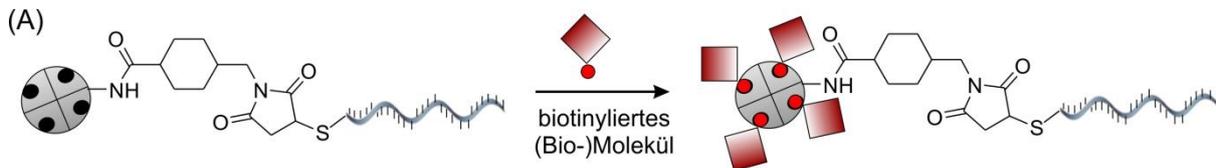


**Abbildung 5:** Kovalente Bindungsstrategien über den bifunktionellen Crosslinker sSMCC. **(A)** Kupplung eines Thiol modifizierten Einzelstranges über Maleimid modifizierte Proteinoberflächen. **(B)** Kupplung eines Maleimid modifizierten Einzelstranges über die Cysteinreste eines POI.

Die Reaktion kann auch leicht umgekehrt werden<sup>50-52</sup> (Abbildung 5B). Hierzu kann zunächst Amin modifizierte DNA mittels sSMCC umgesetzt werden und somit mit einer Maleimid Gruppe markiert werden. Die kovalente Verknüpfung mit dem Protein erfolgt anschließend über eine Michael-Reaktion zwischen der Maleimid Gruppe und den Cysteinresten auf der Proteinoberfläche. Cysteinreste sind seltener in Proteinen und die Reaktion kann somit meist regiospezifischer erfolgen. Insbesondere besitzen einige Proteine keine Cysteine, so dass die Cysteine gezielt über molekularbiologische Methoden auf den Proteinoberflächen positioniert werden können. Es muss jedoch erwähnt werden, dass speziell Cysteine oft essentiell sind (wie zum Beispiel bei Antikörpern), um die native Struktur eines Proteins aufrecht zu erhalten. Ausgebildete Cysteinbrücken zwischen zwei Proteinen müssten jedoch zunächst reduziert werden, um eine Verknüpfung zu gewährleisten, welches zu einer Destabilisierung der nativen Struktur führen könnte.

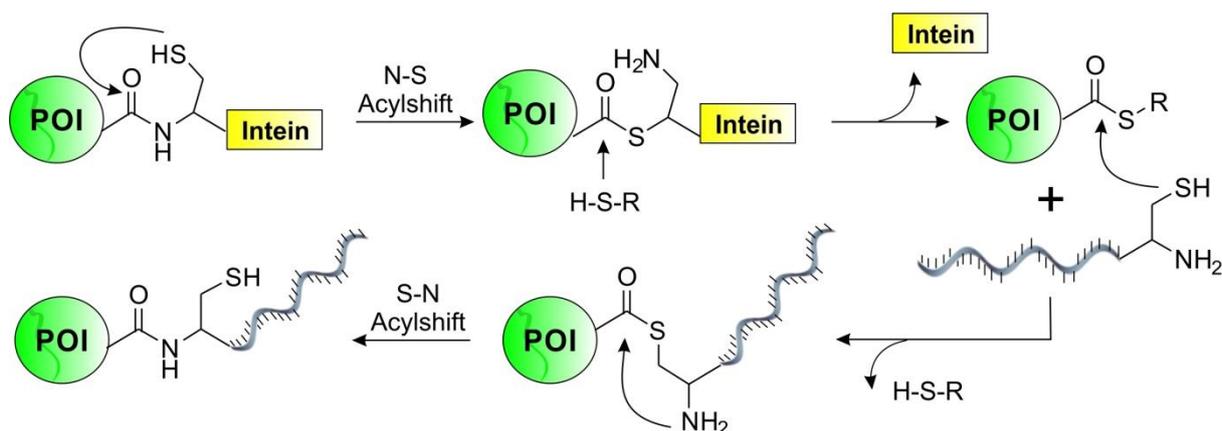
Besonders in Bezug auf die STV-Biotin Bindungsstrategie kann eine kovalente Verknüpfung mit DNA ein weites Spektrum an Anwendung bieten. Hierzu kann sSMCC zunächst dazu eingesetzt werden, um kovalente STV-DNA Konjugate zu erzeugen. Die freien

Biotinbindungsstellen können anschließend dazu verwendet werden, weitere biotinylierte Proteine zu binden<sup>53</sup> (Abbildung 6).



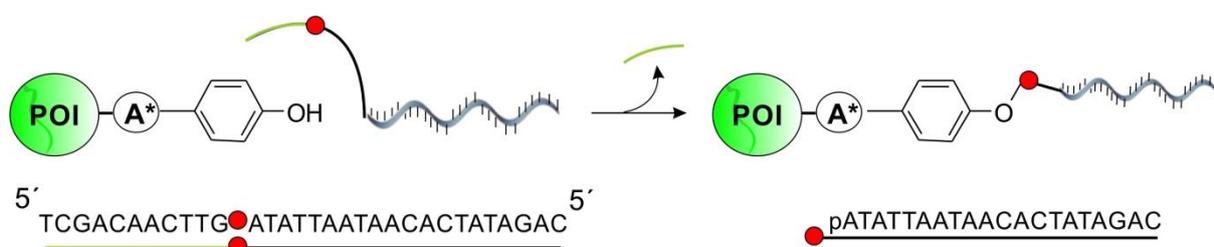
**Abbildung 6:** Kovalente Bindung zwischen DNA und STV mittels des Crosslinkers sSMCC. Die synthetisch hergestellten STV-DNA Konjugate können anschließend mit weiteren biotinylierten (Bio-)Molekülen konjugiert werden.

Weiterhin wurden zahlreiche bioorthogonale Bindungsstrategien entwickelt. Hierzu werden die POI meist mit zusätzlichen Aminosäuresequenzen oder ganzen Enzyme modifiziert. Als Beispiel kann hier die Methode der EPL („*expressed protein ligation*“) genannt werden<sup>54</sup> (Abbildung 7). Zur Herstellung von Protein-DNA Konjugaten mittels EPL wird zunächst das Protein molekularbiologisch an seinem C-terminalen Ende mit einem Intein fusioniert. Bei dem Intein handelt es sich um eine spezifische Proteindomäne, welche sich selbst über eine autokatalytische Spaltung von einem Fusionsprotein abspalten kann. Die Reaktion wird hierbei über eine N→S-Acylverschiebung katalysiert, indem das Intein einen ausgebildeten Thio-Aktivester dazu verwendet, sich selbst durch den Angriff eines weiteren Thiols von dem POI abzuspalten. Hierzu kann zum Beispiel das Molekül 2-Mercaptoethansulfonat (MESNA) verwendet werden, welches nach der autokatalytischen Abspaltung des Inteins ein Thioester am C-terminalen Ende des POI erzeugt.<sup>55-57</sup> Dieser Thioester kann anschließend mit einer Cystein modifizierten DNA reagieren, welche anschließend über einen S→N Verschiebung kovalent und regioselektiv an das POI verknüpft wird.



**Abbildung 7:** Schematische Darstellung der DNA Verknüpfung an ein POI durch Vermittlung der EPL („expressed protein ligation“).

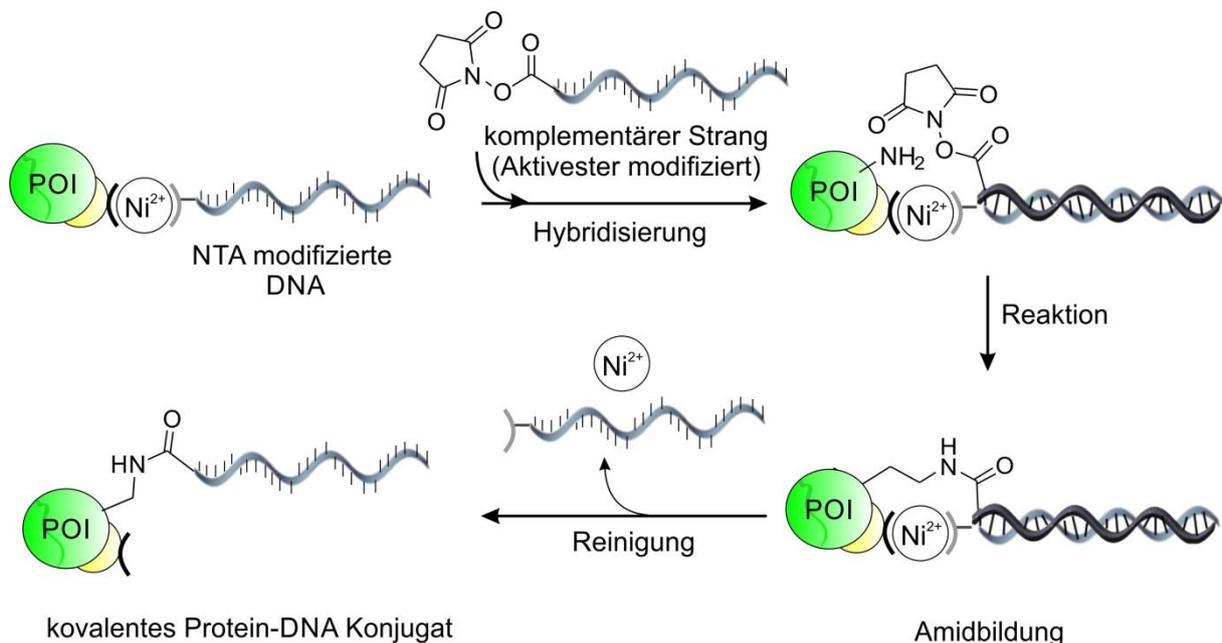
Neuerlich berichteten Kobatake *et al.* über eine weitere Fusionsmethode.<sup>58</sup> Hierzu fusionierten die Autoren die zwei Proteine EGFP („enhanced green fluorescent protein“) und FLuc („fused firefly luciferase“) mit einem Gen-A\* Protein aus der Bakteriophage phi X174. Das Gen-A\* Protein ist ein Enzym, welches eine spezifischen DNA Erkennungssequenz schneidet und ein Tyrosinrest des Gen-A\* Proteins selektiv mit der freigewordenen 5'-Phosphatgruppe der gespaltenen DNA kovalent verknüpft<sup>59</sup> (Abbildung 8). Auch in diesem Fall konnte eine regiospezifische Kupplung durchgeführt werden und hohe Ausbeuten bis zu 85 % erzielt werden.



**Abbildung 8:** Kovalente Verknüpfung eines DNA Einzelstranges mit Hilfe eines POI-Gen-A\* Fusionsproteins nach Kobatake *et al.*<sup>[58]</sup>. Die Erkennungssequenz des Gen-A\* (A\*) ist unter der Abbildung dargestellt und als Bogen der DNA angefügt worden. Die Schnittstelle des Proteins ist mit einem roten Kreis markiert worden.

Eine weitere Technik wurde im Jahre 2014 von Gothelf *et al* eingeführt.<sup>60</sup> Die Autoren machten Gebrauch von einer Methode, welche als **DNA-Templat Synthese (DTS)** bezeichnet wird.<sup>61</sup> In der DTS werden zwei reaktive Gruppen an unterschiedliche kurze Nukleotide gebunden. Diese Gruppen können in niedrigen Konzentrationen (nanomolar oder niedrigen micromolaren Bereiche) schlecht miteinander reagieren und werden über einfache Hybridisierungsprozesse in unmittelbare Nähe zueinander gebracht. Die lokale Konzentration

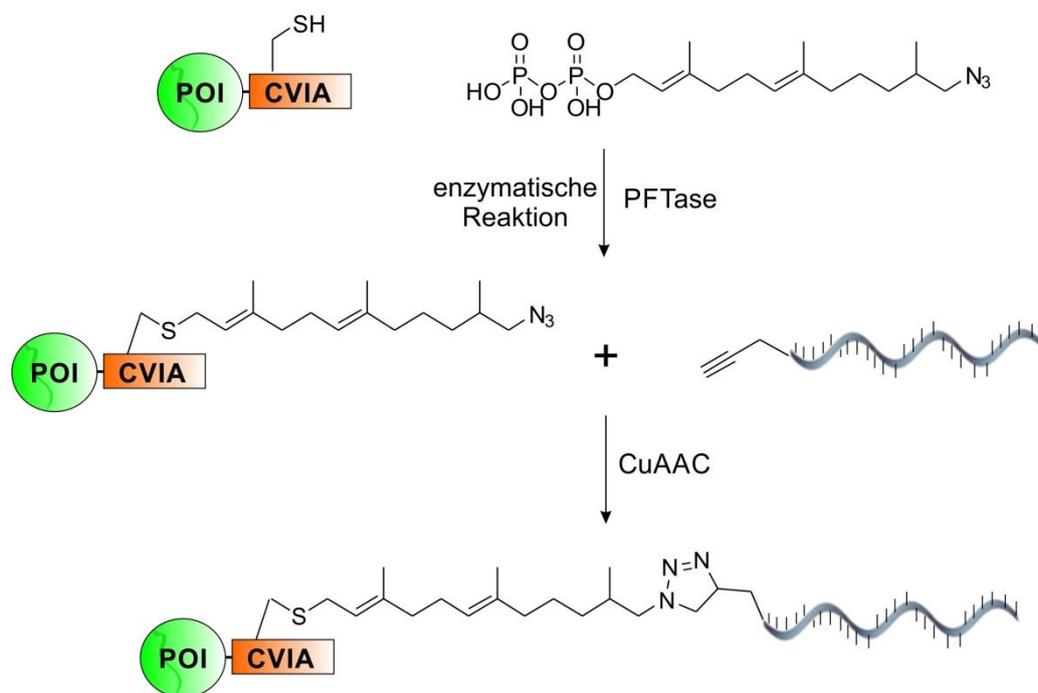
der Reaktionspartner wird somit erhöht und eine kovalente Bindung beider kann erfolgen. Um eine ähnliche Reaktion anzuwenden, fusionierten Gothelf *et al.* zunächst ein POI mit einem 6xHis Tag. Anschließend wurde ein NTA modifizierter DNA Einzelstrang über  $\text{Ni}^{2+}$  selektiv gebunden. Ein zweiter komplementärer Strang wurde mit einem Aktivester modifiziert und nach der Hybridisierung in unmittelbare Nähe der Lysine am 6xHis Tag gebracht (Abbildung 9). Die kovalente Verknüpfung zwischen DNA und POI erfolgte somit regiospezifisch in der Nähe des 6xHis Tags und konnte in niedrigen Konzentrationen (nanomolar) durchgeführt werden.<sup>60</sup>



**Abbildung 9:** Schematische Darstellung einer regioselektiven Protein-DNA Konjugation mit Hilfe des Prinzips der DNA Templat Synthese (DTS) nach Gothelf *et al.*<sup>[60]</sup>.

Weitere Technologien, welche auf eine fusionierte Modifikation des POI beruhen, sind die Verwendung des sogenannte SNAP Tags<sup>62-64</sup> zur Kupplung einer Benzylguanin modifizierten DNA<sup>65</sup> oder der Einsatz einer Protein-Farnesyl-Transferase (PFTase). Das letztere Beispiel wurde im Jahre 2007 von Duckworth *et al.*<sup>66</sup> veröffentlicht und beruht auf eine genetische C-terminale Modifizierung des POI (Abbildung 10). Hierzu wird zunächst eine vier Aminosäuren lange Erkennungssequenz (Cystein, Valin, Isoleucin, Alanin [CVIA]) an das terminale Ende des POI molekularbiologisch eingeführt. Die Erkennungssequenz wird von der PFTase erkannt und das Enzym kann dazu verwendet werden, ein mit Azid modifiziertes Farnesylpyrophosphat über eine Thioether Bindung mit dem POI zu verknüpfen. Das mit einem Azid modifizierte POI kann anschließend mit einer Alkin markierten DNA über eine

Kupfer katalysierte Huisgen Cycloaddition (CuAAC; „*copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition*“) kovalent gebunden werden.



**Abbildung 10:** Schematische Darstellung einer Protein-DNA Konjugation unter Zuhilfenahme der Protein-Farnesyl-Transferase (PFTase) nach Duckworth *et al.*<sup>[66]</sup> Das mit Azid modifizierte POI wird anschließend über eine Kupfer katalysierte Huisgen Cycloaddition (CuAAC) mit einer Alkin modifizierten DNA konjugiert.

Die postsynthetische Modifikation von DNA mittels CuAAC konnte sowohl zur Modifikation von kurzen synthetischen Oligonukleotiden als auch zur Markierung von langen Genfragmenten verwendet werden.<sup>67-69</sup> Unterschiedlichste chemische Reaktionen würden das Repertoire der synthetischen Kupplungsstrategien beträchtlich erweitern<sup>5</sup>. Aus diesem Grund suchen Forscher nach milden Reaktionen, welche eine Konjugation der beiden Biomoleküle bewerkstelligen können. Einige repräsentative Beispiele sind von Meyer *et al.* vor kurzem in einem Übersichtsartikel tabellarisch zusammengefasst worden.<sup>70</sup> Verschiedenste Reaktionen zur Modifikationen von Biomolekülen mit DNA, wie die Staudinger Ligation<sup>71</sup>, Keton-Aminoxy Reaktionen<sup>72</sup>, reduktive Aminierung<sup>73</sup> oder die Kupfer freie spannungsvermittelte 1,3 dipolare Cycloaddition (SPAAC, „*strain promoted azide-alkyne cycloaddition*“) <sup>74-76</sup>, fanden somit eine Vielfalt von Anwendung im Bereich der DNA-Biotechnologie. Auch über den Einsatz von artifiziellen Aminosäuren für eine regioselektive fotoinduzierte DNA Verbrücken wurde berichtet.<sup>77</sup> Speziell die genannte SPAAC Klick-Reaktionen könnte sich als vielversprechend herausstellen, da sie keine weiteren Reaktionskatalysatoren benötigt und

somit eine biokompatible und milde Kupplungsmethode darstellt. Lichtreaktionen hingegen würden eine zeitliche und räumliche Kontrolle der Konjugation unter milden Bedingungen sicherstellen, indem Licht als milder Katalysator zur Konjugation eingesetzt wird.

Nach der Beschreibung der ersten lichtgesteuerten Protein-DNA Konjugation<sup>78</sup> wurde dieses Gebiet weitestgehend vernachlässigt und es wurde nur vereinzelte über Lichtkonjugationsstrategien berichtet.<sup>77, 79</sup> In den letzten Jahren sind jedoch lichtgesteuerte Reaktionen zur Modifizierung von Biomolekülen wieder in den Mittelpunkt gerückt. Hierbei wurden meist kleine Moleküle als lichtsensitive und reaktive Gruppen verwendet, welche eine vielfache Anwendung im Bereich der Oberflächenmodifizierungen und für Polymerkupplungsstrategien fanden (vgl. Kapitel 2.5). Erst vor kurzem berichteten Wagenknecht *et al.* über eine lichtgesteuerte Clickreaktion zwischen DNA und einem Fluorophor<sup>80</sup>, welche über eine Nitril-Imine gesteuerte Cycloaddition von Tetrazolen mit aktivierten Alkenen (NITEC; „*nitrile imine-mediated tetrazole-ene cycloaddition*“) durchgeführt wurde. Hierzu synthetisierten die Autoren eine Tetrazol modifizierte DNA, um sie anschließend mit einem kommerziell erwerblichen Sulfo-Cy3 Farbstoff, welcher eine Maleimid Funktionalität trug, nach Anregung mit Licht kovalent zu verknüpfen. Der Reaktionstyp wurde nicht weiter für weitere Biokonjugationsstrategien eingesetzt, zeigt jedoch hohes Potential zur Herstellung von Protein-DNA Konjugaten.

Alle genannten Methoden zeigen Vor- und Nachteile hinsichtlich ihrer Konjugationsstrategie. Oft muss ausgehend vom verwendeten POI entschieden werden, welche Kupplungsmethode die effizienteste darstellt. So ist zum Beispiel die Integration von künstlichen Aminosäuren oder die Einführung von Erkennungssequenzen in das POI, wie z.B. die CVIA bzw. der 6xHis Tag, mit der Durchführung von komplexen molekularbiologischen Methoden verbunden. Die Aufreinigung von rekombinanten Proteinen kann zu hohen Ausbeuteverlusten führen, so dass die Durchführungen meist zeitaufwendig optimiert werden müssen. Weiterhin könnten einige Proteine durch die eingeführten Modifizierungen ihre enzymatische Aktivität verlieren. Als Vorteile sind hier die meist hohe Regioselektivität und die stöchiometrische Kontrolle der Konjugation zu nennen.

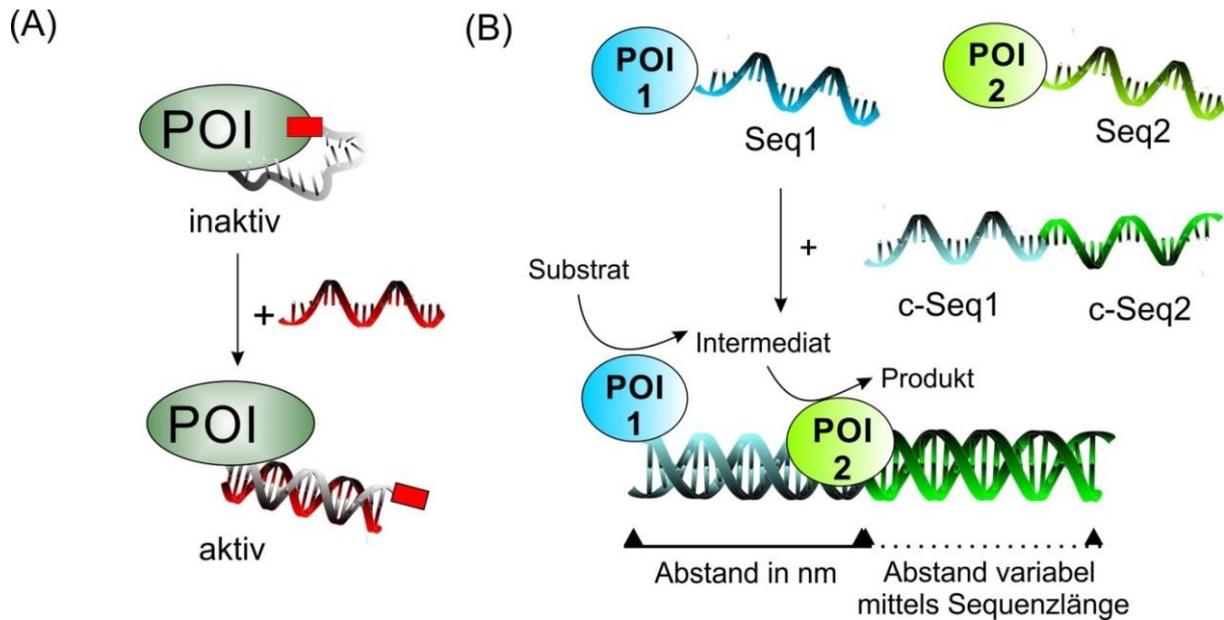
Zur Erstellung von neuen Machbarkeitsstudien könnte die Verwendung von orthogonalen Crosslinker eine effizientere Lösung darstellen. Die kleinen organischen Moleküle können schnell in organischen Laboren synthetisiert und leicht mit orthogonalen reaktiven Gruppen ausgestattet werden. Speziell zur Erforschung neuer Konjugationsstrategien zwischen DNA und natürlichen Aminosäuren könnten diese Anwendungen schnelle Ergebnisse liefern, da

keine zusätzlichen molekularbiologischen Manipulationen der POI notwendig sind. Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Arbeit grundlegend zwei neue Kupplungsstrategien analysiert, welche sich auf den Einsatz von Crosslinkern und der Modifizierung von natürlichen Aminosäuren konzentrierte.

### **2.3 Anwendungen von semisynthetischen Protein-DNA Konjugaten**

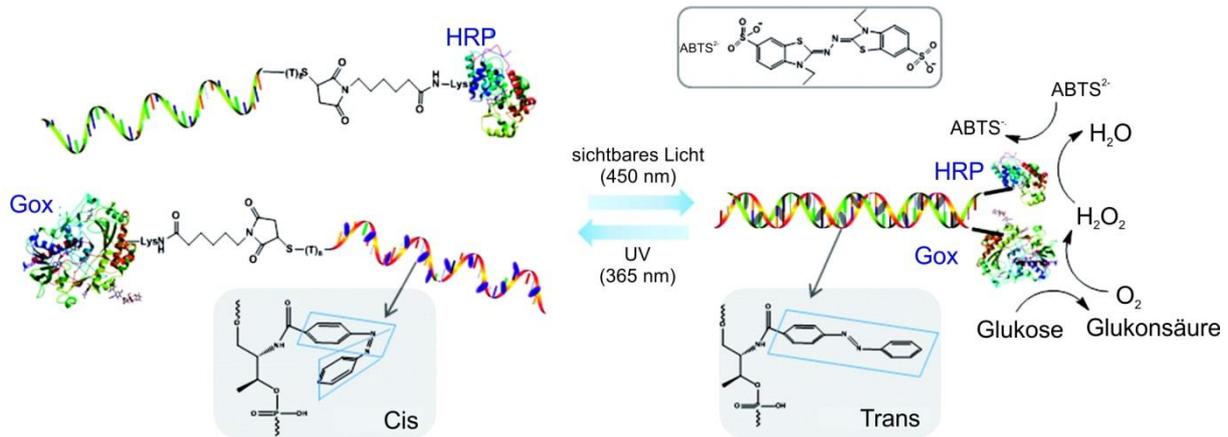
Die Protein-DNA Konjugate werden heutzutage maßgeblich in zwei großen Bereichen verwendet. Hierzu zählen bioanalytische Systeme, welche in Lösung bzw. auf der Oberfläche mittels DDI durchgeführt werden können. Eine weitere Anwendung findet sich in der Grundlagenforschung, indem die Konjugate zum Aufbau bzw. zur Dekoration von DNA-Nanostrukturen verwendet werden. Ein kurzer Überblick zur Dekoration von DNA Nanostrukturen und deren Anwendung ist in Kapitel 2.4 dargestellt.

Eine interessante Anwendung für ein bioanalytisches System wurde von Ghadari *et al.* beschrieben. Die Autoren nutzten eine Protein-DNA Konjugation zur Herstellung eines künstlichen allosterischen Mechanismus, welcher als DNA vermittelte allosterische Kontrolle bezeichnet wurde.<sup>81</sup> Die Autoren modifizierten hierzu das 3'-Ende eines Oligonukleotids mit einem Protease Inhibitor und konjugierten die DNA kovalent an das Enzym. Aufgrund der Flexibilität des DNA Einzelstranges kann der Inhibitor direkt mit dem aktiven Zentrum interagieren und die Proteaseaktivität blockieren. Durch die Zugabe eines komplementären Stranges setzt ein Hybridisierungsprozess ein, der Inhibitor wird durch die rigide Doppelstrangausbildung<sup>82</sup> aus dem aktiven Zentrum entfernt und das Enzym wird aktiv (Abbildung 11A). Während die erste Studie für eine irreversible Aktivierung des Proteins eingesetzt wurde, konnte in einer weiteren Studie ein komplexeres reversibles System aufgebaut werden.<sup>83</sup> Die Ergebnisse zeigten, dass DNA als „Modul“ zur gezielten Steuerung der Enzymaktivität eingesetzt werden kann und erschließen somit zahlreiche neue Ideen zur Konstruktion von DNA sequenz-spezifisch kontrollierbaren Biomolekülen bzw. Bioreaktoren.



**Abbildung 11:** (A) Schematische Abbildung der DNA vermittelten enzymatischen Kontrolle nach Ghadari *et al.*<sup>[81]</sup>. (B) Schematischer Aufbau einer DNA vermittelten Enzymkaskade. Durch einen Hybridisierungsprozess mit einem langen komplementären Templatstrang werden zwei POI in unmittelbarer Nähe zueinander gebracht. Der Abstand der POI kann über die verwendete Sequenzlänge gesteuert werden.

Eine weitere Anwendung ist der Aufbau von Enzymkaskaden, indem die DNA als Bindungstemplat dient.<sup>84</sup> Diese künstlichen Konstrukte können zum Beispiel dazu verwendet werden, einzelne Enzyme einer Kaskade in Nanometerpräzision untereinander zu lokalisieren. Die Abstände können leicht kontrolliert werden, indem z.B. DNA Sequenzlängen variiert werden (Abbildung 11B). Der Aufbau derartiger Nanostrukturen gewährleistet eine räumliche Nähe der POI einer Kaskade und somit eine unmittelbare Nähe der katalytischen Zentren. Die Nähe der beteiligten Enzyme erhöht die Aktivität der Kaskade, da weite Diffusionsprozesse der gebildeten Intermediate vermieden werden. Gleichartige Systeme konnten zum Beispiel für Abstandsstudien von DNA vermittelten Assemblierungen von Cytochrom P450 BM3 Subdomänen<sup>85</sup> oder für heterodimere Enzymkomplexe zwischen der Meerrettichperoxidase und der Glucose-Oxidase<sup>86</sup> verwendet werden. Die Konstruktion solcher DNA vermittelten Nanostrukturen konnten in zahlreichen komplexen Systemen angewandt werden und ein ausführlicher Übersichtartikel ist vor kurzem von Willner *et al.* veröffentlicht worden.<sup>84</sup>



**Abbildung 12:** Verwendung von Protein-DNA Konjugaten zur Herstellung einer lichtkontrollierbaren HRP/GOx Kaskade nach Tan *et al.* (Beschreibung siehe Text). Die Abbildung wurde aus Referenz [87] verändert übernommen.

Eine der meist verwendeten Enzyme zur Analyse von Machbarkeitsstudien sind die oben genannten Meerrettichperoxidase (HRP; „*horse radish peroxidase*“) und die Glucose-Oxidase (GOx)<sup>86</sup>. GOx katalysiert die Oxidation von Glukose zu Glukonsäure und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, während das gebildete H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> als Substrat für die HRP dient, um chromogene bzw. fluorogene Substrate umzusetzen. Eine interessante Anwendung wurde in diesem Zusammenhang von Tan *et al.* durchgeführt.<sup>87</sup> Die Autoren nutzten eine DNA vermittelte GOx/HRP Kaskade, indem der konjugierten DNA Strang des GOx Proteins mit einer lichtsensitiven Azobenzol Gruppe modifiziert wurde (Abbildung 12). Bei sichtbarem Licht liegt das Azobenzol in trans Konformation vor und stabilisiert die Doppelstrangausbildung beider Protein-DNA Konjugate mittels Interkalation. Die Enzyme liegen in unmittelbarer Nähe zueinander und die Enzymkaskade ist aktiv. Die Fotoisomerisierung des Azobenzols von trans- zur cis-Konformation durch Bestrahlung führt zu einer Dehybridisierung beider Stränge und verhindert somit die Kaskade.

Eine der meist verbreiteten Anwendung von Protein-DNA Konjugaten ist deren DNA vermittelte Immobilisierung (DDI) und ihre Anwendung im Bereich der Biosensorik bzw. Immundiagnostik. Als Fallbeispiel kann hier eine entwickelte Methode von Bano *et al.* genannte werden.<sup>88</sup> In diesem Fall wurde ein Protein-Nanoarray gestaltet, welches mit drei unterschiedlichen Fängeroligonukleotidsequenzen versehen wurde. Anschließend wurden zunächst STV- bzw. GOx-DNA Konjugate selektiv auf der Oberfläche immobilisiert. Der Biochip wurde mit menschlichem Serum, welches Antikörper gegen STV bzw. GOx enthielt, inkubiert. Jeder einzelne Bindungsschritt konnte mittels Rasterkraftmikroskopie verfolgt

werden, indem die topographischen Höhenveränderungen detektiert wurden. Diese Anwendung ist ein exzellentes Beispiel zur Anwendung der DDI im Bereich der immundiagnostischen Analyse, indem die Kupplungen zwischen Antikörper und Enzym leicht durch Mikroskopie charakterisiert werden kann.

Erst vor kurzem wurde eine weitere interessante Methode von Fruk *et al.* entwickelt.<sup>19</sup> In diesem Fall wurde eine Siliziumplattform mit unterschiedlich großen Nanoporen verwendet. Die Plattform wurde mit Fängeroligonukleotiden modifiziert und ein DNA-Trypsin Protease Konjugat immobilisiert. Das Trypsin kann nun gezielt Proteine verdauen und die kleinen Peptidprodukte können in den Nanoporen abgefangen werden. Die Protease kann anschließend leicht über Dehybridisierung entfernt und die einzelnen Fragmente innerhalb der Poren können mittels Massenspektroskopie analysiert werden, ohne das zeitaufwendige Reinigungsverfahren verwendet werden müssen.

Die oben genannten Beispiele zeigen, dass die DDI eine vielversprechende Methode ist, um zukünftige Anwendung sowohl in der Grundlagenforschung als auch in der Industrie sicherzustellen. Speziell zur Herstellung von Diagnostikchips oder biosensorischen Systemen zeigt sie ein hohes Potential dieser Methodik. Trotz allem besitzt die DDI einen wichtigen Nachteil. Die Immobilisierung von Biomolekül- bzw. Nanopartikel Konjugaten wird meist auf DNA modifizierten Glas- oder Goldoberflächen durchgeführt<sup>89</sup>, welche mittels sogenannten Printverfahren<sup>70, 89, 90</sup> hergestellt werden. Eine kontrollierte Immobilisierung von Biomolekül-DNA Konjugaten in einem kontrollierten Nanometerabstand ist auf diesen modifizierten Oberflächen jedoch nicht möglich. Speziell zur Herstellung von biokatalytischen Systemen, indem ein maßgeschneiderter Abstand benötigt wird, stößt dieses Prinzip grundsätzlich an seine Grenzen. Eine Lösung könnte hier die Immobilisierung von Protein-DNA Konjugaten auf DNA Nanostrukturen bieten. Speziell der Bereich der Origamitechnik hat sich hierbei als sehr vielversprechend herausgestellt. Aus diesem Grund soll das Prinzip und einige Anwendungsbeispiel im folgenden Kapitel kurz erläutert werden.

## 2.4 DNA Origami

Mit der Entdeckung der Origamitechnik<sup>29</sup> wurde das Gebiet der DNA Nanostrukturierung weitestgehend revolutioniert. Die Technik machte es möglich Biomoleküle<sup>91</sup> oder andere Komponenten wie Nanopartikel (NP)<sup>92, 93</sup> in Nanometerpräzision zu organisieren, indem 2- bzw. 3-dimensionale stabile Nanoplatfformen gezielt gefaltet und zur Adressierung verwendet werden konnten. Chemische Reaktionen und Positionierung sind auf diesen Strukturen präzise

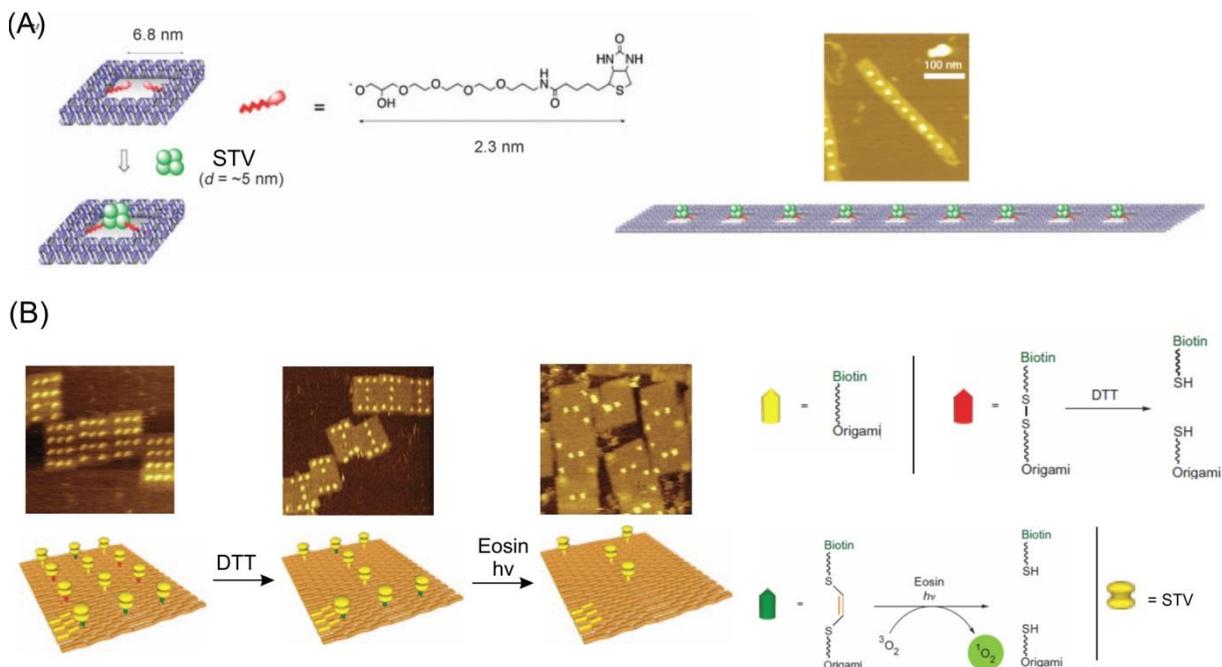
kontrollierbar und erlauben den Aufbau von zum Beispiel spezifisch gestalteten Nanofabriken<sup>94</sup> oder Nanosensoren<sup>95</sup>. In diesem Kapitel sollen nun die grundsätzlichen Vorteile dieser Technik präsentiert und einige Anwendungen erläutert werden. Aufgrund der rasant wachsenden Grundlagenforschung können nur einige grundlegende Beispiele genannt werden und es soll aus diesem Grund auf einige exzellente Übersichtsartikel verwiesen werden.<sup>94-102</sup>

Die Origamitechnik ist ein Beispiel dafür, wie eine Mischung aus natürlicher und synthetisch hergestellter DNA für eine präzise Konstruktion von Nanokonstrukten verwendet werden kann.<sup>103</sup> Als langer Gerüststrang wird vorwiegend das natürliche und kommerziell erhältliche M13Mp18 Phagengenom (ca. 7,25 kbp lang) verwendet und mit kurzen synthetisch hergestellten Helfersträngen (meist zwischen 20 bis 50 Basen lang) in eine gewünschte geometrische zwei- bzw. dreidimensionale Form gefaltet. Die Organisierung dieser Strukturen erfolgt meist durch einen einfachen Abkühlungsprozess, indem eine Mixtur beider von 90 °C auf Raumtemperatur abgekühlt wird. Hierbei wird vorwiegend ein 100facher Überschuss von Helfersträngen verwendet. Der Faltungsprozess des Gerüststranges wird durch die präzise Gestaltung der synthetischen Helferstränge ausgelöst, indem die spezifische Watson-Crick Basenpaarungen und die geometrische Formierung einer Doppelhelix berücksichtigt werden.

Wie jede architektonische Herausforderung besitzt eine Origaminanostruktur seine eigene, um die gewünschten Faltungsprozesse zu gewährleisten. Zum Beispiel werden die ausgebildeten antiparallel verlaufenden Doppelhelices innerhalb dieser Struktur über gezielt positionierte periodische Kreuzungspunkte stabilisiert, welche von den Helfersträngen während des Faltungsprozesses ausgebildet werden. Zur spezifischen Gestaltung der Helferstränge stehen heutzutage Computerprogramme wie SARSE<sup>104</sup> bzw. CaDNAo<sup>105</sup> zur Verfügung und sind frei im Internet erhältlich. Die Positionierung benachbarter Kreuzungspunkte ist verantwortlich für die Ausbildung unterschiedlichster Formen, wie etwa planarer<sup>29</sup>, hexagonaler<sup>106</sup>, oder kurvenförmiger<sup>107</sup> Strukturen. Eine Darstellung der möglichen Winkelanordnungen benachbarter Kreuzungspunkte innerhalb verschiedener Origamistrukturen ist von Sacca *et al.* in einem ausführlichen Übersichtsartikel dargestellt worden.<sup>101</sup> Weiterhin sind die Positionierungen der Kreuzungspunkte zur Ausbildung eines zweidimensionalen planaren Origamikonstruktes im Auswertungskapitel 3.3.1 ausführlich dargestellt und beschrieben.

Durch eine spezifische Gestaltung der Helferstränge können die Strukturen zusätzlich mit Fängeroligonukleotiden ausgestattet werden. Hierzu kann die folgende Regeln genannt werden: Eine vollständige helikale Drehung der natürlich vorkommender Typ B-DNA entspricht ca. 10,5 Basenpaare (ca. 3,6 nm). Nach einer vollständigen 360° Drehung befinden sich die Basen an den Endpositionen eines Stranges somit an der gleichen räumlichen Position. Eine Sequenzverlängerung der Helferstränge an einer dieser Positionen kann als Fängeroligonukleotidsequenz dienen und somit spezifisch im Raum positioniert werden. Zusätzliche chemische Modifizierungen der terminalen Endpositionen der Helferstränge machen es möglich, unterschiedlichste funktionelle Gruppen auf den Oberflächen räumlich exakt anzuordnen.

Somit zeigte sich, dass diese Technik speziell für die Nanometer präzise Immobilisierung von (Bio)-Molekül-DNA Konjugaten einen enormen Vorteil besitzt. Auch in dieser Arbeit sollte eine zweidimensionale Origamiplattform assembliert werden, um modifizierte Protein-DNA Konjugate in präzisen Abständen zu immobilisieren. Aus diesem Grund sollen zur Übersicht einige Fallbeispiele zur Anwendung der Origamitechnik aufgezeigt werden.

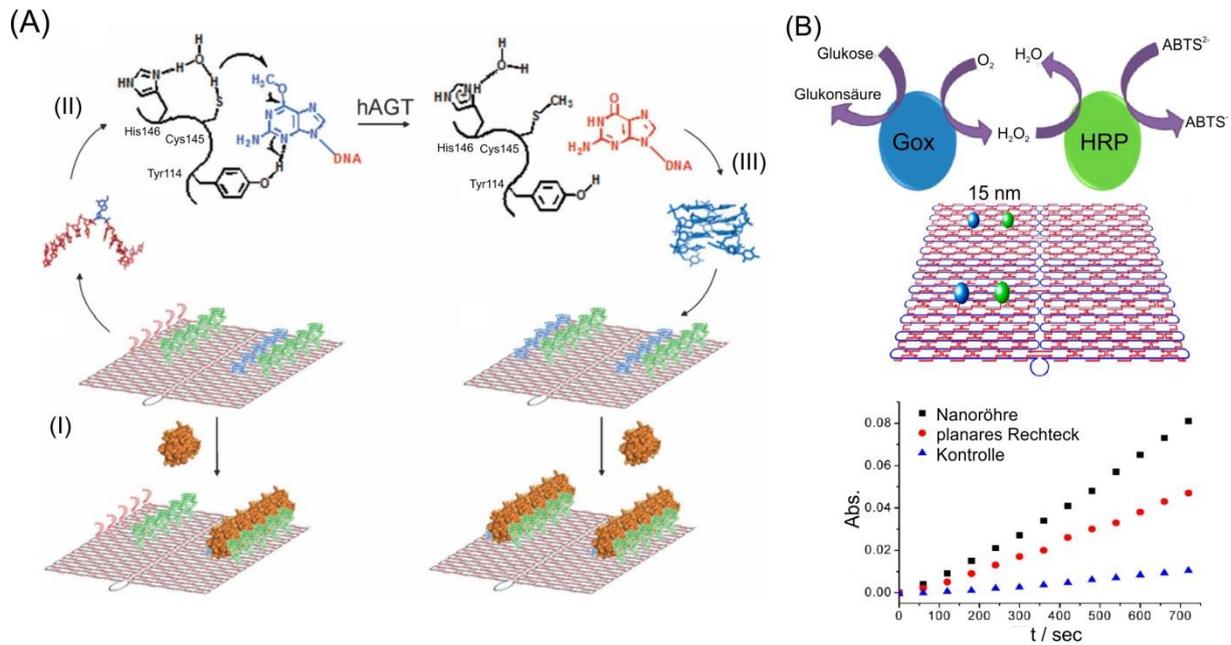


**Abbildung 13:** (A) Dekoration von DNA Origamiplattformen über ein Biotin-Streptavidin (STV) Bindung nach Kazuya *et al.*<sup>[108]</sup> (B) Orthogonale Abspaltungsstrategien von STV Molekülen von DNA Origamioberflächen nach Voigt *et al.*<sup>[110]</sup> (Beschreibungen siehe Text). Die Abbildungen wurden verändert aus Referenz [108] und [110] übernommen.

Eine der ersten angewandten Dekoration von Origamis mit Proteinen basierte auf die spezifische Bindung zwischen STV und Biotin. In diesem Zusammenhang beschrieben zum Beispiel Kazuya *et al.* die Gestaltung einer planaren Origamistruktur, welche mit periodischen Hohlräumen (6,8 x 12 x 2 nm) versehen wurde.<sup>108</sup> Die Hohlräume wurden mit Biotintriethylenglykol modifizierten Helfersträngen funktionalisiert, welche als Fängeroligonukleotide für STV dienten (Abbildung 13A). Die STV Moleküle konnten somit gezielt in Nanometerpräzision innerhalb der Hohlräume positioniert werden.

In einer späteren Studie wurde von der selben Arbeitsgruppe gezeigt, dass eine einfache Sequenzverlängerung der Helferstränge für eine stufenweise und reversible Entfernung der STV Moleküle verwendet werden kann.<sup>109</sup> Hierzu wurden die 5' biotinylierten Helferstränge zusätzlich mit einer spezifischen 3'- Sequenzverlängerung modifiziert, welche als Überhang in die Hohlräume ragten. Die STV Moleküle konnten letztendlich leicht durch eine selektive Strangverdrängung mittels eines komplementären Stranges aus den Hohlräumen entfernt werden, welches leicht mit Rasterkraftmikroskopie (AFM) charakterisiert werden konnte.

Origamiplattformen konnten ebenfalls zum Nachweis orthogonaler chemischer Reaktionen im Einzelmolekülnachweis verwendet werden, indem die Immobilisierung bzw. Abspaltung einzelner Moleküle mittels AFM detektiert wurde. Voigt *et al.* modifizierten hierzu die Helferstränge an präzisen Positionen mit Biotinmolekülen<sup>110</sup>, welche zusätzlich selektiv spaltbare Gruppen trugen, wie eine DTT reduzierbare Disulfid Gruppe oder eine elektronenreiche 1,2-bis(alkylthio)ethen Gruppe zur katalytischen selektiven Spaltung mittels Licht. Die Origamioberfläche wurde anschließend mit STV beschichtet und die orthogonalen Abspaltungsreaktionen konnten mittels AFM verfolgt werden (Abbildung 13B). Im Gegensatz wurde in der selbigen Veröffentlichung eine orthogonale chemische Beschichtung des Origamioberfläche dargestellt. Hierzu wurden zunächst STV mit speziell gestalteten Biotinmolekülen, welche mit Azid-, Alkin- bzw. Aktivester Gruppen versehen waren, konjugiert. Weiterhin wurden unterschiedliche Helferstränge mit orthogonalen funktionellen Gruppen präzise auf der Origamioberfläche lokalisiert. Die anschließende orthogonale Kupplung der STV Moleküle auf der Origamioberfläche erfolgte über eine CuAAC bzw. Amidierungsreaktion und konnte ebenfalls erfolgreich mittels AFM detektiert werden<sup>110</sup>. Diese Publikation ist ein hervorragendes Beispiel dafür, wie DNA Origamis zur präzisen Dekoration und zur Analyse chemischer Bindungsreaktionen für den Einzelmolekülnachweis verwendet werden können.



**Abbildung 14:** (A) Origamiplattform zum Nachweis der enzymatischen Reaktion von hAGT nach Tintore *et al.*<sup>[113]</sup> (I) Die Methylierung einzelner Helferstränge (rot) verhindert die Ausbildung von Quadruplexptameren (blau) und somit die Bindung von Thrombin. (II) Die methylierten Guanine der Helferstränge werden mittels hAGT behandelt. Die Alkyltransferase repariert O<sup>6</sup>-Methylguanin zu Guanin durch Abspaltung des O<sup>6</sup>-Methylrestes. (III) Nach der Reparatur können sich die Quadruplexe Formen und dienen als Aptamere zur Bindung des Thrombins. (B) Aufbau eines GOx/HRP Bioreaktors nach Fan *et al.*<sup>[119]</sup> (Beschreibung siehe Text). Veränderte Abbildungen aus Referenz [113] und [119]:

Neben den Einzelmolekülnachweisen von chemischen Reaktionen können die Origamiplattformen auch als Detektionsplattform zum Nachweis einzelner enzymatischer Reaktionen verwendet werden.<sup>111, 112</sup> Tintore *et al.* berichteten zum Beispiel über ein rechteckiges DNA Origami<sup>113</sup>, das zusätzlich mit DNA G-Quadruplexstrukturen<sup>114, 115</sup> dekoriert wurde, welche als **Thrombin Bindungsaptamere (TBAs)**<sup>116, 117</sup> wirken. Eine Modifizierung der TBAs durch eine Methylierung der Guanine innerhalb dieser Strukturen verhindert die Ausbildung der Quadruplexstrukturen auf der Oberfläche und somit die Bindung von Thrombin (Abbildung 14A). Dieses Konzept wurde dazu verwendet, die Bindungsaffinität einer O<sup>6</sup>-Alkyltransferase (hAGT) auf molekularer Ebene zu studieren. Hierbei handelt es sich um ein DNA Bindungsenzym, welches verantwortlich ist für die Reparatur von O<sup>6</sup>-Methylguanin zu Guanin<sup>118</sup> und somit zum Schutz vor Mutationen beiträgt. Um die Bindungsaffinität von hAGT zu testen, modifizierten die Autoren die Helferstränge mit einer methylierten Quadruplexsequenz und inkubierten sie vor der Origamifaltung mittels hAGT. Ist die hAGT aktiv, werden die Methylreste von dem Enzym entfernt und die Quadruplexstrukturen können sich nach der Faltung auf der Oberfläche des Origamis formen.

Die Thrombinmoleküle können letztendlich an den spezifischen Positionen binden und der gesamte Prozess konnte leicht mittels AFM quantifiziert werden. Diese Anwendung zeigt, wie die Origamitechnik als Biosensorplattform zur Analyse enzymatischer Aktivitäten verwendet werden kann.

Wie bereits in Kapitel 2.3 erläutert, können spezifisch gestaltete Bio-Hybridsysteme für Studien von Protein-Protein Interaktionen und zum Aufbau kontrollierter Bioreaktoren verwendet werden. Fan *et al.* zeigten zum Beispiel, wie GOx- bzw. HRP-DNA Konjugate für eine selektive DDI auf einem rechteckig gestalteten Origami zur Konstruktion eines Bioreaktors verwendet werden können.<sup>119</sup> Die Proteine wurden in präzisen Abständen von 15 nm immobilisiert und die enzymatische Kaskadenaktivität (vgl. Kapitel 2.3) über eine HRP/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/ABTS Reaktion durch Absorptionsmessung ermittelt (Abbildung 14B). In diesem Experiment wurde gezeigt, dass die Aktivität der immobilisierten Kaskade weitaus höher lag als die Messung in Lösung. Wie bereits in Kapitel 2.3 beschrieben, kann die erhöhte Aktivität auf einen kürzeren Diffusionsweg des gebildeten H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Intermediats durch GOx begründet werden. In der selbigen Veröffentlichung wurde ein weiteres interessantes Ergebnis erzielt. Die Autoren gestalteten spezifische Helferstränge an den oberen und unteren Kanten der Struktur, welche den rechteckigen 2-dimensionalen Bioreaktor in eine 3-dimensionale Nanoröhre faltete<sup>119</sup>. In diesem Fall konnte eine weitere Erhöhung der Kaskadenaktivität detektiert werden, indem der Diffusionsweg weiter reduziert wurde.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Origamitechnik ein breites Feld an Anwendung bietet. Speziell zur Nanometer kontrollierbarer Immobilisierung von Enzymen dient das DNA-Origami als präzise dekorierbare Immobilisierungsplattform. Die Analysen von Immobilisierungsprozessen oder chemischen bzw. enzymatischen Reaktionen können in Einzelmolekülnachweis durchgeführt werden und bieten eine Vielfalt an zukünftigen Anwendungen, wie zum Beispiel im Bereich der medizinischen Diagnostik oder zur Analyse biosensorischer bzw. biokatalytischer Systemen.

## 2.5 Lichtgesteuerte Kontrolle von Biomolekülen

Lichtgesteuerte Prozesse haben über Millionen von Jahren die biologischen Aktivitäten unterschiedlichster Organismen gelenkt und das Leben selbst forciert. Für Chemiker und Nanotechnologen ist Licht ein einzigartiges Werkzeug. Es kann Energie für verschiedenste chemische Reaktionen bereitstellen und ist in einem hohen Maße räumlich und zeitlich kontrollierbar. In den letzten Jahren ist der Einsatz von lichtgesteuerten Reaktionen speziell

im Bereich der Bionanotechnologie wieder in den Fokus der Wissenschaft geraten und es wurden unterschiedlichste Strategien entwickelt, um eine lichtinduzierte Kontrolle von Biomolekülen zu erreichen. Im Allgemeinen lassen sich diese Techniken in reversible und irreversible Strategien einteilen, welche in einer Anzahl von ausführlichen Publikationen zusammengefasst wurden.<sup>120-125</sup> Zur Kontrolle wurden meist kleine lichtsensitive organische Linker verwendet, welche nach Anregung mit Licht eine Strukturveränderung durchlaufen, indem die entsprechenden Moleküle Isomerisieren oder lichtsensitive Komponenten abgespaltet werden. Ein ausführlicher Übersichtsartikel über einige wichtige lichtaktivierbare Gruppen ist vor kurzem von Fruk *et al.* zusammengefasst worden<sup>120</sup> und einige Fallbeispiele sollen im Folgenden kurz als Übersicht erläutert werden.

Eine der meist verwendeten irreversiblen Ansätze zur lichtsensitiven Modifizierung von Biomolekülen wird als sogenannter „eingesperrter Ansatz“ (engl.: „*caging approach*“) betitelt.<sup>124</sup> Im Wesentlichen wird bei dieser Technik eine wichtige funktionelle Gruppe mit einer lichtsensitiven Schutzgruppe modifiziert, welche als eingesperrte reaktive Gruppe (engl.: „*caging group*“) bezeichnet wird. Nach Anregung mit Licht kann die lichtsensitive Gruppe selektiv entfernt und eine gewünschte Reaktion ausgelöst werden. Die eingesperrten reaktiven Gruppen fanden zunächst eine Vielzahl an Anwendung zur kontrollierten Immobilisierung von (Bio-)Molekülen auf mikro- oder nanostrukturierten Oberflächen. Piehler *et al.* zeigten zum Beispiel, wie eine modifizierte Polyhistidinpeptidkette zur kontrollierten Immobilisierung von Proteinen auf Glasoberflächen verwendet werden kann.<sup>126</sup> Die Autoren modifizierten hierzu eine Glasoberfläche mit Nitrilotriessigsäure (NTA) und bedeckten die modifizierte Oberfläche anschließend mit einem synthetisch hergestellten 6x Poylhistidinpetid, welches zusätzlich mit einer lichtabsplaltbaren 3-amino-3-(2-nitrophenyl)propionsäure Gruppe<sup>127</sup> versehen wurde. Die modifizierten Polyhistidinketten konnten selektiv an die NTA modifizierte Oberfläche binden. Nach Anregung mit Licht und unter Verwendung von Photomasken konnten die lichtabsplaltbaren Polyhistidin gezielt von der Oberfläche entfernt und die freien NTA Bindungsstellen zur selektiven Beschichtung eines Polyhistidin Tag markierten grün fluoreszierenden Proteins (GFP) verwendet werden. Eine weitere interessante Anwendung wurde in diesem Bereich von Huang *et al.* durchgeführt.<sup>128</sup> Die Forschungsgruppe modifizierten Biotinmoleküle mit einer photolabilen Methylnitropiperonyloxycarbonyl (MeNPOC) Gruppe, welche zur selektiven Bindung von STV auf Glasoberflächen verwendet werden konnte.

Neben der kontrollierten Oberflächenimmobilisierung von Proteinen haben lichtabspaltbare Gruppen speziell bei der Modifizierung von Aminosäuren eine Vielzahl von Anwendungen gefunden. Die Einführung einer reaktiven Gruppen in ein Enzym kann zum Beispiel über eine postsynthetische Modifikation von natürlichen Aminosäuren<sup>123</sup> oder über molekularbiologische Ansätze, wie zum Beispiel der Gebrauch von Intein<sup>129</sup> oder von nicht artifiziiellen Aminosäuren<sup>130</sup>, erfolgen. Deiters *et al.* modifizierten zum Beispiel eine T7 RNA Polymerase (T7RNAP), indem sie einen wichtigen Tyrosinrest im aktiven Zentrum der T7RNAP mit einer lichtsensitiven *o*-Nitrobenzol (ONB) Gruppe modifizierten.<sup>131</sup> Das eingesperrte licht-sensitive Tyrosin verhindert die Polymeraseaktivität, indem das aktive Zentrum durch sterische Hinderungen blockiert wird. Nach Anregung mit UV-Licht wird die fotolabile ONB Gruppe vom Tyrosin abgespalten und die Polymerase wird aktiv. Dieses Prinzip konnte zum Beispiel dazu verwendet werden, die Genexpression eines grün fluoreszierenden Proteins in *Escherichia coli* Zellen mittels Licht zu steuern.<sup>131</sup> Die Modifizierung von Proteinen mit der lichtsensitiven ONB Gruppe fand eine breite Anwendung zur lichtkontrollierten Steuerung unterschiedlichster Enzyme, wie z.B. Rekombinasen<sup>132</sup>, Signalkaskadenproteinen<sup>133</sup> oder Ribonukleasen<sup>134</sup>. Ähnliche lichtabspaltbare funktionelle Gruppen, wie das 6-Nitropiperonyloxymethyl (NPOM) oder 4,5-Dimethoxy-2-nitrobenzyl (DMNB), konnten ebenfalls erfolgreich zur lichtregulatorischen Modifizierung von Kinasen<sup>135</sup> bzw. Transportpetiden<sup>136</sup> verwendet werden.

Die Manipulierungen unterschiedlichster Enzyme mit lichtsensitiv abspaltbaren Gruppen zeigt, wie enzymatische Aktivitäten *in vitro* oder aber auch zellbiologische Prozesse *in vivo* gezielt mittels Licht gesteuert werden können. Dennoch besitzen diese funktionellen Gruppen einige Nachteile. Aufgrund der Abspaltung der lichtsensitiven Schutzgruppen muss für unterschiedlichste Enzymklassen getestet werden, ob die Abspaltungsprodukte keinen toxischen Effekt oder weitere Reaktivitäten aufweisen, welche eine Hemmung der Enzymaktivität oder eine Beschädigung des Zielproteins bewirken könnten. Somit kann deren Anwendungsbereich stark limitiert sein und es werden zeitaufwendige Selektionsverfahren zur Findung einer passenden funktionellen Gruppe benötigt.

Eine Lösung könnten hier reversible funktionelle Gruppen bieten, welche nach Anregung mit Licht einem Isomerisierungsprozess unterzogen werden. Die Isomerisierungsprozesse kleinerer organischer Moleküle besitzen den Vorteil, dass sie einer reversiblen Lichtkontrolle unterliegen und somit über mehrere „Runden“ in einen aktiven und inaktiven Zustand versetzt werden können. Eines der meist verwendeten Moleküle zur reversiblen lichtschaltbaren

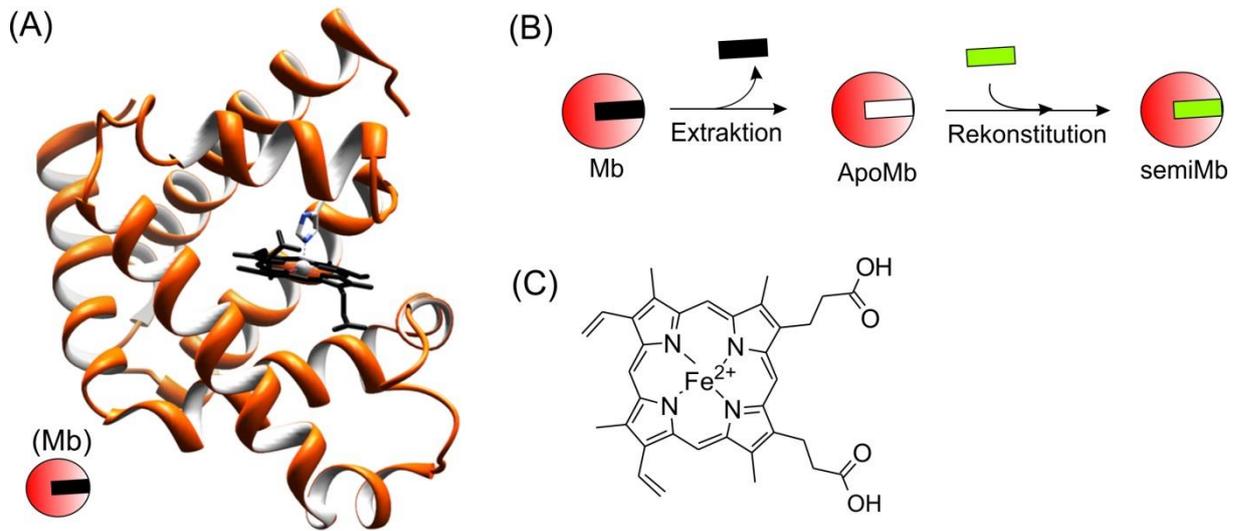
Kontrolle von Biomolekülen ist das Molekül Azobenzol. Der Isomerisierungsprozess unterschiedlicher Azobenzolderivate von trans- zu cis-Konformation konnte bereits für zahlreiche lichtgesteuerte Kontrollen von Biomolekülen eingesetzt werden und deren Anwendungen sind in zahlreichen Übersichtsartikeln dargestellt worden<sup>121, 124, 137-140</sup>.

Azobenzolderivate besitzen den Vorteil, dass sie leicht fein abgestimmt werden können. Unterschiedlichste Substitutionsmuster des Azobenzols können einen erheblichen Effekt auf die Lebenszeiten der trans- bzw. cis- Konformation haben und ebenfalls einen unterschiedlichen Effekt auf die Konformationsänderungen in polaren oder unpolaren Lösungsmittel ausüben. Des Weiteren können zusätzliche Substitutionen die Anregungswellenlängen verschieben und somit frei gestaltbar machen. Ein ausführlicher Überblick über die Gestaltung der Azobenzolderivate zur lichtinduzierten Kontrolle ist von Wolley *et al.* in einem ausführlichen Übersichtsartikel dargestellt worden.<sup>121</sup>

Auch in dieser Arbeit war eines der Ziele, die Grundbausteine für ein größeres Forschungsprojekt bereitzustellen, welche zum Aufbau eines fotoaktivierbaren Bioreaktors verwendet werden können. Das Zukunftskonzept sieht vor, das Protein Myoglobin (**Mb**) mit einem fotoaktivierbaren Azobenzolderivat zu modifizieren, welches erlaubt das Enzym **Mb** in einen aktiven und inaktiven Zustand zu schalten, indem Licht als Impuls dient. Für das nähere Verständnis soll im Folgenden das Konzept kurz erläutert werden:

Das Protein **Mb** zählt zu den Hämproteinen, welche in ihrem aktiven Zentrum eine prosthetische Hämgruppe (Protoporphyrin IX) tragen (vgl. Abbildung 15). Das Protoporphyrin wird im aktiven Zentrum des Myoglobins sowohl über hydrophobe Interaktionen zwischen unpolaren Aminosäuren und dem Porphyrinring als auch über einen distalen Histidinrest (His93)<sup>141, 142</sup>, welcher über den Fe<sup>2+</sup> Kern des Häms koordiniert wird, stabilisiert (vgl. Abbildung 15A). Auch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem distalen Histidin Rest und Wassermolekülen scheinen einen erheblichen Effekt auf die Koordination des Protoporphyrins im aktiven Zentrum zu haben.<sup>143</sup> Die Häm Gruppe verleiht dem Protein eine Vielfalt an Aufgaben. Hierzu zählen zum Beispiel die Fähigkeiten Sauerstoff bzw. Elektronen zu transportieren.<sup>144</sup> Des Weiteren besitzt **Mb** eine Peroxidasefunktion<sup>145</sup>, welches dem Enzym ermöglicht unterschiedlichste Substrate in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid zu oxidieren.<sup>145, 146</sup> Der native Kofaktor lässt sich leicht in einem Prozess, welcher als Extraktion bezeichnet wird, entfernen und das gebildete Apo Myoglobin (ApoMb) durch synthetisch hergestellte Häm Derivate rekonstituieren (vgl. Abbildung 15B). Dies machte das

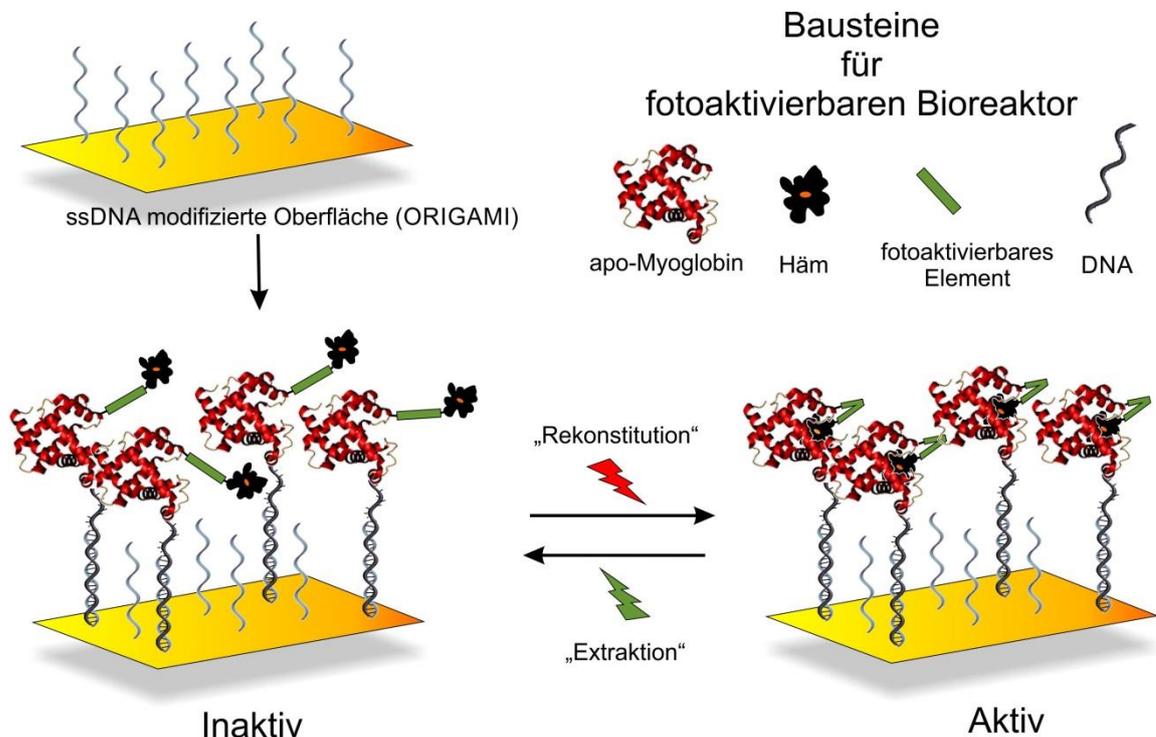
Enzym **Mb** zu einem interessanten Modelprotein für unterschiedlichste Anwendungen im Bereich der Bionanotechnologie.<sup>41</sup>



**Abbildung 15:** (A) Darstellung der Tertiärstruktur des nativen Myoglobins. Die Abbildung wurde mittels des Computerprogramms Chimera erstellt, indem die pdb Daten 1VXH der Proteindatenbank verwendet wurden. Das im aktiven Zentrum koordinierte Protoporphyrin IX (Häm-Kofaktor) ist schwarz dargestellt. Hierbei ist die wichtige Bindung zwischen des  $\text{Fe}^{2+}$  Kerns (weiße Kugel) und dem distalen Histidin (His93) über eine gestrichelte Linie dargestellt. (B) Schematische Abbildung der Extraktion des nativen Kofaktors (schwarz) und die anschließende Rekonstitution des ApoMb mit einem synthetischen Protoporphyrin IX (grün). (C) Struktur des Kofaktors Häm.

Das Zukunftskonzept sieht vor, dass Protein **Mb** mit einem Azobenzolderivat als fotoaktivierbares Element zu modifizieren, welches den Kofaktor Häm und das Protein kovalent verknüpft (vgl. Abbildung 16). Die cis-trans Konformationsänderung des Azobenzolderivats soll den Kofaktor Häm aus und in die aktive Tasche bewegen, welches das Protein in einen aktiven und inaktiven Zustand versetzt. Befindet sich der Kofaktor innerhalb des aktiven Zentrums, kann das Protein Mb unterschiedlichste Substrate in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid oxidieren, wobei der Prozess mittels herkömmlich verwendeten Peroxidaseassays verfolgt werden kann. Zur Durchführung eines solchen Konzeptes müssen unterschiedliche Kriterien beachtet werden. Zunächst muss das Azobenzolderivat zwei orthogonale funktionelle Gruppen tragen, welche das Derivat als Crosslinker einsetzbar macht. Hierbei kann die Kupplung des Azobenzolderivats an das Häm leicht über eine Amidierungsreaktion erfolgen, indem zum Beispiel primäre Amine als funktionelle Gruppe zur Modifizierung der Carboxylgruppen des Häms verwendet werden (Abbildung 15C). Zur kovalenten Knüpfung des Derivats auf die Proteinoberfläche müssen jedoch mehrere

Herausforderungen beachtet werden. Die Position der Oberflächenkupplung muss in einem kontrollierten Abstand und regioselektiv zum aktiven Zentrum erfolgen, um nach einer lichtinduzierten Konformationsänderung des Azobenzols die Rekonstitution des Häm in die aktive Tasche zu gewährleisten. Auch in diesem Fall scheint das Protein Mb ein ideales Modelprotein zu sein, da es keine Cysteinreste in seiner primären Aminosäurestruktur aufweist. Somit kann ein Cystein gezielt auf der Oberfläche über molekularbiologische Methoden positioniert werden. Die Cysteine können anschließend dazu verwendet werden, ein mit Maleimid funktionalisiertes Azobenzolderivat regioselektiv über eine Michaelreaktion zu binden. Aus diesem Grund war eines der Ziele, eine molekularbiologische Methode in den Arbeitskreis zu integrieren, welches eine Herstellung von Cystein-Myoglobin Mutanten ermöglicht.



**Abbildung 16:** Schematische Abbildung des Zukunftskonzepts eines fotoaktivierbaren Myoglobins, dass mittels DDI auf eine DNA modifizierte Origamioberfläche immobilisiert wurde.

Eine weitere Herausforderung stellt hierbei eine Durchführung des Konzepts in Lösung dar. Bereits in älteren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass kovalent konjugiertes Häm zu einer Polymerisierung der Proteine führen kann.<sup>147, 148</sup> Speziell in der inaktiven ApoMb Form könnten die auf der Proteinoberfläche konjugierten Kofaktoren zu einer Verkettung führen und würden eine Anwendung des Konzeptes in Lösung erschweren. Aus

diesem Grund soll in Zukunft versucht werden, dass Azobenzol modifizierte **Mb** zusätzlich mit DNA zu konjugieren, um eine Immobilisierung des Proteins auf Oberflächen zu gewährleisten. Hierbei ist es wichtig zu beachten, dass die immobilisierten Proteine einen maßgeschneiderten Abstand voneinander einnehmen, um speziell im inaktiven Zustand eine Interaktion der Kofaktoren mit benachbarten **ApoMb** zu verhindern. Eine Lösung könnte hier die bereits beschriebene Origamitechnik darstellen. Wie bereits in Kapitel 2.4 erläutert, können bei dieser Technik die Proteine in Nanometer präzisen Abständen voneinander positioniert werden und eine Interaktion der **ApoMb** mit benachbarten Häm Kofaktoren somit verhindert werden. Aus diesem Grund sollte ebenfalls die Origamitechnik in den Arbeitskreis etabliert werden, um eine kontrollierte Immobilisierung der modifizierten **Mb** für zukünftige Anwendung zu gewährleisten.

## 2.6 Aufgabenstellung

Einer der Hauptziele der Arbeit bestand darin, neue Protein-DNA Konjugationsstrategien zu entwickeln, wobei die Konjugation von DNA Einzelsträngen an das Protein Myoglobin im Mittelpunkt stand.

Lichtreaktionen zur Herstellung von Protein-DNA Konjugaten könnten das Repertoire der Konjugationsstrategien beträchtlich erweitern, da sie eine räumliche und zeitliche Konjugationskontrolle unter milden Bedingungen gewährleisten. So sollte in dieser Arbeit erstmals ein kurzer DNA Einzelstrang mit einem Photoenolderivat modifiziert werden, welches eine lichtinduzierte Protein DNA Konjugation mit einem Maleimid modifizierten Myoglobin über eine lichtgesteuerte Cycloaddition ermöglichen sollte.

In einer zweiten Strategie sollte eine Modifikation der natürlichen Aminosäure Tyrosin durchgeführt werden. Hierzu sollten unterschiedliche bifunktionelle Crosslinker hinsichtlich ihrer Kupplungseffizienz analysiert werden und eine Konjugation von Protein und DNA über eine Michael Reaktion, Kupfer katalysierte bzw. Kupfer frei spannungsvermittelte Cycloaddition erfolgen.

Des Weiteren sollten einige Grundbausteine zur Herstellung eines fotoaktivierbaren Bioreaktors bereitgestellt werden. Hierzu sollte zunächst das Gebiet der Origamitechnik etabliert und ein rechteckiges Origami gestaltet, charakterisiert und mittels Fängeroligonukleotiden modifiziert werden. Das modifizierte Origami sollte anschließend zur Immobilisierung der synthetisierten Myoglobin-DNA Konjugate verwendet werden. Zusätzlich sollte eine Klonierungsstrategie entwickelt werden, welche eine Klonierung von

Cystein-Myoglobinvarianten und die Einführung von Affinitätstags zur Reinigung gewährleistet. Die Cysteine sollten hier maßgeschneiderte Abstände zum aktiven Zentrum des Proteins besitzen, um eine zukünftige Modifizierung mittels Azobenzolderivate zu gewährleisten.

Unter anderem sollte ein Klonierungsverfahren entwickelt werden, welches eine Herstellung von Fusionsproteinen sicherstellt.

### **3 Ergebnisse und Diskussion**

#### **3.1 Die lichtinduzierte Protein-DNA Konjugation**

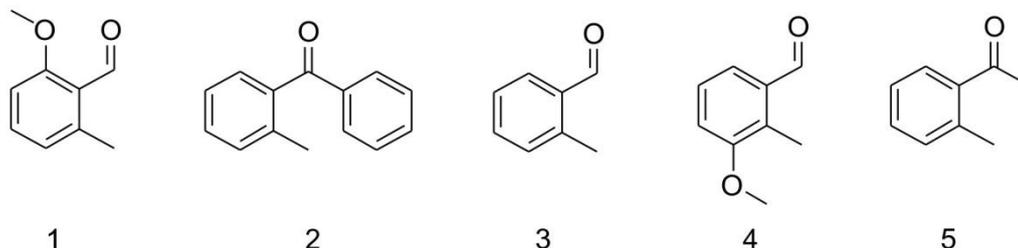
Wie bereits in der Einleitung erwähnt, ist die DNA vermittelte Immobilisierung (DDI) von Proteinen-DNA Konjugaten eine vielversprechende Methode, um neue bio-inspirierte katalytische Systeme zu erschaffen.<sup>19, 20, 70, 149, 150</sup> Für die Anwendung dieser Strategie müssen neben verschiedenen Methoden zur DNA-Modifizierung von Oberflächen, auch die Synthesen von Protein-DNA Konjugaten unter milden Bedingungen bewerkstelligt werden, welches sich bis zum heutigen Tage als eine große Herausforderung darstellt. Neue Kupplungsstrategien könnten eine regioselektive und orthogonale Dekoration von Proteinen mit DNA gewährleisten und zahlreiche Konzepte für zukünftige Verwendungen sicherstellen.<sup>7</sup>

In dem nun vorliegenden Kapitel wird ein neues Anwendungskonzept erläutert, welches als bioorthogonale Modifizierungsstrategien zur Herstellung von Protein-DNA Konjugaten angewendet werden kann.<sup>151</sup> Als Zielproteine wurden das kommerziell erwerbliche Protein Myoglobin (**Mb**) vom Pferdeherz verwendet, welches bereits in älteren Studien für ausführliche Protein-DNA Konjugationsstudien verwendet werden konnte.<sup>42, 46</sup> Das Konzept basiert auf einer lichtinduzierten [2+4] Cycloaddition, welche bereits zur irreversiblen Herstellung von Polymer-Polymer Konjugaten und für milde Ligationsreaktionen an Oberflächen verwendet wurde.<sup>152-154</sup> In diesen Reaktionen wurden als funktionelle Gruppe spezifische gestaltete Photoenole verwendet (sogenannte eingeschlossene reaktive Diene, engl: „*caged reactive dienes*“), welche nach Anregung mit Licht hoch reaktive o-Chinodimethan Intermediate bilden. Die Intermediate reagieren innerhalb von Minuten bei Raumtemperatur mit zahlreichen Dienophilen, wie z.B Maleimiden, nach einer strikten Reaktionsabfolge durch Rearomatisierung zu quantitativ hohen Produktausbeuten. Das Konzept einer lichtinduzierten Reaktion ermöglicht neben einer neuen Konjugationsstrategie, eine zeitliche und räumliche Kontrolle<sup>120, 124</sup>, welches einen hohen Vorteil zu herkömmlichen verwendeten chemischen Methoden in sich birgt. Besonders in Bezug auf die selektive und milde Dekoration von DNA-Nanostrukturen<sup>31, 101</sup> könnte dieses Konzept neue Anwendungen sicherstellen.

##### **3.1.1 Das Prinzip der lichtinduzierten Protein-DNA Konjugation**

Die lichtinduzierte Herstellung von Protein-DNA Konjugaten wurde in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Barner-Kowollik (Karlsruher Institut für Technologie) durchgeführt. In der Arbeitsgruppe konnten verschieden gestaltete Photoenolderivate für

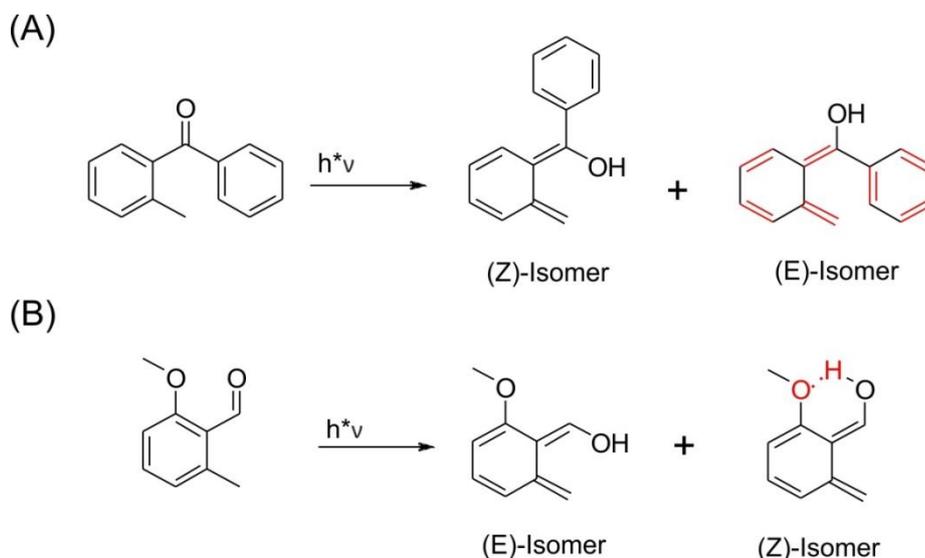
lichtinduzierten Reaktionen zur Verknüpfung von Polymer Bausteinen verwendet und hinsichtlich ihrer Reaktivität untersucht werden.<sup>155, 156</sup> In Abbildung 17 sind einige der untersuchten Photoenolderivate dargestellt.



**Abbildung 17:** Strukturen unterschiedlichster Photoenolderivate für die lichtinduzierte [2+4] Cycloaddition. (1) 2-Methoxy-6-methylbenzaldehyd, (2) 2-Methylbenzophenon, (3) 2-Methylbenzaldehyd, (4) 3-Methoxy-2-methylbenzaldehyd und (5) 2-Methylacetophenon.<sup>155, 156</sup>

In den Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass die Derivate 2-Methoxy-6-methylbenzaldehyd **1** (sogenannte FMP-Derivate; 2-Formyl-3-methylphenoxy) und Methylbenzophenon **2** die besten Ergebnisse erzielten, wobei in folgenden Vergleichsstudien bei den FMP-Derivaten **1** eine höhere Reaktivität verifiziert werden konnte.<sup>154</sup> Als Begründung wurden unterschiedliche Erklärungen aufgeführt. Während die Reaktivität der Methylbenzophenonderivate **2** durch konjugierten Doppelbindungen in der (E)-Konfigurationsisomerie begünstigt werden, weisen die FMP-Derivate **1** eine stabile intramolekulare H-Brücke in der (Z)-Anordnung auf (Abbildung 18A und B), welche eine erhöhte Lebenszeit gewährleistet und somit eine erfolgreichere Reaktivität gegenüber Dienophilen begründet. Das FMP-Derivate konnte anschließend für unterschiedlichste Polymerligationen eingesetzt werden.<sup>153,</sup>

154

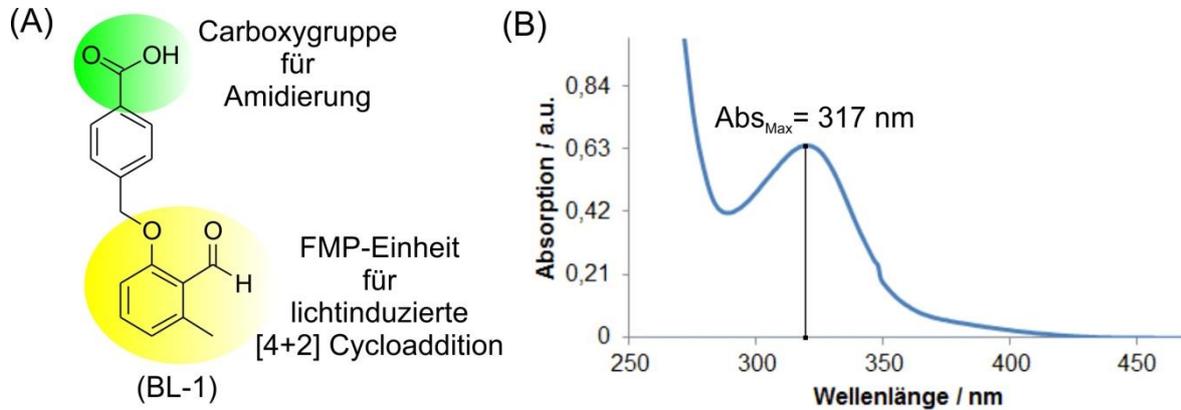


**Abbildung 18:** Photoenolisierungsprozess des (A) 2-Methylbenzophenons und des (B) 2-Formyl-3-methylphenoxy Derivats (FMP-Derivat) und dessen Stabilisierungen. Die stabilisierenden Effekte durch konjugierte Doppelbindungen (A) bzw. intramolekulare Wasserstoffbrücken (B) sind rot dargestellt.

Neben einer hoch reaktiven funktionellen Gruppe ist für die Konjugation von Biomolekülen der Lösungsmittelleffekt einer Reaktion von großer Bedeutung, da Biomoleküle (wie Proteine) nur in polaren Lösungsmitteln ihre native Struktur aufrecht erhalten können. In Untersuchungen der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Barner-Kowollik konnte bereits gezeigt werden, dass eine Verwendung von Acetonitril zu einem schnellen Umsatz mit hoher Produktausbeute führt.<sup>155, 156</sup> In einer späteren Veröffentlichung wurde nachgewiesen, dass neben Acetonitril auch polares Lösungsmittel wie Wasser für die lichtinduzierte Reaktion der FMP-Derivate verwendet werden kann, jedoch für einen erfolgreichen Umsatz eine höhere Bestrahlungszeit von 12 h benötigt wird.<sup>154</sup> Diese Ergebnisse motivierten dazu, die lichtinduzierte [2+4] Cycloadditionsreaktion auf die Herstellung von Protein-DNA Konjugaten zu übertragen.

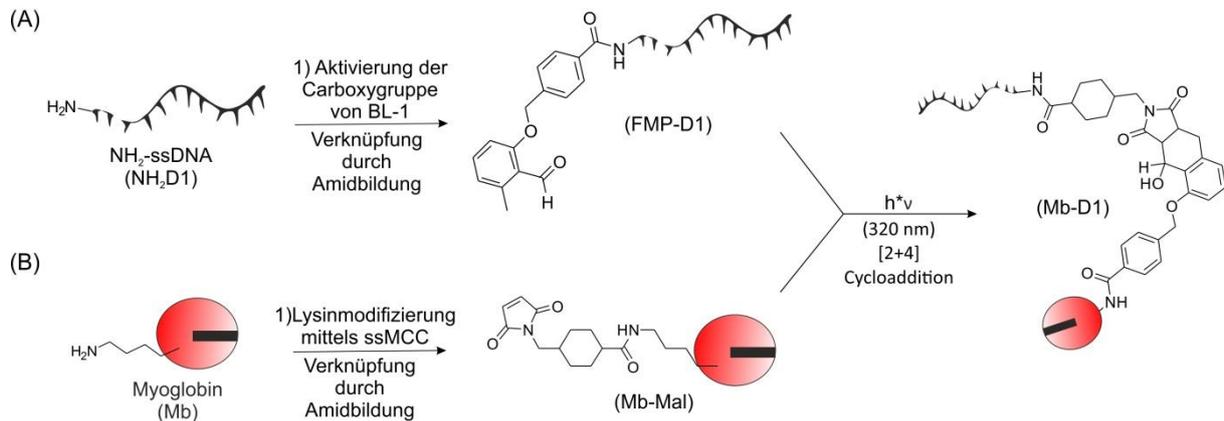
Wie bereits in der Einleitung erwähnt, sind heterobifunktionelle Linker (BL) zur Herstellung von Protein-DNA Konjugaten ein wichtiges „Hilfsmittel“, da sie aufgrund ihres orthogonalen reaktiven Charakters als intramolekulare Brücke für Konjugationsstrategien verwendet werden können (vgl. Kapitel 2.2.2). Daher wurde das FMP-Derivat 4-((2-Formyl-3-methylphenoxy)methyl)-benzoesäure (BL-1) verwendet (Abbildung 19), welches von Lukas Stolzer (AK Fruk, Karlsruher Institut für Technologie) synthetisiert und zur Verfügung gestellt wurde. Dieses Derivat besitzt eine orthogonale bi-Funktionalität, wobei einerseits die Carboxylgruppe für Amidierungsreaktionen und andererseits die FMP Einheit für die lichtgesteuerte [2+4] Cycloaddition mit Dienophilen eingesetzt werden kann. Die Struktur des

orthogonalen Linkers und das Absorptionsverhalten sind in Abbildung 19 dargestellt. Das spezifische Absorptionsverhalten konnte zur späteren Charakterisierung eines FMP modifizierten DNA-Einzelstranges (ssDNA) eingesetzt werden (siehe Kapitel 3.1.3).



**Abbildung 19:** (A) Struktur und orthogonale Funktionalität des **FMP**-Derivats 4-((2-Formyl-3-methylphenoxy)methyl)benzoesäure als heterobifunktionaler Linker **BL-1**. (B) Absorptionsspektrum des **FMP**-Derivats mit einem Maximum bei 317 nm.

Das in diesem Kapitel vorgestellte Konzept basierte auf die Herstellung eines FMP modifizierten DNA Einzelstranges (**FMP-D1**), welcher über die Verknüpfung einer Amidbindung zwischen 5'-Amin modifizierter ssDNA (**NH<sub>2</sub>D1**) und der aktivierten Carboxygruppe des FMP-Derivats (**BL-1**) hergestellt werden konnte (Abbildung 20A). In einem weiteren Schritt konnte für die lichtinduzierte Konjugation ein mit Maleimid funktionalisiertes Myoglobin (**Mb-Mal**) eingesetzt werden (Abbildung 20B). Die Maleimid Funktion wurde über Lysinmodifizierungen des Myoglobins mittels des bifunktionalen Linkers sSMCC eingeführt (vgl. Kapitel 2.2.2) und konnte anschließend als Dienophil zur lichtinduzierten Konjugation mit der FMP modifizierten DNA eingesetzt werden.



**Abbildung 20:** Allgemeine Darstellung der lichtinduzierten Protein-DNA Konjugation über FMP modifizierte ssDNA und Maleimid modifiziertes Myoglobin. **(A)** Schematische Darstellung der Amin modifizierten ssDNA mit dem bifunktionellen Linker **BL-1**. **(B)** Schematische Darstellung der Oberflächenmodifizierung des nativen Myoglobins (**Mb**) mittels des heterobifunktionellen Linkers **sSMCC**. Die beiden modifizierten Komponenten können in einem letzten Schritt über eine lichtinduzierte [2+4] Cycloaddition nach Anregung bei 320 nm konjugiert werden.

Zur Durchführung der in diesem Kapitel angewandten Experimente wurden unterschiedliche ssDNA Moleküle von der Firma Sigma erworben (Tabelle 1). Für die Kupplung des FMP-Derivats wurde eine 12 Basen lange 5'-Amin modifizierte ssDNA verwendet, die im Folgenden als **NH<sub>2</sub>D1** bezeichnet wird. Eine komplementäre ssDNA Sequenz (**cD1**) wurde für einen Bestrahlungstest eingesetzt, wobei die komplementäre ssDNA sowohl für einen Hybridisierungstest mit dem Fluorophor TAMRA 5'-markiert (**cD1<sub>TAMRA</sub>**) als auch zur Anwendung als Fängeroligonukleotid für eine DNA direkte Immobilisierung 5'-biotinyliert (**bcD1**) zur Verfügung stand. Um einen Vergleich zwischen der lichtinduzierten und einer herkömmlichen chemischen Konjugation durchzuführen, wurde das Maleimid funktionalisierte Myoglobin (**Mb-Mal**) zusätzlich mit einer 5'-Thiol modifizierten ssDNA **D1 (SH-D1)** über eine Michael-Reaktion konjugiert.

**Tabelle 1:** Bezeichnungen, Sequenzen und 5'-Modifizierungen der verwendeten Einzelstränge für die experimentellen Analysen der lichtinduzierten und chemischen Konjugationen von Myoglobin-DNA Konjugaten.

Bezeichnung	Sequenzen und 5'-Modifizierungen
NH <sub>2</sub> -D1	5'-[AminoC6]GGCGTATAACAA-3'
SH-D1	5'-[ThioC6]GGCGTATAACAA-3'
cD1	5'-TTGTTATACGCC-3'
cD1 <sub>TAMRA</sub>	5'[TAMRA]TTTTTTTGTATACGCC-3'
bcD1	5'[Biotin]TTTTTTTGTATACGCC-3'

Aufgrund des beschriebenen Lösungsmittelfektes auf die Reaktivität des FMP-Derivats und somit auf die Reaktionsdauer der Photoenolreaktion<sup>154</sup>, wurde zunächst der Einfluss des Lösungsmittels auf das verwendete Modelprotein Myoglobin untersucht. Des Weiteren musste die Bestrahlungsstabilität der Biomoleküle überprüft werden.

### 3.1.2 Lösungsmiteleinfluss und Bestrahlungsstabilität

Während aprotische Lösungsmittel, wie Acetonitril, einen stabilisierenden Effekt auf das Z-Isomer des FMP-Derivats ausüben, indem die intramolekulare H-Brückenbindung stabilisiert wird, zeigen protische Lösungsmittel, wie Wasser, eher einen negativen Effekt auf die Stabilisierung der H-Brücke, welches mit einer erhöhten Reaktionsdauer und niedrigeren Lebenszeit verbunden ist.<sup>154</sup> Um eine erfolgreiche Reaktion unter optimalen Bedingungen zu gewährleisten, steht neben der Reaktivität des FMP-Derivats jedoch die Stabilität des Myoglobins in unpolaren Lösungsmitteln. Da Proteine in aprotischen Lösungsmitteln ihren hydrophoben Kern entfalten und denaturieren, musste in einer ersten Untersuchung getestet werden, inwieweit der aprotische Anteil zur Reaktivität des FMP-Derivats erhöht werden kann, ohne dass das Protein denaturiert vorliegt. Zur Untersuchung wurde die rötliche Färbung des nativen Proteins in Lösung beobachtet (Konzentrationen über 100 µM), welche durch die Komplexierung des Kofaktors Häm hervorgerufen wird und deutlich mit bloßem Auge erkannt werden kann. Eine Präzipitation des Myoglobins hat ein rot/schwarzes Pellet zur Folge, welches durch die Häm Extraktion und die damit verbundene Entfaltung und Destabilisierung des Proteins verursacht wird. Um die Stabilität des Proteins zu testen, wurde Myoglobin in einer Mischung aus polaren und aprotischen Lösungsmittel in unterschiedlichen Verhältnissen über Nacht inkubiert und nach Zentrifugation makroskopisch in Bezug auf dessen Niederschlagsbildung analysiert. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 2 dargestellt.

**Tabelle 2:** Qualitative Analyse des Lösungsverhaltens von Myoglobin in PBS-Puffer (pH=7,4) mit unterschiedlichen Anteilen an Acetonitril. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei Raumtemperatur.

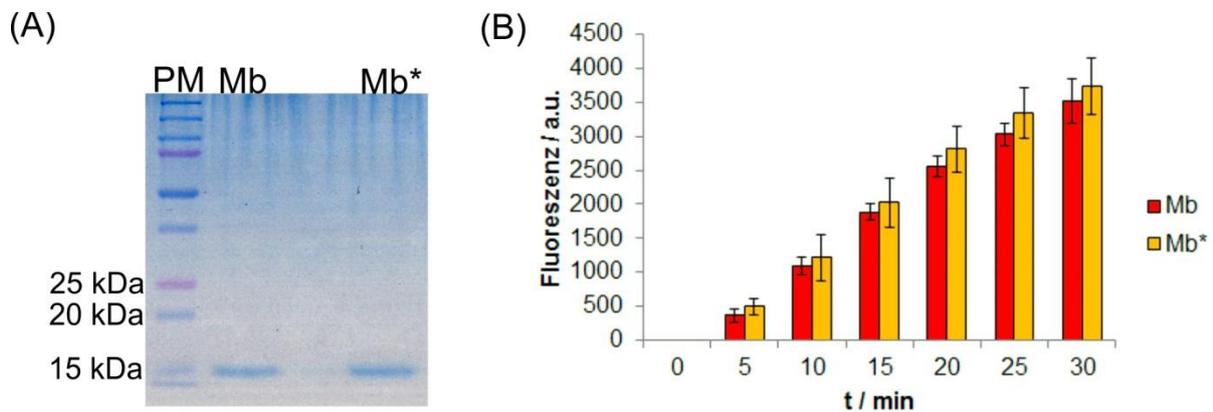
Probe	Verhältnis (PBS: Acetonitril)	Niederschlagsbildung
1	5:1	nicht sichtbar
2	3:1	nicht sichtbar
3	1:1	nicht sichtbar
4	1:3	stark
5	1:5	stark

In Probe 4 konnte bereits nach unmittelbarer Zugabe eines dreifachen Überschusses an Acetonitril ein rot/schwarzer Niederschlag beobachtet werden, welcher auf die Destabilisierung der Hydrathülle des Proteins und die damit verbundene Präzipitation bzw. Denaturierung des Proteins zurückzuführen ist. Des Weiteren konnte beobachtet werden, dass bei einem Acetonitrilanteil bis zu 50 % (Proben 1-3) keine Niederschläge auftreten und davon ausgegangen werden kann, dass die native Struktur des Myoglobins nicht beeinflusst wird und somit die Funktionalität des Proteins erhalten bleibt. Da ein erhöhter aprotischer Anteil des Lösungsmittels aus den oben genannten Gründen einen Vorteil zur Anwendung der Photoenolreaktion in sich birgt, wurde für die Photoinduktion ein Acetonitrilanteil von 50 % verwendet.

Eine weiterer Faktor, der die Stabilität der verwendeten ssDNA **NH<sub>2</sub>D1** und des Myoglobins **Mb** beeinflussen könnte, ist die für die Photoenolreaktion verwendete UV-Strahlung bei 320 nm<sup>154</sup>, da UV-Licht unterschiedliche Schädigungen bei den verwendeten Biomolekülen verursachen kann. Bei Betrachtung des Emissionsspektrums der verwendeten Breitband-UVB-Niederdrucklampe (vgl. Kapitel 5.2.10, Seite 182) ist zu erkennen, dass das Spektrum eine breite Emission von ca. 290 nm bis 390 nm aufweist (Maximum bei ca. 320 nm). In diesem Zusammenhang muss erläutert werden, dass eine lichtinduzierte DNA Schädigung entweder durch direkte Absorption der UV-Strahlung oder über indirekte Beeinflussung durch reaktive Spezies erfolgen kann.<sup>157, 158</sup> Zu den indirekten Schädigungsparametern zählen frei gebildete Radikale<sup>157</sup>, die das Phosphatrückgrat der DNA schädigen und zu Strangbrüchen führen. Eine der meist verbreiteten Schädigung ist jedoch die direkte Absorption von UV-B Strahlung (280-315 nm), die eine photoinduzierte kovalente Dimerisierung von zwei benachbarten Pyrimidinen (Thyminen oder Cytosinen) hervorrufen.<sup>159, 160</sup> Während Strangbrüche eine Fragmentierung der **NH<sub>2</sub>D1** in kleinere Stränge oder in die einzelnen Nucleobasen zur Folge hätte, würde eine Dimerisierung der Pyrimidinbasen die Hybridisierungseffizienz mit komplementärer ssDNA herabsetzen. Neben der Phosphatrückgratschädigung der DNA kann UV-Strahlung ebenfalls die die Struktur des Proteins beeinflussen, indem die native Proteinstruktur z.B. durch reaktive Spezies beeinflusst wird und somit deren Aktivität herabsetzen oder durch Spaltung der Aminosäuresequenz das Protein zerstören.<sup>161</sup> Aus diesen Gründen wurde zunächst die Bestrahlungsstabilität beider Biomoleküle untersucht.

Hierzu wurde in einem ersten Versuch etwas **Mb** in PBS Puffer (pH=7,0) mit 50 % Acetonitril versetzt und über Nacht bei Raumtemperatur und im selbstgebauten Photoreaktor

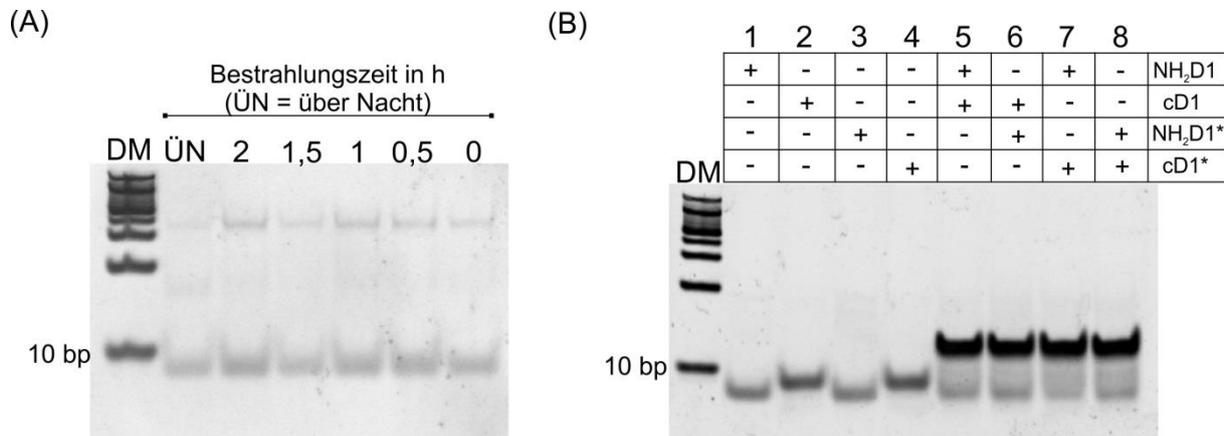
bestrahlt (vgl. Kapitel 5.2.10). Um den Acetonitrilanteil zu entfernen, wurde das bestrahlte Mb am folgenden Tag mittels Gelfiltrationssäulen behandelt und ein Pufferwechsel durchgeführt, indem das Mb mittels  $\text{NaP}_i$ -Puffer (pH=6.0) eluiert wurde. Die Lösung wurde unter Verwendung von Ultrafiltrationsröhrchen eingeeengt und die Konzentration spektrometrisch bestimmt. Die bestrahlte und aufgearbeitete Probe wurde mittels denaturierender Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE; engl.: „*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*“) analysiert und ein Aktivitätstest durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 21 wiedergegeben.



**Abbildung 21:** (A) SDS PAGE Charakterisierung des zwölf stündig bestrahlten Myoglobins (**Mb\***) im Vergleich zum nativen Myoglobin (**Mb**). **Konditionen:** 12 %iges SDS-PA-Gel; **Spannung:** 120 V; **Laufpuffer:** 1x SDS Laufpuffer; **Färbung:** Coomassie-Blau; **PM:** Proteinmarker; **Aufgetragene Proteinmenge:** 300 pmol. (B) AmpliFu™ Red Aktivitätstest des nativen Myoglobins (**Mb**) im Vergleich zum über Nacht bestrahlten Myoglobin (**Mb\***). **Endkonzentration der Substanzen in Lösung:** 50  $\mu\text{M}$  Amplex® Red, 1 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  und 10 nM **Mb** bzw. **Mb\***.

In Abbildung 21A ist die Charakterisierung des bestrahlten Myoglobins (**Mb\***) im Vergleich zum nativen Myoglobin (**Mb**) mittels SDS-Polyacrylamidgel (SDS-PA-Gel) dargestellt, indem die Proteine mittels Coomassie Blau angefärbt wurden. Beide Proben weisen das gleiche Laufverhalten auf, welches im Vergleich zum Proteinmarker (PM) dem Molekulargewicht des **Mb** (ca. 15 kDa) zugeordnet werden kann. Des Weiteren können nach der Färbung keine weiteren Banden erkannt werden, welches darauf hindeutet, dass eine ca. 12 stündige UV-Bestrahlung keine Fragmentierung der Aminosäuresequenz verursacht und somit das Polypeptidrückgrat des Proteins unter den angewandten Konditionen nicht beschädigt wird.

In Abbildung 21B ist der Aktivitätstest des bestrahlten **Mb\*** im Vergleich zum nativen **Mb** dargestellt. Für den Aktivitätstest wurde das Substrat AmpliFlu™ Red verwendet (sog. AmpliFlu™ Assay), welches in Gegenwart von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und einer Peroxidase zum fluoreszierenden Produkt Resorufin oxidiert werden kann.<sup>42, 46</sup> Die Bildung des Resorufins wurde nach einer Anregung bei 530 nm und durch das Messen der Emmission bei 590 nm über einen Zeitraum von 30 min verfolgt. Für den Test wurde eine achtfache Bestimmung durchgeführt und zur Auswertung der Mittelwert bestimmt. Bei Betrachtung der Fluoreszenzsignale kann erkannt werden, dass eine ca. 12 h Bestrahlung in 50 % Acetonitril keinen negativen Einfluss auf die Aktivität des **Mb\*** hat und das Protein somit für die lichtinduzierte Konjugation verwendet werden kann.



**Abbildung 22:** (A) Native PAGE Charakterisierung der **NH<sub>2</sub>D1** ssDNA (0 h) im Vergleich zur bestrahlten **NH<sub>2</sub>D1** ssDNA nach unterschiedlichen Bestrahlungszeiten bei 320 nm (0,5 h; 1 h, 1,5 h; 2 h und über Nacht (ÜN)). **Konditionen:** 21 %iges PA-Gel; **Spannung:** 100 V; **Laufpuffer:** 1x TBE; **Färbung:** SybrGold®. (B) Charakterisierungen der Hybridisierungseffizienzen (Verhältnis 1:1) von nicht bestrahlter **NH<sub>2</sub>D1** / **cD1** und bestrahlter **NH<sub>2</sub>D1\*** / **cD1\*** ssDNA Proben mittels nativer PAGE. Die Proben wurden unter derselben experimentellen Bedingung (Bestrahlung in PBS:Acetonitril mit einem Verhältnis von 1:1) behandelt, wie sie für die weitere lichtinduzierte Protein-DNA Konjugationsstrategie eingesetzt wurde. **Konditionen:** 21 %ige nPA-Gel; **Spannung:** 100 V; **Laufpuffer:** 1x TBE; **Färbung:** SybrGold®; **Legende - DM:** 10 bp DNA Marker.

Um die Stabilität der ssDNA zu testen, wurde in einem zweiten Versuch die ssDNA **NH<sub>2</sub>D1** für unterschiedliche Zeitperioden bestrahlt (0,5 h; 1 h; 1,5 h; 2 h und über Nacht (ÜN: ca. 14h)). Hierzu wurde eine **NH<sub>2</sub>D1** Stammlösung in ddH<sub>2</sub>O in das Photoreaktorsystem gegeben und nach den unterschiedlichen Bestrahlungszeiten etwas an ssDNA entnommen. Die Proben wurden über Nacht eingefroren und am nächsten Tag mittels nativer Polyacrylamidgelelektrophorese (nPAGE) analysiert, wobei als Referenzprobe die nicht bestrahlte ssDNA **NH<sub>2</sub>D1** (0 h) diente (Abbildung 22A). Zur Beladung des Gels wurde für

jede Probe die gleiche Menge an ssDNA verwendet (20 pmol), so dass die Banden der einzelnen Proben nach der SybrGold®-Färbung mittels Densitometrie unter Verwendung des Computerprogramms Image J verglichen werden konnten. Eine Abnahme der Intensitäten der detektierten Banden oder die Detektion weiterer Fragmente nach der Färbung hätten somit eine mögliche Fragmentierung der ssDNA begründet. Der Vergleich der Banden zeigte jedoch keine Fragmentierung durch Schädigung des Phosphatrückgrats, da sowohl im Vergleich der einzelnen Proben keine Abnahme der Bandenintensitäten (Image J Kalkulation), als auch keine neuen ssDNA Fragmente erkannt werden können (Abbildung 22A). Aus diesem Grund wurde davon ausgegangen, dass keine Beschädigung der ssDNA durch reaktive Spezies während der Bestrahlung in ddH<sub>2</sub>O erfolgte. Da die Verwendung von polaren Lösungsmitteln mit einer erhöhten Reaktionsdauer der Photoenolreaktion verbunden ist, wurde für weitere Experimente eine Bestrahlungszeit von 12 h gewählt (Abbildung 22A; ÜN).

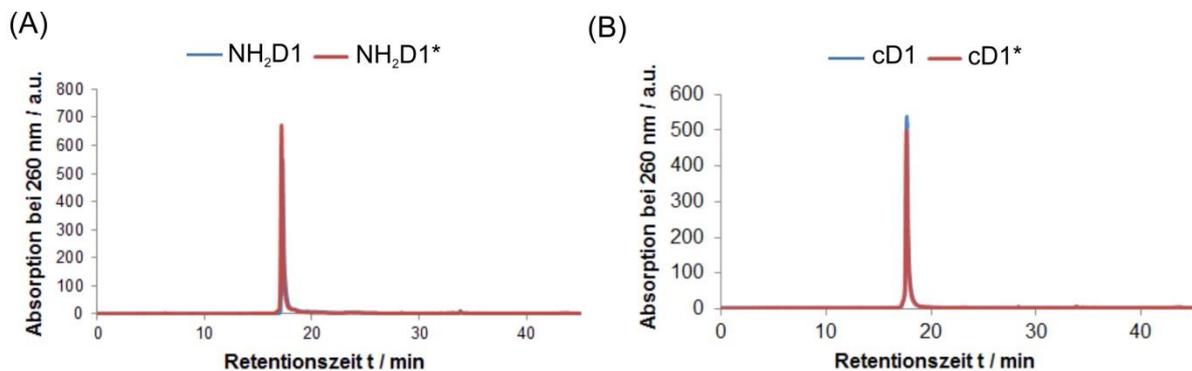
Des Weiteren musste untersucht werden, inwieweit eine mögliche Dimerisierung der Pyrimidinbasen durch Bestrahlung zu einem Verlust der Hybridisierungseffizienz der verwendeten **NH<sub>2</sub>D1** mit ihrer komplementären Sequenz **cD1** führen könnte. Eine erfolgreiche Hybridisierung von komplementären Strängen ist eine wichtige Voraussetzung zur Anwendung der Protein-DNA Konjugate für eine DNA vermittelte Immobilisierungen. Aus diesem Grund wurde eine **NH<sub>2</sub>D1** Stammlösung in ddH<sub>2</sub>O mit 50 % Acetonitril versetzt und über Nacht im Photoreaktor bestrahlt. Da die Dimerisierungen meist zwischen zwei benachbarten Pyrimidinen stattfindet<sup>157, 159</sup>, wurde die komplementäre ssDNA **cD1** unter gleichen Bedingungen inkubiert und als Vergleichsprobe verwendet, da sie im Gegensatz zur ssDNA **NH<sub>2</sub>D1** zwei benachbarten Pyrimidine in ihrer Sequenz aufweist (Tabelle 1). Die bestrahlten DNA Proben wurden am folgenden Tag in Wasser umgepuffert, im Vakuum eingengt und die Konzentrationen spektrometrisch bestimmt.

Für den Hybridisierungstest wurden nun alle möglichen Kombinationen zwischen nicht bestrahlter (**NH<sub>2</sub>D1** und **cD1**) und der jeweiligen bestrahlten (**NH<sub>2</sub>D1\*** und **cD1\***) Einzelstränge getestet, indem die komplementären Stränge für ca. 30 min bei RT mit einem Verhältnis von 1:1 inkubiert und die Proben anschließend mittels nPAGE charakterisiert wurden (Abbildung 22B).

Bei den hybridisierten dsDNA Proben in den Bahnen 5-8 kann nach der SybrGold®-Färbung eine langsamere elektrophoretische Mobilität im Gegensatz zu den Einzelsträngen in den Bahnen 1-4 beobachtet werden. Die langsamere Mobilität lässt sich durch die höhere

molekulare Masse der hybridisierten Stränge erklären und verifiziert somit eine erfolgreiche Hybridisierung der komplementären Einzelstränge. Bei näherer Betrachtung der Bahnen 5-8 fällt jedoch auf, dass neben den Hybridisierungsprodukten zwischen 10 bp und 20 bp zusätzliche Banden unter 10 bp mit einem Anteil von weniger 1 % auftreten (kalkuliert mittels des Computerprogramms Image J), die durch den Vergleich mit den Bahnen 1-4 den nicht hybridisierten Einzelsträngen zugeordnet werden können. Dass es sich hierbei um eine UV-Schädigungen der DNA handelt, welche den Hybridisierungsprozess verschlechtert, kann jedoch ausgeschlossen werden, da die Banden ebenfalls bei den nicht bestrahlten Hybridisierungstest von **NH<sub>2</sub>D1** mit **cD1** in Bahn 5 auftreten. Da weder eine Abnahme der Bandenintensitäten noch eine Fragmentierung in den Bahnen 1-4 beobachtet werden können, kann davon ausgegangen werden, dass die verwendeten Bestrahlungskonditionen in 50 % Acetonitril keine DNA Schädigungen verursachen, welche eine Hybridisierung beeinflusst.

Die Stabilität der ssDNA wurde weiterhin mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC; engl.: „*High Performance Liquid Chromatography*“) analysiert. Hierzu wurden die Proben sowohl vor, als auch nach der Bestrahlung chromatographisch getrennt. Der Vergleich der resultierenden Chromatogramme zeigt jeweils ein Signal, welches darauf hindeutet, dass keine Nebenprodukte entstanden, welche auf eine Fragmentierung der ssDNA zurückzuführen wären (Abbildung 23A und B).



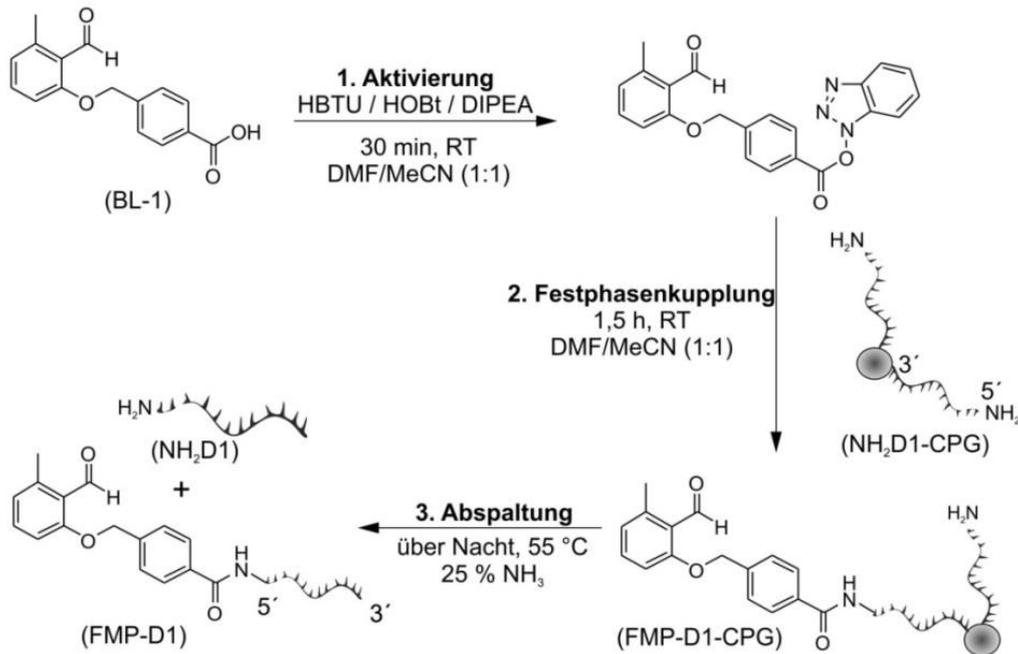
**Abbildung 23:** HPLC Spektren der ssDNA **NH<sub>2</sub>D1** (A) und **cD1** (B) vor (blaue Spektren) und nach (rote Spektren) der Bestrahlung bei 320 nm. Die Proben wurden unter denselben experimentellen Bedingungen inkubiert, wie sie für die weitere lichtinduzierte Protein-DNA Konjugationsstrategie eingesetzt wurden (Bestrahlung in PBS:Acetonitril mit einem Verhältnis von 1:1).

Die Resultate zeigen, dass sowohl die ssDNA, als auch das Protein Myoglobin als Model biomoleküle für die lichtinduzierte Konjugation eingesetzt werden können und keine Schädigungen nach der UV-Bestrahlung auftreten, welche eine Anwendung der Biomoleküle

für eine Machbarkeitsstudie beeinflussen könnten. Um die Effektivität der Photoenolreaktion zu gewährleisten<sup>154</sup>, kann ein Acetonitrilanteil von 50 % und eine Bestrahlungszeit von ca. 12 h eingesetzt werden. Die ermittelten Bedingungen wurden auf die spätere lichtinduzierte Konjugation der **FMP-ssDNA** mit dem **Mb-Mal** übertragen. Für eine lichtinduzierte Konjugation musste jedoch zunächst die ssDNA mittels des FMP-Derivats modifiziert werden. Die Ergebnisse sind im folgenden Kapitel dargestellt.

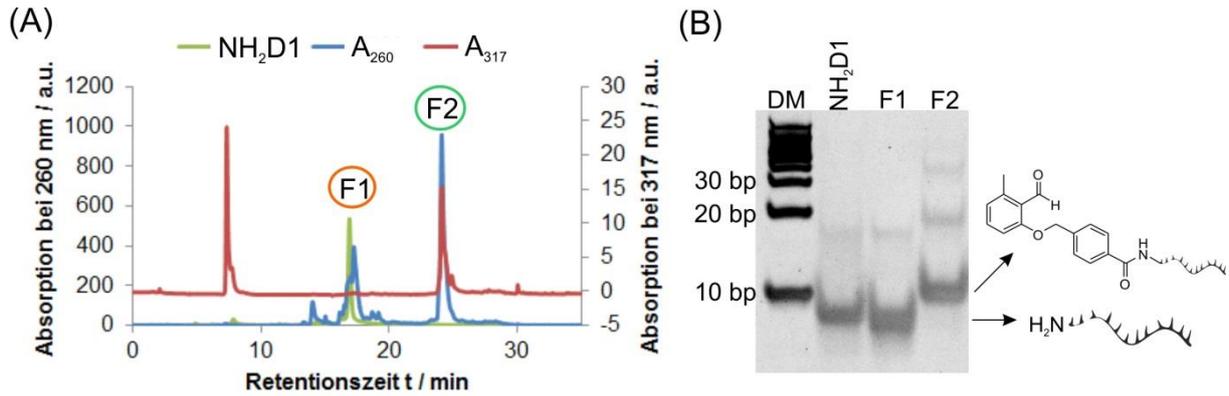
### 3.1.3 Synthese und Charakterisierung von Photoenol modifizierter ssDNA

Für die Modifizierung der ssDNA **NH<sub>2</sub>D1** mit dem FMP-Derivat **BL-1** wurde eine Festphasenstrategie verwendet, wobei sich der gesamte Kupplungsprozess in drei Abschnitte einteilen lässt (Abbildung 24). In einem ersten Schritt wurde die Carboxygruppe des FMP-Derivats **BL-1** mittels der Reagenzien *O*-(Benzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium hexafluorophosphat (HBTU), 1-Hydroxybenzotriazol (HOBt) und *N,N*-diisopropylethylamin (DIPEA) in einer DMF und Acetonitril Lösung (Verhältnis 1:1) aktiviert. Die Lösung wurde in einem zweiten Schritt zu einer **NH<sub>2</sub>D1** ssDNA gegeben, welche an porösem Glas (CPG, engl.: „*controlled pore glass*“) gebunden vorlag (**NH<sub>2</sub>D1-CPG**). Nach einer Inkubationszeit von 1,5 h und Amidausbildung zwischen den aktivierten Carboxygruppe und der 5'-Amin modifizierten **NH<sub>2</sub>D1**, wurde die Festphase mehrmals gewaschen und die **FMP-D1** ssDNA in einem dritten Schritt mittels 25 %iger Ammoniaklösung über Nacht bei 55 °C von dem CPG abgespalten.



**Abbildung 24:** Graphische Darstellung der Kupplung des FMP-Derivats **BL-1** an die ssDNA **NH<sub>2</sub>D1** mittels der Festphasenmethode. (1) Aktivierung der Carboxygruppe des FMP-Derivats **BL-1** mittels den Aktivierungsreagenzien HBTU, HOBt und DIPEA. (2) Kupplung der trägergebundenen **NH<sub>2</sub>D1** ssDNA an das FMP-Derivat **BL-1** über Amidbindung der aktivierten Carboxygruppe. (3) Abspaltung der 5'- FMP modifizierten ssDNA (**FMP-D1**) von der Festphase mittels 25 %iger Ammoniaklösung nach Inkubation bei 55 °C über Nacht.

Nach der Abspaltung der ssDNA von dem CPG wurde das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das ssDNA Pellet in ddH<sub>2</sub>O gelöst. Die Probe wurde mittels HPLC analysiert und gereinigt (Abbildung 25A). Um die einzelnen Produkte zu analysieren, wurde sowohl die Absorption der ssDNA bei 260 nm (Abbildung 25A, blau) als auch die Eigenabsorption des FMP-Derivats **BL-1** bei 317 nm (Abbildung 25A, rot) aufgezeichnet. Zum Vergleich wurde die reine **NH<sub>2</sub>D1** ssDNA ebenfalls analysiert, indem das Elutionsverhalten bei 260 nm verfolgt wurde (Abbildung 25A, grün). Für die Aufreinigung wurde ein Gradient zwischen 0,1 M Ammoniumacetat und Acetonitril verwendet (Kapitel DAV 5.4, Tabelle 38).



**Abbildung 25:** (A) HPLC Chromatogramm zur Reinigung der FMP modifizierten **NH<sub>2</sub>D1** ssDNA (**FMP-D1**) nach Abspaltung von der Festphase. Detektiert wurde die DNA Absorption bei 260 nm (blau) und die Eigenabsorption des FMP-Derivats bei 317 nm (rot). Als Referenzprobe wurde das Spektrum der reinen **NH<sub>2</sub>D1** ssDNA bei einer Absorption von 260 nm in das Chromatogramm eingetragen (grün). (B) Native PAGE Charakterisierung der HPLC aufgereinigten Hauptfraktionen F1 und F2. **Konditionen:** 21 %iges nPA-Gel; **Spannung:** 100 V; **Laufpuffer:** 1x TBE; **Färbung:** SybrGold®; **Legende - DM:** 10 bp DNA.

Aus dem HPLC Spektrum in Abbildung 25A ist zu erkennen, dass bei einer Retentionszeit von ca. 17 min bzw. 26 min zwei Hauptfraktionen F1 und F2 auftreten, welche eine Absorption bei 260 nm aufweisen. Während die Fraktion F1 durch den Vergleich mit der Referenzprobe **NH<sub>2</sub>D1** (grünes Chromatogramm) der unmodifizierten **NH<sub>2</sub>D1** ssDNA zugeordnet werden kann, weist die Fraktion F2 ebenfalls eine Absorption bei 317 nm auf, welches der Eigenabsorption des FMP Derivats entspricht und somit der modifizierte **FMP-D1** angehören könnte.

Um eine genauere Analyse der einzelnen Fraktionen durchzuführen, wurde die die beiden Hauptfraktionen F1 und F2 mittels nPAGE und MALDI-TOF charakterisiert und verglichen (Abbildung 25B und Tabelle 3). Als Referenzprobe wurde ebenfalls die reine **NH<sub>2</sub>D1** ssDNA für die Analysen verwendet.

Bei der Betrachtung des nativen Polyacrylamidgels (nPA-Gels) in Abbildung 25B kann nach der SybrGold®-Färbung erkannt werden, dass die Fraktion F1 im Vergleich zur Referenzprobe **NH<sub>2</sub>D1** keine Veränderung der elektrophoretischen Mobilität aufweist. Dies unterstützt die Aussage, dass es sich bei der Fraktion F1 um die nicht modifizierte ssDNA **NH<sub>2</sub>D1** ( $M_w = 3861$  g/mol) handelt. Die Bahn der Fraktion F2 weist jedoch im Vergleich zur Referenzprobe eine deutlich langsamere Mobilität auf. Die kürzere Laufstrecke lässt sich durch eine erhöhte Masse erklären, die aus der 5'-Modifikation der **NH<sub>2</sub>D1** ssDNA mit dem **FMP**-Derivat resultiert ( $M_w = 4113$  g/mol). Diese Aussage wird unterstützt durch die Massenanalyse der Fraktion F2 mittels MALDI-TOF, in der die theoretische ermittelt Masse

belegt werden kann (Tabelle 3). In den Analysen kann jedoch eine kleinere Abweichung zur theoretischen kalkulierten Massen beobachtet werden, die in einer Größenordnung von ca. 4 Wasserstoffatomen (ca. 0,09 %) liegt. Dieses Phänomen lässt sich durch die variierende Protonierungen des Biomoleküls in Bezug auf die Nukleobasen bzw. des Phosphatrückgrats erklären, wobei diese Hypothese durch die Massenanalysen der reinen Eduktes ssDNA **NH<sub>2</sub>D1** verstärkt werden kann, da auch in diesen Fall eine Abweichung der detektierten Masse von ca. 4 Protonen beobachtet wird (Tabelle 3).

**Tabelle 3:** Massenspektrometrische Daten der aufgereinigten HPLC Fraktion F2, des ssDNA Eduktes **NH<sub>2</sub>D1** und des synthetisierten FMP-Derivats **BL-1**.

<i>Molekül</i>	<i>Analysemethode</i>	<i>M<sub>Soll</sub> [g/mol]</i>	<i>M<sub>Gemessen</sub> [g/mol]</i>
NH <sub>2</sub> D1	MALDI-TOF	3861	3857
FMP-D1 (Fraktion F2)	MALDI-TOF	4113	4109
FMP-Derivat BL-1	HR-ESI-MS	270,0892	270,0890

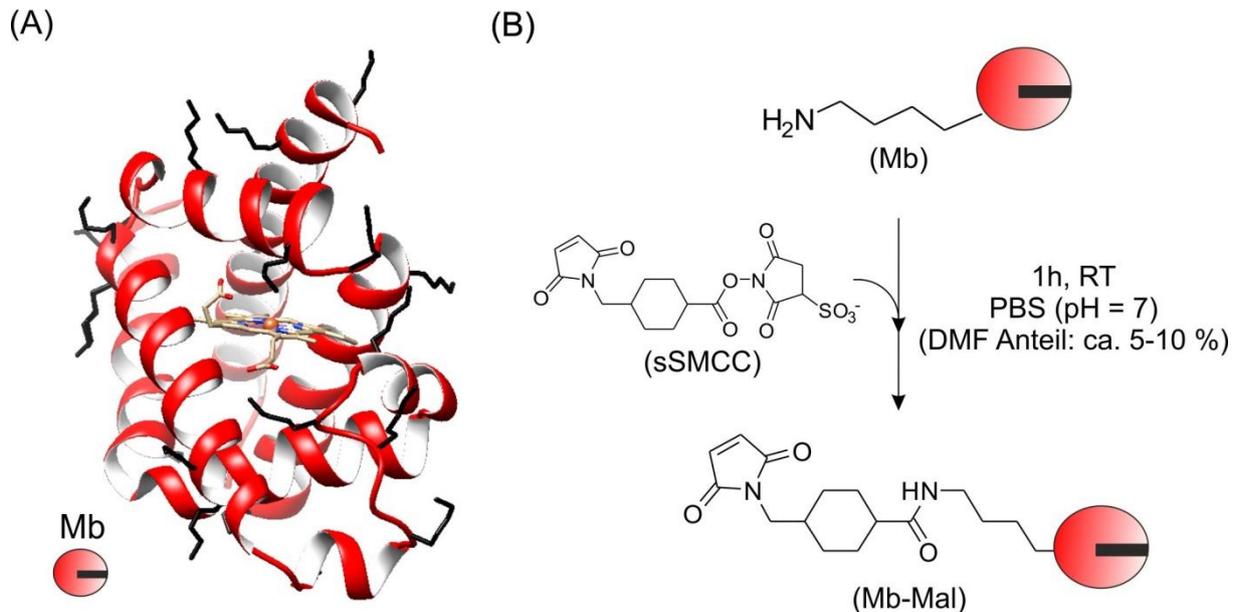
Des Weiteren kann erkannt werden, dass neben den beiden Hauptprodukten bei ca. 10 bp weitere Banden mit einem Anteil von weniger als 1% und mit einer Laufstrecke von ca. 20 bp bzw. 40 bp auftreten (Abbildung 25B). Diese Nebenprodukte mit erhöhter Masse können ebenfalls bei dem kommerziell erworbenen ssDNA Edukt **NH<sub>2</sub>D1** beobachtet werden, so dass davon ausgegangen werden kann, dass es sich hierbei evtl. um ssDNA Artefaktfragmente mit SiO<sub>2</sub> handelt, die aufgrund der harschen Abspaltungsstrategie mit 25 %iger Ammoniaklösung entstanden sein könnten. Nach Rückfrage mit der Firma *Sigma* konnte ermittelt werden, dass die Abspaltung vom CPG ebenfalls mit Ammoniak vollzogen wird. Eine genauere Analyse der Fragmente wurden in dieser Arbeit nicht durchgeführt und die charakterisierte **FMP-D1** ssDNA wurde ohne weitere Reinigungsschritte verwendet.

Die Ergebnisse verifizierten eine erfolgreiche Modifizierung der ssDNA **NH<sub>2</sub>D1** mit dem FMP-Derivat **BL-1** und die modifizierte **FMP-D1** ssDNA konnte in einem nächsten Schritt für die photoinduzierte Reaktion eingesetzt werden.

### 3.1.4 Lichtinduzierte Konjugation von Photoenol modifizierter ssDNA mit Maleimid funktionalisierten Myoglobin

Das verwendete Modelprotein Myoglobin (**Mb**) weist insgesamt 19 Lysinreste auf, die weit verteilt auf der Oberfläche des Moleküls auftreten (Abbildung 26A). Die Einführung des Dienophils Maleimid wurde über die Ausbildung einer Amidbindung mittels des bi-

funktionellen Linkers sSMCC durchgeführt (Abbildung 26B). Vorteilhaft beim Einsatz von **Mb** ist, dass die Aminosäuresequenz keine Cystein-Reste aufweist, welches eine Spezifität der Reaktion des hetero-bi-funktionellen Linkers gewährleistet, da die Maleimid Gruppe des sSMCC keine ungewollten Michael-Addition mit Cystein-Resten eingehen kann. Weiterhin kann die Pseudoperoxidase Aktivität des **Mb**<sup>145</sup> dazu verwendet werden, den Einfluss der DNA Konjugation auf die Aktivität des Proteins zu untersuchen.



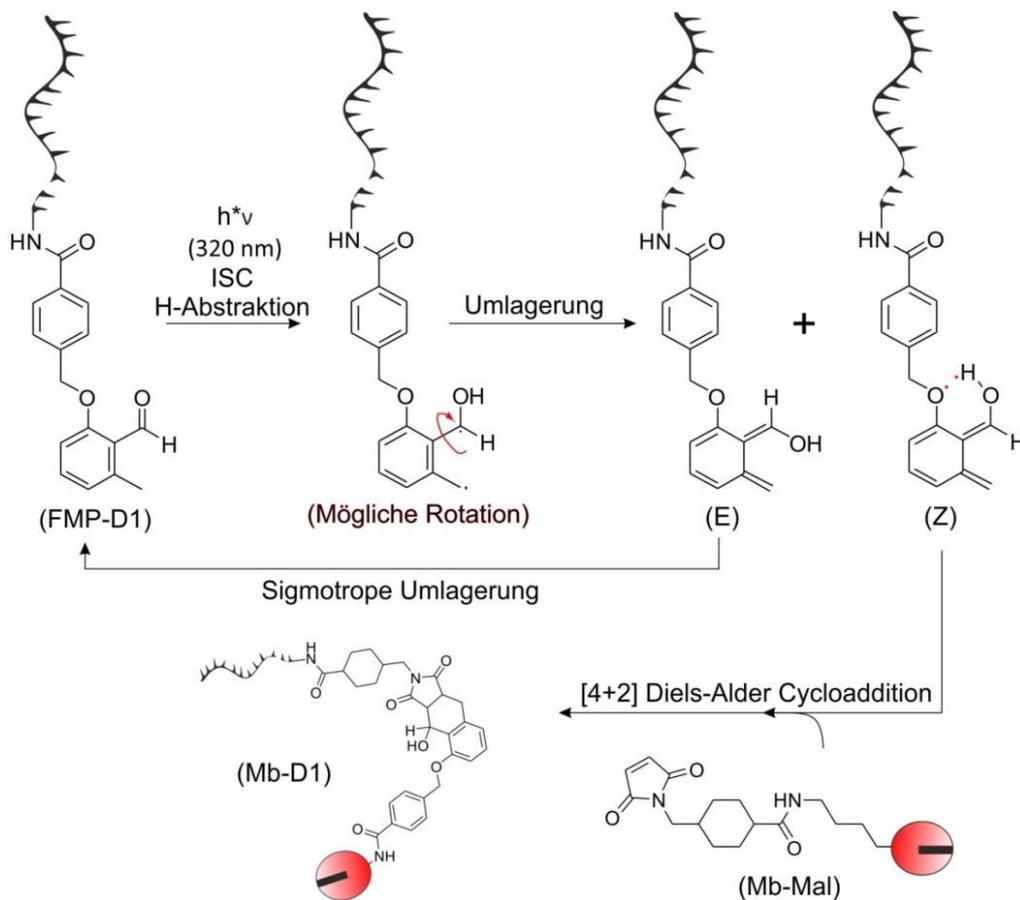
**Abbildung 26:** (A) Graphische Darstellung der 19 Lysin Reste (schwarz) in der nativen Struktur des Myoglobins (**Mb**). Die Graphik wurde mittels des Computerprogramms Chimera 1.9 erstellt, indem die Datei 3LR7 der Proteindatenbank verwendet wurde. (B) Schema zur Modifikation des **Mb** mit einer Maleimid-Funktion unter Verwendung des bi-funktionellen Linkers sulfosuccinimidyl-4-(N-maleimido-methyl)-cyclohexan-1-carboxylat (sSMCC).

Zur Modifizierung des **Mb** wurde eine **Mb** Stammlösung in PBS Puffer (pH 7) mit einem 10 fachen Überschuss an sSMCC (in DMF) versetzt und für ca. 1 h bei Raumtemperatur inkubiert (DMF Anteil ca. 5-10 %; Abbildung 26B). In diesem Zusammenhang muss erwähnt werden, dass das Protein bei höheren Überschüssen präzipitierte, welches auf eine Modifizierung aller Lysine auf der Oberfläche des Proteins zurückgeführt werden kann, da die 19 Lysinreste mehr als 30 % der basischen, sauren und polaren Seitenketten der Sequenz ausmachen und somit zu einen hohen Anteil an den Solvatisierungsprozess des Proteins in wässriger Lösung beteiligt sind.

Das modifizierte **Mb-Mal** wurde direkt nach einer Gelfiltration, zur Abtrennung kleiner Moleküle, für die lichtinduzierte Reaktion mit **FMP-D1** eingesetzt. Neben n-modifizierten

**Mb-Mal** (n=Anzahl der Maleimid-Funktionalisierungen) enthielt die Reaktionslösung eventuell nicht modifiziertes **Mb**, welches nach der lichtinduzierten Reaktion mittels Anionenaustauschchromatographie abgetrennt werden konnte (siehe untere Beschreibung).

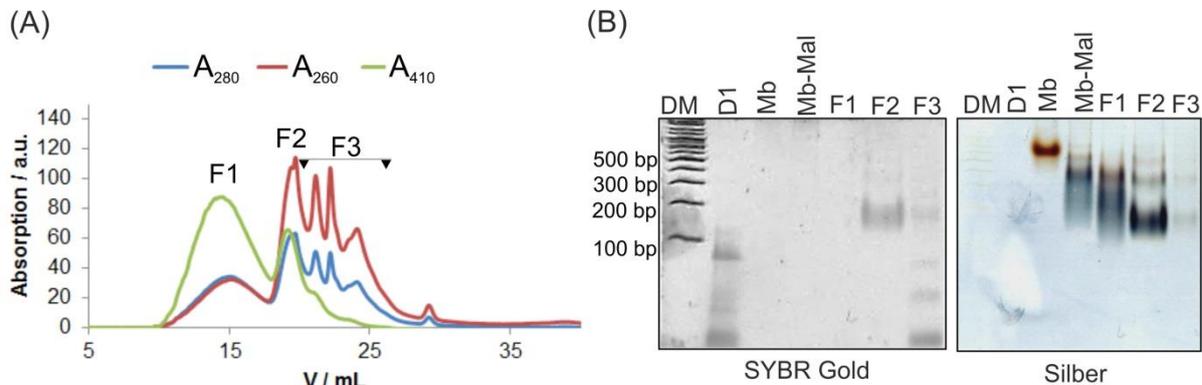
Für die photoinduzierte Konjugation wurde die gereinigte **FMP-D1** (20 nmol) ssDNA mit **Mb-Mal** (25 nmol) in einem Verhältnis von 0,8:1 in 50 % Acetonitril und für ca. 12 h im Photoreaktorsystem bei 320 nm bestrahlt (Abbildung 27). Durch Gelfiltration wurde der Acetonitrilanteil entfernt und ein Pufferwechsel zu 20 mM Tris durchgeführt. Ein theoretischer Reaktionsmechanismus nach der Beschreibung von Tchir und Porter<sup>162, 163</sup> ist in der folgenden Abbildung 27 dargestellt.



**Abbildung 27:** Schematische Darstellung der Photoenolreaktion von **Mb-Mal** mit der modifizierten ssDNA **FMP-D1** nach Tchir und Porter<sup>162, 163</sup>.

Nach Behandlung der Proben wurde der Reaktionsansatz mittels Anionenaustauschchromatographie gereinigt. Zur Analyse der Reinigung des **FMP-D1** Konjugats wurde die Absorptionen der ssDNA bei 260 nm und die Absorptionen des Myoglobins bei 280 nm sowie 410 nm (Soret-Signal) detektiert (Abbildung 28A). Die Hauptfraktionen wurden

gesammelt, der Puffer mittels Ultrafiltrationsröhrchen zu PBS 1x Puffer gewechselt, die Konzentrationen spektrometrisch bestimmt und eine native PAGE Analyse der einzelnen Fraktionen durchgeführt. Um die Positionen des ssDNA und des Proteins auf dem Gel sichtbar zu machen und vergleichen zu können, wurde eine abgestufte Färbemethode verwendet, indem die ssDNA zunächst mittels SybrGold<sup>®</sup> angefärbt und anschließend das Protein mittels Silber gefärbt wurde (Abbildung 28B). Kann eine detektiert Bande auf dem Gel mit beiden Färbemethoden sichtbar gemacht werden, liegt somit in dieser Spezies eine DNA-Protein Konjugation vor. Als Referenzproben für die Gelanalyse wurde zusätzlich die reine **NH<sub>2</sub>D1** ssDNA, das native Myoglobin (**Mb**) und das mit sSMCC modifizierte Myoglobin (**Mb-Mal**) aufgetragen.



**Abbildung 28:** (A) FPLC Chromatogramm der Reinigung des **Mb-D1** Konjugats mittels Anionenaustauschchromatographie. Detektiert wurden die Absorptionen der Probe bei 280 nm (blauer Verlauf), 260 nm (roter Verlauf) und 410 nm (grüner Verlauf). Die Salzkonzentration wurde graduell gesteigert, indem der Anteil des Anionenaustauschpuffers B linear innerhalb von 35 min auf 100 % erhöht wurde. **Puffer A:** 20 mM Tris (pH = 8,3); **Puffer B:** 20 mM Tris, 1M NaCl (pH = 8,3). (B) Native PAGE der gereinigten FPLC Fraktionen F1, F2 und F3. Als Referenzproben wurden die Edukte **NH<sub>2</sub>D1** und **Mb**, sowie eine sSMCC modifizierte **Mb** Probe (**Mb-Mal**) aufgetragen; **DM:** 10 kbp Marker; **Konditionen:** 12,5 % PA-Gel, 120 V; **Laufpuffer:** Tris-Glycin (pH = 8,3); **Reihenfolge der Färbung:** 1) SybrGold<sup>®</sup>, 2) Silber; **DM:** 100 bp DNA-Marker.

In Abbildung 28A ist das Chromatogramm der FPLC Aufreinigung mittels Anionenaustauschchromatographie dargestellt. Insgesamt wurden drei Hauptfraktionen (F1-F3) gesammelt, die aufgrund ihres Absorptionsverhaltens unterschiedlichen Spezies zugeordnet werden können. Die Spezies in Fraktion F1 zwischen ca. 10 und 20 mL weist die höchste Absorption bei 410 nm auf, welche dem Absorptionsmaximum des nativen Myoglobins zugeordnet werden kann (vgl. hierzu Kapitel 3.1.5 zur Berechnung des stöchiometrischen Verhältnisses). Da die Absorption bei 410 nm einen deutlich höheren Wert als die Absorption

bei 260 nm einnimmt, kann davon ausgegangen werden, dass diese Fraktion zum größten Teil Myoglobin enthält. In Fraktion F2 hingegen kann ein deutlich höheres Signal bei 260 nm als bei 410 nm detektiert werden, welches das Vorliegen von ssDNA hindeutet. Da die Soretbande die gleichzeitige Anwesenheit des Proteins darlegt, kann davon ausgegangen werden dass es sich bei dieser Spezies um das lichtinduzierte Protein-DNA Konjugat handelt. Für die Fraktion F3 zwischen 23 und 25 mL wurden die detektierten Signale vereinigt, da durch den sehr geringen Anteil einer Absorption bei 410 nm und einem Maximum bei 260 nm davon ausgegangen werden kann, dass es sich hierbei größtenteils um nicht reagierter ssDNA handelt. Diese Hypothesen können mittels der nPA-Gel Charakterisierung der einzelnen Fraktionen belegt werden (Abbildung 28B).

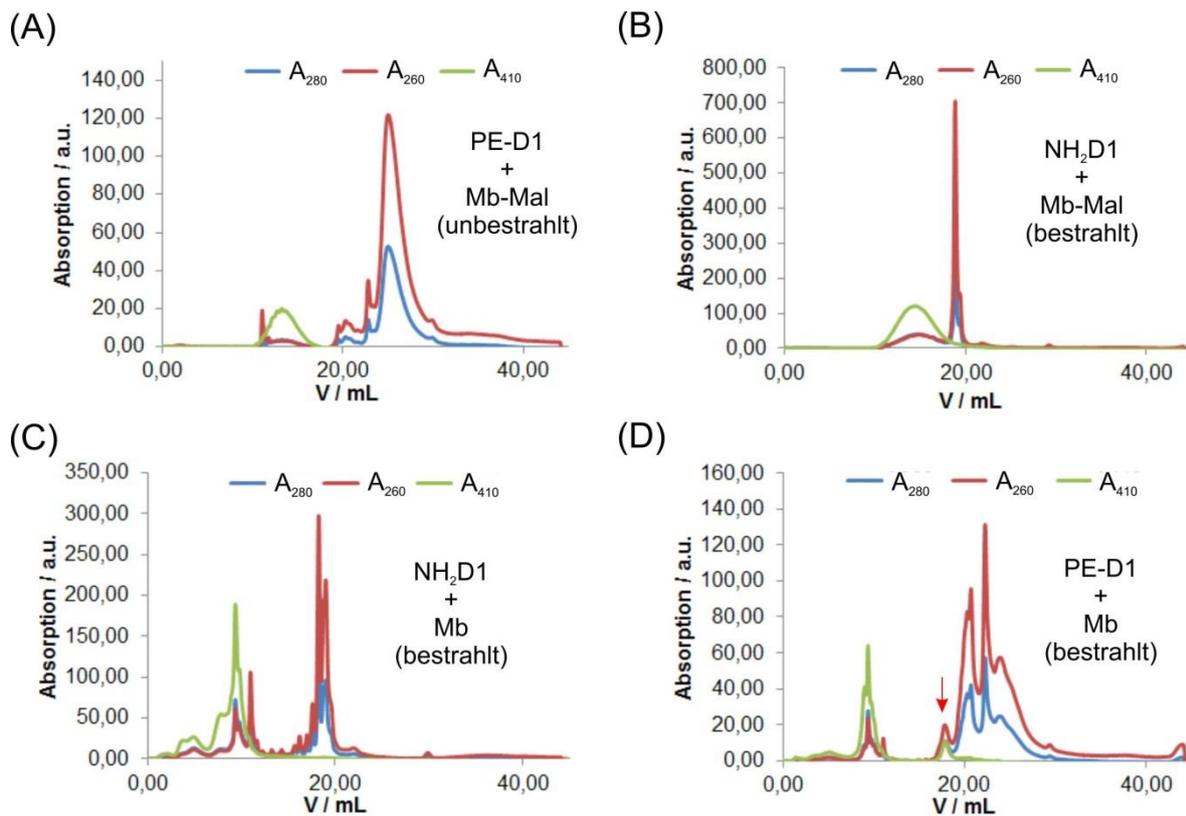
Bei der Betrachtung der Fraktion F1 kann erkannt werden, dass sich diese Spezies nur nach der Silberfärbung visualisieren lässt und somit das alleinige Vorhandensein von Protein bestätigt. Vergleicht man diese Spezies mit der Referenzprobe **Mb-Mal**, so weisen beide Proben das gleiche Laufverhalten auf und können somit eindeutig zueinander eingeordnet werden. Das vorhandene „Schmierverhalten“ der Banden bei **Mb-Mal** und bei der Fraktion F2 nach der Silberfärbung könnte durch die unterschiedliche Anzahl der modifizierten Lysine mittels sSMCC hervorgerufen werden. Da das Myoglobin nach der sSMCC Modifizierung nicht gereinigt wurde, müssten in diesem Fall unterschiedlich n-modifizierte Lysine vorliegen (bei einem 10 fachen Überschuss an sSMCC sollten aufgrund der Stöchiometrie im Durchschnitt maximal 10 Lysine modifiziert sein). Da Lysine mit einem isoelektrischen Punkt (pI) von ca. 9,4 unter den verwendeten Konditionen der nPAGE (Laufpuffer pH = 8,3) positiv geladen auftreten, könnte eine Modifizierung einen großen Einfluss auf die Gesamtladung der Proteinoberfläche haben und somit das Laufverhalten im Gel beeinflussen. Diese Theorie kann im Vergleich der Fraktion F1 und **Mb-Mal** mit der nativen Myoglobin Bande (**Mb**) verstärkt werden. In diesem Vergleich ist nach der Silberfärbung zu erkennen, dass das native Protein **Mb** deutlich langsamer wandert, als die sSMCC n-modifizierte **Mb-Mal** Spezies. Da das native **Mb** einen pI von 7,1 besitzt (kalkuliert mittels der Internetsoftware ProtParam), liegt das Protein bei den verwendeten Konditionen in Bezug auf seine Oberflächengesamtladung leicht negativ geladen vor. Durch die „Blockierung“ der Lysine durch die sSMCC Modifizierungen werden einige der positiv geladenen Aminosäurereste „neutralisiert“ und die Oberflächengesamtladung verschiebt sich somit zu einem negativeren Wert, welcher die schneller Mobilität der **Mb-Mal** Probe und der Fraktion F2 begründet. Durch diese Theorie lässt sich auch die breite der detektierten Fraktion F1 im FPLC

Chromatogramm erklären (Abbildung 28A), da der beschriebene Effekt die Wechselwirkung mit der Anionenaustauschchromatographiesäule beeinflussen kann.

Die Probe der Fraktion F2 lässt sich sowohl mittels SybrGold<sup>®</sup>, als auch mit Silberfärbung visualisieren. Somit liegt bei diesen Spezies sowohl ssDNA, als auch Protein vor, welches das Vorhandensein eines Protein-DNA Konjugats verifiziert. Bei dem Vergleich dieser Spezies mit dem nativen Mb nach der Silberfärbung ist eine deutlich schnellere elektrophoretische Mobilität zu beobachten, die sich durch die Konjugation des Proteins mit der ssDNA und der damit verbundenen erhöhten negativen Ladung der Oberfläche durch das Phosphatrückgrat der DNA erklären lässt.<sup>50</sup> Neben dem Hauptprodukt mit der schnellsten elektrophoretischen Mobilität zwischen 100 bp und 200 bp, können zwei weitere Produkte bei ca. 400 bp bzw. 500 bp beobachtet werden, welche einen Anteil von ca. 19 % bzw. 6 % im Vergleich zum Hauptprodukt besitzen. Bei diesen beiden Spezies, die sich sowohl mit SybrGold<sup>®</sup> als auch mit Silber anfärben lassen, könnte es sich um bi- bzw. tri- konjugierte Protein-DNA Produkte handeln, welche aufgrund ihrer höheren molekularen Masse ein langsames Laufverhalten aufweisen als das Hauptprodukt. Die Produkte könnten aufgrund der angewandten FPLC Konditionen nicht voneinander abgetrennt worden sein. Diese Annahme kann durch die Kalkulation des stöchiometrischen Anteils (vgl. Kapitel 3.1.5) und durch die Hybridisierung mittels eines komplementären Stranges (vgl. hierzu Kapitel 3.1.6) verifiziert werden. Um eine verbesserte Trennung aller Spezies zu gewährleisten, könnten in zukünftigen Versuchen der Natriumchlorid Gradient variiert werden. Für die geplanten Experimente war eine Abtrennung der höher konjugierten Spezies nicht notwendig und die Fraktion F2 wurde direkt für weitere Versuche verwendet.

Der Vergleich der Spezies der Fraktion F3 mit der Referenzprobe **FMP-D1** und mit der Fraktion F2 verifizieren, dass es sich bei dieser Spezies um nicht reagierter ssDNA und um Spuren des **Mb-D1** Konjugat handelt, welche aus den oben genannten Gründen nicht eindeutig voneinander abgetrennt werden konnten.

In diesem Zusammenhang muss erläutert werden, dass unterschiedliche Kontrollreaktionen durchgeführt wurden, indem sowohl das native **Mb** mit der ssDNA **NH<sub>2</sub>D1** bzw. modifizierter **FMP-D1**, sowie das Maleimid funktionalisierte **Mb-Mal** mit der ssDNA **NH<sub>2</sub>D1** bestrahlt wurden. Zusätzlich wurden die beiden Ausgangsprodukte **Mb-Mal** und **FMP-D1** unter Lichtausschluss und ohne Bestrahlung über Nacht inkubiert (Abbildung 29A-D). Die Proben wurden unter den gleichen Bedingungen inkubiert, wie die bestrahlten Proben **Mb-Mal** und **FMP-D1** und anschließend mittels FPLC analysiert.



**Abbildung 29:** FPLC Charakterisierungen zur Analyse der gebildeten Nebenprodukte unterschiedlichster negativ Kontrollen nach der lichtinduzierten Konjugation. **(A)** Spektrum der nicht bestrahlten Proben **Mb-Mal** mit **FMP-D1** nach Inkubation über Nacht unter Lichtausschluss. **(B)** Spektrum der bestrahlten Proben von **NH<sub>2</sub>D1** und **Mb-Mal**. **(C)** Spektrum der bestrahlten Proben **NH<sub>2</sub>D1** und **Mb**. **(D)** Spektrum der bestrahlten Proben **PE-D1** und **Mb**. Das detektierte Nebenprodukt der Photokonjugation zwischen **PE-D1** und **Mb** ist mit einem roten Pfeil gekennzeichnet. Die Salzkonzentration wurde graduell gesteigert, indem der Anteil des Anionenaustauschpuffers B linear innerhalb von 45 min auf 100 % erhöht wurde. **Puffer A:** 20 mM Tris (pH = 8,3); **Puffer B:** 20 mM Tris, 1M NaCl (pH = 8,3); **Flussrate:** 1 mL/min.

Eine insignifikante Menge an Konjugat konnte bei der Bestrahlung von nativen **Mb** mit der modifizierten **FMP-D1** ssDNA detektiert werden (Abbildung 29D, roter Pfeil), welches auf eine Nebenreaktion der modifizierten DNA mit den Aminosäuren des nativen Proteins auf der Oberfläche hindeutet. Dieses Produkt konnte jedoch aufgrund zu geringer Ausbeute nicht weiter analysiert werden. Für eine genauere Analyse müsste hierzu das eingesetzte FMP-Derivat mit allen 20 proteinogenen Aminosäuren unter den gleichen Konditionen bestrahlt und spektroskopisch analysiert werden.

Anhand der Ergebnisse lässt sich erkennen, dass die Herstellung des Konjugats mittels der Lichtreaktion zwischen **Mb-Mal** und **FMP-D1** erfolgreich durchgeführt werden konnte und eine hohe Spezifität der Reaktion zwischen Maleimid und dem Photoenol gegeben ist. Es

konnten keine Protein-DNA Konjugate im FPLC Spektrum detektiert werden, nachdem **Mb-Mal** mit **FMP-D1** über Nacht und unter Lichtausschluss inkubiert wurden (Abbildung 29A). Dies zeigt, dass die Reaktion nur selektiv unter Bestrahlungseinfluss stattfinden kann. Für zukünftige Anwendung würde somit eine zeitliche und räumliche Kontrolle der Konjugationsstrategie gewährleistet werden.

In einem nächsten Schritt wurde das stöchiometrische Verhältnis des gewonnenen Protein-DNA Konjugats bestimmt. Die Vorgehensweise ist im nächsten Kapitel kurz dargestellt.

### 3.1.5 Berechnung des stöchiometrischen Verhältnisses des lichtinduzierten Myoglobin-ssDNA Konjugats

Während die Konzentrationsanteil des Proteins im Konjugat ohne weiteres über die Absorption des Soretpeaks bei 410 nm ( $\epsilon_{(\text{MbA}410)}=171000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) und unter Anwendung des Lambert Beerschen Gesetzes bestimmt werden kann, muss für die Konzentrationsbestimmung der ssDNA zunächst der Anteil der Eigenabsorption der Aminosäuren des Myoglobins von den gemessenen  $A_{260}$ -Werten des Konjugats ( $A_{260}(\text{Kon})$ ) subtrahiert werden. Für die Bestimmung des Absorptionsanteils der DNA innerhalb des Konjugats gilt dementsprechend:

$$(I) A_{260}(\text{DNA}) = A_{260}(\text{Kon}) - A_{260}(\text{Mb})$$

Zur Berechnung des stöchiometrischen Verhältnisses des Myoglobin-DNA Konjugats, wurde zunächst das Absorptionsverhältnis  $A_{410}/A_{260}$  von nativem Myoglobin ermittelt (Abbildung 30A). Das berechnete Verhältnis von 4,1 konnte anschließend dazu verwendet werden, die Absorption des Proteinanteils von der gemessenen Absorption bei 260 nm nach Formel (I) im Konjugat zu verrechnen. Der Absorptionsanteil des Proteins ( $A_{260}(\text{Mb})$ ) kann nach dem berechneten Verhältnisses von  $A_{410}/A_{260}$  wie folgt definiert werden:

$$(II) A_{260}(\text{Mb}) = \frac{A_{410}(\text{Kon})}{4,1}$$

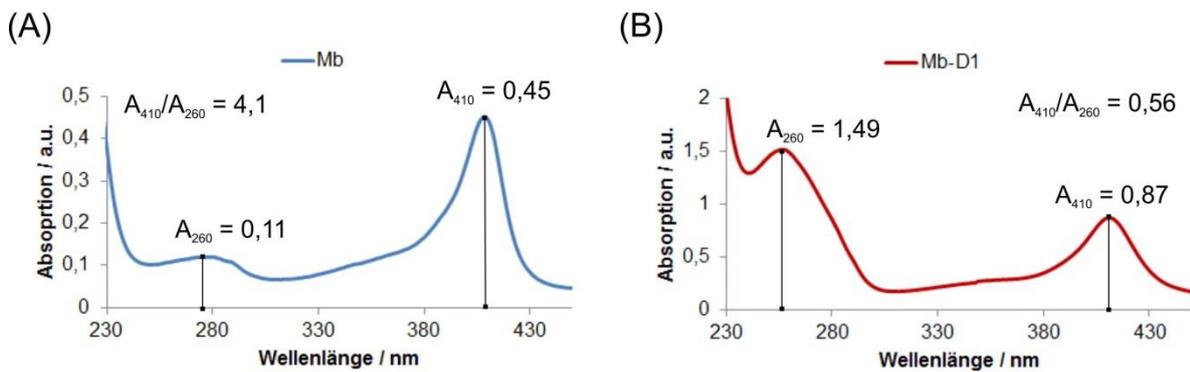
Also gilt durch das Einsetzen in Formel (I):

$$(III) A_{260}(\text{DNA}) = A_{260}(\text{Kon}) - \frac{A_{410}(\text{Kon})}{4,1}$$

Daraus folgt für die Konzentrationsbestimmung über das Lambert Beersche Gesetz:

$$(IV) \ c(\text{DNA}) = \frac{A_{260}(\text{Kon}) - \frac{A_{410}(\text{Kon})}{4,1}}{\epsilon(\text{DNA}) * d}$$

Zur Berechnung der stöchiometrischen Verhältnisse wurde die einzelnen Fraktionen der FPLC Reinigung (vgl. Kapitel 3.1.4) mittels UV-Vis Spektroskopie analysiert. Die Konzentrationen der DNA innerhalb der Fraktionen wurden anschließend über die Formel (IV) berechnet und das Verhältnis  $c(\text{D1}):c(\text{Mb})$  ermittelt. In Abbildung 30B ist das UV-Vis Spektrum des hergestellten Protein-DNA Konjugats dargestellt, während in der Tabelle 4 die berechneten Konzentration und ermittelten stöchiometrischen Verhältnisse der einzelnen Fraktionen der FPLC Aufreinigung (vgl. Kapitel 3.1.4) gezeigt sind.



**Abbildung 30** (A) UV-Vis Spektrum des nativen Myoglobins (**Mb**) und das berechnete Verhältnis der Absorptionen bei 410 nm und 260 nm. (B) UV-Vis Spektrum des isolierten und konzentrierten **Mb-D1** Konjugats.

**Tabelle 4:** Gemessenen Absorption bei 260 nm bzw. 410 nm der aufgereinigten FPLC Fraktionen aus Kapitel 3.1.4. Die Konzentration der ssDNA **FMP-D1** ( $\epsilon=127200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) wurde über die Formel (IV) berechnet, während die Konzentration des Myoglobins über den Soretpeak bei 410 nm ( $\epsilon=171000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) unter Anwendung des Lambert Beerschen Gesetztes bestimmt wurde. Das Verhältnis von DNA:Mb konnte über die berechneten Konzentrationen ermittelt werden.

Fraktion	$A_{410}$	$A_{260}$	$c(\text{DNA})$ [ $\mu\text{M}$ ]	$c(\text{Mb})$ [ $\mu\text{M}$ ]	$A_{410}/A_{260}$	Verhältnis (DNA/Mb)
<b>F1</b>	0,90	0,30	0,63	5,26	3	0,1
<b>F2</b>	0,64	1,11	7,51	3,78	0,5	1,9
<b>F3</b>	0,09	0,88	6,72	0,53	0,1	12,7

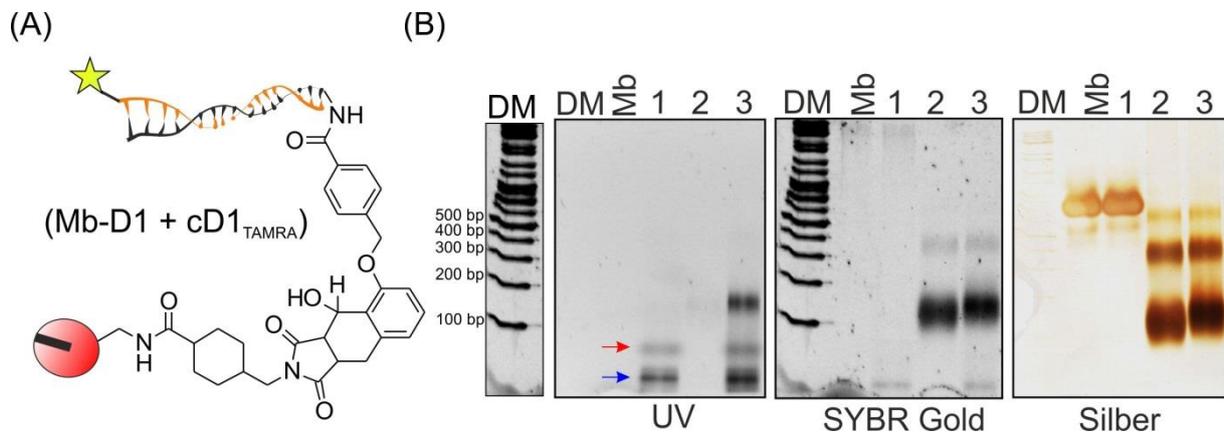
Bei der Fraktion F1 konnte ein Verhältnis von DNA/Mb von 0,1 ermittelt werden, welches die Theorie und nPAGE Analysen unterstützt, dass es sich hierbei hauptsächlich um die Maleimid modifiziertes **Mb** handelt. Die Abweichung des  $A_{410}/A_{260}$  Verhältnis dieser Fraktion ( $A_{410}/A_{280}(F1) = 3$ ) im Gegensatz zum nativen Myoglobin ( $A_{410}/A_{260}(Mb) = 4,1$ ) könnte in der unzureichenden Trennung der F1 und F2 Fraktionen begründet liegen. Somit könnte ein geringer Anteil der Protein-Konjugats ebenfalls in der Fraktion F1 vorliegen, welches aufgrund von zu geringer Konzentration nicht eindeutig in der nPAGE Analyse detektiert werden konnte und das  $A_{410}/A_{260}$  Verhältnis durch den Eigenabsorptionsanteil der Nukleobasen bei 280 nm reduziert. Ein weiterer Grund könnte das Vorhandensein von Apo-Myoglobin sein, welches an der Destabilisierung des Kofaktors Häm durch spezifische Lysinmodifizierung in der Nähe des aktiven Zentrums hervorgerufen worden sein könnte. Die Fraktion F2 hingegen weist ein Verhältnis zwischen DNA/Mb von 1,9 auf, welches einen Anteil von 1,9 ssDNA Molekülen pro Protein im Durchschnitt widerspiegelt. In der der Fraktion F2 könnte somit eine Mischung aus mono-, bi- und tri- konjugierte Protein-DNA Spezies vorliegen, welche ebenfalls in den nPAGE Charakterisierungen beobachtet werden konnten (vgl. Abbildung 28B). Die Fraktion F3 weist mit einem Wert von 12,7 das höchste DNA zu Mb Verhältnis auf, welches die nPAGE Charakterisierungen und Aussagen verifiziert, dass es sich hierbei größtenteils um nicht reagierte **FMP-D1** ssDNA handelt.

Durch die ermittelte DNA Konzentration im **Mb-Mal** Konjugat der Fraktion F2, konnte ebenfalls der Stoffmengenanteil der DNA im Konjugat bestimmt werden (Gesamtvolumen der Fraktion F2: 200  $\mu$ L). Mit einer Stoffmenge von ca. 1,5 nmol ssDNA lässt sich hierbei eine Ausbeute in Bezug auf die eingesetzte DNA Menge (20 nmol) von ca. 7,5 % ermitteln. Diese Ausbeute ist vergleichbar mit der herkömmlich verwendeten chemischen Konjugationsstrategie mittels sSMCC, welche in der Arbeitsgruppe Fruk durchgeführt worden sind (Ausbeuten ebenfalls zwischen ca. 7 % und 15 %, Daten nicht gezeigt).

### 3.1.6 Hybridisierungsfähigkeit des lichtinduzierten Protein-DNA Konjugats

Um eine zukünftige Anwendung des Protein-DNA Konjugats für eine DNA vermittelte Immobilisierung zu gewährleisten, sollte die Hybridisierungseffizienz des Konjugats getestet werden. Hierzu wurde das gereinigte und charakterisierte Konjugat **Mb-D1** mittels einer komplementären TAMRA 5'-modifizierten ssDNA **cD1<sub>TAMRA</sub>** (Tabelle 1) hybridisiert. Die Effizienz der Hybridisierung wurde mit nicht denaturierender Polyacrylamidgelelektrophorese (Abbildung 31) und unter Verwendung eines *GelDoc<sup>TM</sup> XR Imaging System* der Firma

*Biorad* charakterisiert. Zur Durchführung wurde zunächst die Konzentration des Konjugats über die Soretbande des Myoglobins bestimmt (vgl. Kapitel 3.1.5). Anschließend wurden 40 pmol der isolierten Konjugatprobe für ca. 30 min bei Raumtemperatur mit einem 10 fachen Überschuss **cD1<sub>TAMRA</sub>** inkubiert und auf das nPA-Gel aufgetragen. Hierbei wurde ein 10facher Überschuss gewählt, um eine vollständige Hybridisierung zu gewährleisten (berechnete stöchiometrische Verhältnis Mb:DNA von 1:1,9; vgl. Kapitel 3.1.5). Zusätzlich wurden als Kontrolle das native **Mb** mit der modifizierten ssDNA **FMP-D1** und **cD1<sub>TAMRA</sub>** unter den gleichen Konditionen inkubiert (Verhältnis **Mb:FMP-D1:cD1<sub>TAMRA</sub>** von 1:1:1).



**Abbildung 31:** Hybridisierungstest des **FMP-D1** Konjugats mit der fluoreszierenden komplementären ssDNA **cD1<sub>TAMRA</sub>** und die Charakterisierung mittels nPAGE. **DM:** 10 kbp DNA-Marker; **Mb:** natives Myoglobin; **1:** **Negativ Kontrolle**, **Mb** inkubiert mit **FMP-D1** und **cD1<sub>TAMRA</sub>**; **2:** **Mb-D1** Konjugat; **3:** **Mb-D1** Konjugat inkubiert mit einem 10 fachen Überschuss an **cD1<sub>TAMRA</sub>**; **Konditionen:** 12,5 % PA-Gel, 120 V; **Lauf-puffer:** Tris-Glycin; **Reihenfolge der Visualisierung:** 1) UV-Anregung 2) SybrGold®-Färbung, 2) Silber-färbung.

Das Gel wurde in drei Schritten charakterisiert. In einem ersten Schritt wurde das Gel ohne Färbung zunächst unter UV Bestrahlung visualisiert. Durch diesen Prozess konnte die Position der TAMRA markierte DNA auf dem Gel detektiert werden. In folgenden Färbeschritten wurde das Gel zunächst mit SybrGold® angefärbt, um die ssDNA zu visualisieren und anschließend mittels Silberfärbung, um eine Proteinfärbung durchzuführen.

Wie bereits in Kapitel 3.1.4 und 3.1.5 erläutert, liegen in der isolierten **Mb-D1** Probe einfach und mehrfach konjugierte Spezies vor. Dies wird ebenfalls durch den Hybridisierungstest in Bahn 3 bestätigt. Bei der Betrachtung des Gels in der Abbildung 31B kann erkannt werden, dass die detektierten Spezies in Bahn 3 (**Mb-D1 + cD1<sub>TAMRA</sub>**) nach der Silberfärbung eine langsamere elektrophoretische Mobilität aufweisen, als die reinen isolierten **Mb-D1** Spezies in Bahn 2. Hierbei lässt sich die langsamere Mobilität über eine

erhöhte Masse der Hybridisierungsprodukte erklären und verifiziert somit eine erfolgreiche Hybridisierung der **Mb-D1** Spezies mit der komplementären DNA **cD1<sub>TAMRA</sub>**. Eine erfolgreiche Hybridisierung des detektierten Hauptproduktes zwischen 100 bp und 200 bp (Anteil ca. 75 %) wird ebenfalls durch die UV-Aufnahme bestätigt. In diesem Fall kann eine deutliche Bande zwischen 100 bp und 200 bp erkannt werden, welche ebenfalls mit SYBR Gold und Silber angefärbt werden kann und somit das Vorhandensein von **cD1<sub>TAMRA</sub>** und **Mb-D1** bestätigt. Eine Bestätigung, dass die Hybridisierungen durch eine spezifische Watson-Crick Basenpaarung erfolgt, kann bei der Betrachtung der Negativkontrolle in Bahn 1 (**Mb + FMP-D1 + cD1<sub>TAMRA</sub>**) erkannt werden, da die Kontrollprobe keine veränderte Mobilität gegenüber nativen **Mb** aufweist.

Die bereits in Kapitel 3.1.4 erwähnten Nebenprodukte bei ca. 300 bp (Anteil ca. 19 %) bzw. ca. 500 bp (Anteil ca. 6 %) weisen nach der Silberfärbung ebenfalls eine geringere Mobilität auf, als die reinen Spezies in Bahn 2, können jedoch nicht unter UV detektiert werden. Ebenfalls kann nach der SybrGold<sup>®</sup>-Färbung nur das Nebenprodukt bei ca. 300 bp angefärbt werden, während das zweite Nebenprodukt bei ca. 500 bp nicht visualisiert wird. Ein Grund könnte hier die Sensitivität des verwendeten *GelDoc<sup>TM</sup> XR Imaging System* sein. Die hohe Konzentration des hybridisierten Hauptproduktes könnte die detektierte Fluoreszenz der Nebenprodukte nach der UV Anregung überstrahlen, so dass die Produkte nicht mehr detektiert werden können. Das gleiche Phänomen könnte für das Nebenprodukt bei ca. 500 bp nach der SybrGold<sup>®</sup>-Färbung gelten, da der geringe Anteil von 6 % eine sensitive Färbung der Spezies erschwert bzw. der hohe Anteil der anderen beiden Spezies die Fluoreszenzdetektion überdeckt. Aufgrund der langsameren Mobilität gegenüber der nicht hybridisierten Proben in Bahn 2, kann jedoch davon ausgegangen werden, dass es sich hierbei um mehrfach konjugierte (wie bi- bzw. tri-) DNA-Protein Spezies handelt, die aufgrund der verwendeten FPLC Konditionen nicht voneinander abgetrennt werden konnten.

Des Weiteren kann erkannt werden, dass sowohl bei der Negativkontrolle in Bahn 1, als auch bei der hybridisierten Probe in Bahn 3, zwei weitere Banden nach der UV Bestrahlung bei knapp unter 100 bp (blauer Pfeil bzw. roter Pfeil) auftreten. Während sich die Spezies mit einer schnelleren Mobilität (blauer Pfeil) ebenfalls mit SybrGold anfärben lässt, kann die zweite Spezies nicht mit SybrGold<sup>®</sup> angefärbt werden. Eine Silberfärbung ist bei beiden Spezies nicht möglich. Die Spezies bei 100 bp (roter Pfeil) repräsentiert hier höchstwahrscheinlich das Fluorophor TAMRA, welches durch eine längere Lagerungszeit in wässriger Ladungskondition und Gefrierung bei -20 °C als Destabilisierungsprodukt von

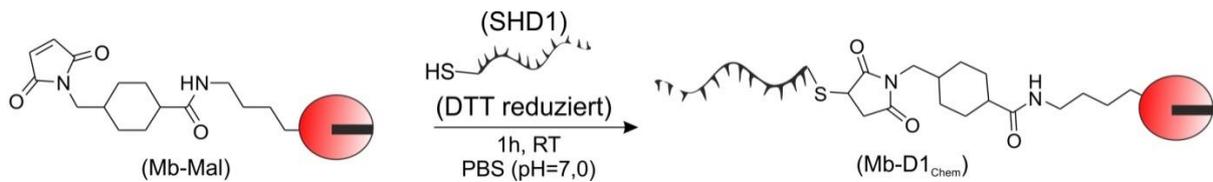
ssDNA abgespalten wurde. Das zweite Produkt (blauer Pfeil) kann aufgrund der positiven SybrGold®-Färbung den hybridisierten Einzelsträngen **FMP-D1** und **cD1<sub>TAMRA</sub>** (Verhältnis 1:1) der negative Kontrolle in Bahn 1, bzw. dem überschüssigen (10fach) nicht hybridisierten komplementären Einzelstrang **cD1<sub>TAMRA</sub>** in Bahn 3 zugeordnet werden. Ein Unterschied der DNA Stränge in Bezug auf Mobilität der beiden Spezies kann nicht erkannt werden, da die verwendete Gelkondition von 12,5 % Polyacrylamid die Auftrennung von hybridisierten Stränge in Bahn 1 und der nicht hybridisierten Einzelsträngen in Bahn 3 mit einer Größe von 12 bp (ca. 4 nm) erschwert.

Zusammenfassend lässt sich in diesem Kapitel sagen, dass eine erfolgreiche Hybridisierung der Protein-DNA Konjugat Spezies mit der komplementären ssDNA durchgeführt werden konnte. Dies wurde durch eine eindeutige Detektion der hybridisierten Produkte sowohl unter UV als auch nach der SybrGold®- bzw. Silberfärbung verifiziert. Ebenfalls konnte eine deutliche Änderung des Laufverhaltens nach der Hybridisierung detektiert werden.

In einem nächsten Schritt sollte die Aktivität des Konjugats getestet werden. Die Ergebnisse sind in dem folgenden Kapitel dargestellt.

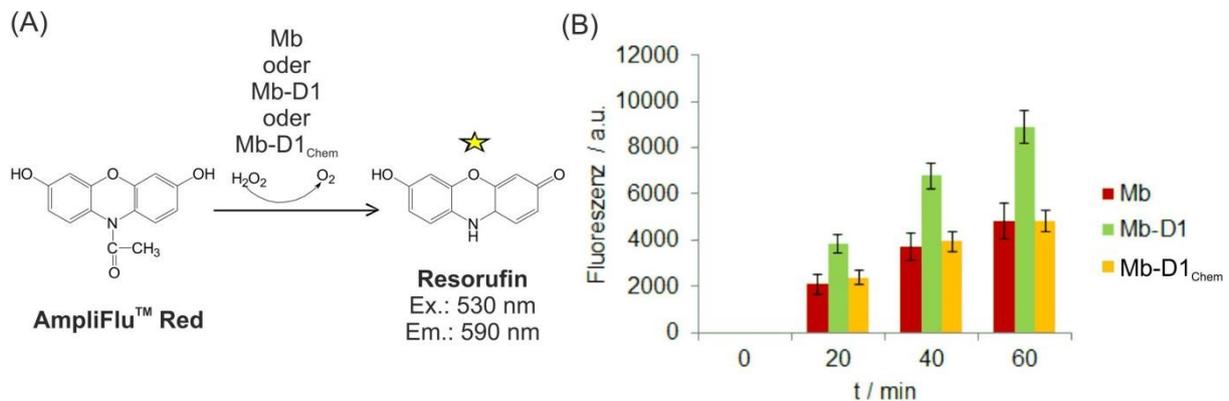
### 3.1.7 Aktivitätstest des lichtinduzierten DNA-Myoglobin Konjugats

Um die Aktivität des hergestellten Konjugats zu testen, wurde als Vergleichsprobe ein Protein-DNA Konjugat verwendet, welches über eine herkömmliche Konjugationsstrategie hergestellt wurde und im Folgenden als **Mb-D1<sub>Chem</sub>** bezeichnet wurde. Hierzu wurde das im Kapitel 3.1.4 hergestellte **Mb-Mal** zusätzlich mit einer 5'-Thiol modifizierten ssDNA (**SHD1**; vgl. hierzu Tabelle 1) umgesetzt, und somit die Konjugation über eine Michael-Reaktion zwischen dem sekundären Thiol und der Maleimid Gruppe durchgeführt (Abbildung 32). Zur Durchführung der Konjugation wurde die **SHD1** ssDNA zunächst mit dem Reagenz Dithiothreitol (DTT) behandelt, um die vorhandenen Disulfidbrücken zwischen den einzelnen Einzelsträngen zu reduzieren. Das DTT wurde anschließend mittels Gelfiltrationssäulen entfernt, ein Pufferwechsel durchgeführt und die chemische Konjugation für eine Stunde bei Raumtemperatur (RT) durchgeführt. Das Konjugat wurde mittels Anionenaustauschchromatographie gereinigt und das isolierte Konjugat für die Tests verwendet. In diesem Fall konnte ein stöchiometrisches Verhältnis zwischen c(DNA) und c(Mb) von 1,3 ermittelt werden, welches einen Anteil von 1,3 ssDNA Molekülen pro Protein im Durchschnitt widerspiegelt (vgl. Anhang Kapitel 11.1.1, Seite 235).



**Abbildung 32:** Schematische Darstellung der chemischen Modifizierung von **Mb-Mal** mit 5'-Thiol modifizierter ssDNA **SHD1**. Die DNA wurde vor der Inkubation für 1 h bei Raumtemperatur (RT) mittels Dithiothreitol (DTT) behandelt, um die Disulfidbrückenbindungen der **SHD1** zu reduzieren. Das chemisch hergestellte Konjugat **Mb-D1<sub>Chem</sub>** wurde als Vergleichsprobe zum Aktivitätstest des lichtinduzierten **Mb-D1** Konjugats herangezogen.

Um die Aktivität der einzelnen Proben zu beurteilen und zu analysieren, wurde der in Kapitel erwähnte AmpliFlu<sup>TM</sup> Assay durchgeführt, indem die Umsetzung des Substrats AmpliFlu<sup>TM</sup> Red zu Resorufin in Anwesenheit von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und Peroxidase in Abhängigkeit der Zeit verfolgt wurde (Abbildung 33). Für jede einzelne Probe wurde eine 4fach Bestimmung durchgeführt, indem jeweils 1 pmol an Protein eingesetzt wurde. Die Bildung des fluoreszierenden Produktes wurde über einen Zeitraum von einer Stunde detektiert (Abbildung 33B).



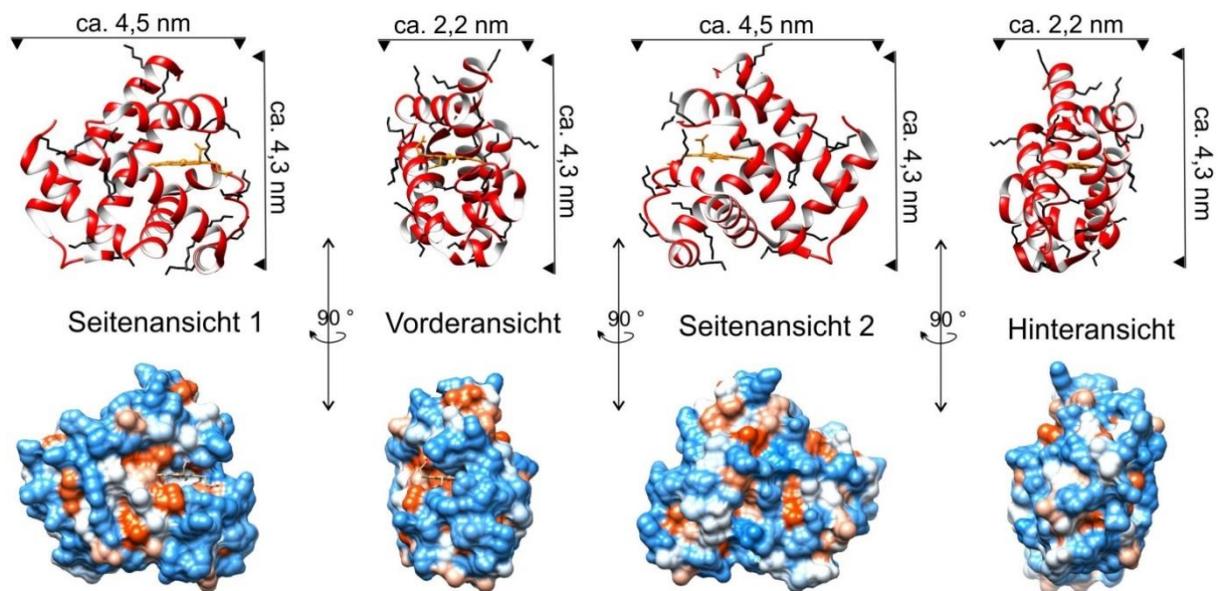
**Abbildung 33:** (A) Umsetzung des Substrates AmpliFlu<sup>TM</sup> Red zu dem fluoreszierenden Produkt Resorufin in Anwesenheit von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und den getesteten Myoglobin Spezies. Die Fluoreszenz des fluoreszierenden Farbstoffs Resorufin wird bei einer Emissionswellenlänge von 590 nm verfolgt, nach Anregung bei 530 nm. (B) AmpliFlu<sup>TM</sup> Red Aktivitätstest des lichtinduzierten Konjugats **Mb-D1** im Vergleich zum nativen Myoglobin (**Mb**) und dem chemisch hergestellten Konjugat **Mb-D1<sub>Chem</sub>**. **Endkonzentration:** 50 µM Amplex<sup>®</sup> Red, 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und 10 nM **Mb** bzw. **Mb-D1** oder **Mb-D1<sub>Chem</sub>**.

In Abbildung 33B ist eine deutliche Steigerung der Fluoreszenz zu beobachten, die durch eine erfolgreiche Oxidation des AmpliFlu<sup>TM</sup> Substrats in das fluoreszierende Produkt Resorufin erklärt werden kann. Im Vergleich der Fluoreszenzwerte des lichtinduzierten

hergestellten Konjugats **Mb-D1** zu dem nativen Myoglobin **Mb** sind deutliche höhere Fluoreszenzsignale beim Konjugat zu beobachten, die im Durchschnitt 2mal höher sind, als die des nativen **Mb**. Der Vergleich der Fluoreszenzsignale des **Mb-D1** Konjugats mit dem **Mb-D1<sub>Chem</sub>** Konjugat zeigt, dass das **Mb-D1<sub>Chem</sub>** Konjugat eine niedrigere Aktivität aufweist, als das durch Lichtinduktion hergestellte **Mb-D1** Konjugat. Der Effekt einer Aktivitätssteigerung einer Myoglobin konjugierten DNA Spezies konnte bereits in früheren Studien beobachtet werden<sup>42, 43, 46</sup>, in welcher unterschiedlichste Mb-DNA Konjugate untereinander und in Bezug auf natives **Mb** verglichen wurden. Mithilfe der früheren Untersuchungen kann die Hypothese aufgestellt werden, dass eine Aktivitätssteigerung in der Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen oder elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen der konjugierten ssDNA und der Proteinhülle begründet liegt. Diese Wechselwirkungen könnten wiederum eine strukturelle oder elektrostatische Änderung in der Umgebung des reaktiven Zentrums des Proteins verursachen, wodurch eine Substrataufnahme erleichtert werden könnte. Eine genauere Analyse dieser Theorie konnte jedoch bis zum heutigen Tag nicht durchgeführt und verifiziert werden. Trotzdem könnte das berechnete stöchiometrische Verhältnis des lichtinduzierten **Mb-D1** Konjugats von 1,9 ssDNA Moleküle pro Protein auf der Oberfläche (vgl. Kapitel 3.1.5) eine erhöhte Aktivität begründen, da im Durchschnitt pro Protein mehr ssDNA Moleküle zur Interaktion mit dem aktiven Zentrum zur Verfügung stehen, als im chemisch hergestellten **Mb-D1<sub>Chem</sub>** Konjugat (1,3 ssDNA Moleküle pro **Mb**).

In diesem Zusammenhang muss jedoch beachtet werden, dass die Untersuchungen von Glettenberg *et al.*<sup>46</sup> und Fruk *et al.*<sup>42, 43</sup> eine hohe Regioselektivität der chemisch hergestellten Protein-DNA Konjugate zuließ, da die Herstellung über die Rekonstitution von Apo-Myoglobin<sup>42</sup> mit synthetisierten Häm-Oligonukleotid Konjugaten erfolgte. Durch diese Art und Weise konnten Protein-DNA Konjugate entwickelt werden, in der die verwendeten Oligonukleotide nah am aktiven Zentrum und zusätzlich immer an derselben Position lokalisiert waren. Eine regioselektive Modifizierung des Proteins mittels der hier angewandten Techniken ist jedoch nicht möglich, da die Lysinreste weit verteilt auf der Proteinoberfläche vorliegen (Abbildung 26 und Abbildung 34) und sowohl die Maleimid Modifizierung als auch die anschließende Konjugation der ssDNA bei jeder praktischen Durchführung von Versuch zu Versuch variieren kann. Somit könnten die DNA Stränge des **Mb-D1** bzw. **Mb-D1<sub>Chem</sub>** Konjugates unterschiedliche Lokalisierungen zum aktiven Zentrum aufweisen, welche die Aktivitäten der lichtinduzierten und der chemisch hergestellten Konjugate abweichend beeinflussen könnten.

Für eine genauere Darstellung dieses Phänomens, sind in Abbildung 34 die Lysinpositionen und die jeweiligen Van-der-Waals-Oberflächen des nativen Myoglobins in vier unterschiedlichen Ansichten dargestellt. In der Seitenansicht und der Vorderansicht ist deutlich zu erkennen, dass ein dichter hydrophiler Bereich direkt am aktiven Zentrum des Myoglobins vorliegt. Eine ssDNA Modifizierung der Lysine in diesem Bereich könnte das aktive Zentrum des Proteins durch elektrostatische Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen beeinflussen und eine Änderung der Umgebung des reaktiven Zentrums verursachen. Werden jedoch bevorzugt die Lysine in im definierten „hinteren“ Bereich (Hinteransicht) modifiziert, so wird eine Wechselwirkung der ssDNA mit der Oberfläche am aktiven Zentrum erschwert, da die verwendete ssDNA eine Sequenz aus 12 bp besitzt (ca. 4 nm in der Länge) und somit zu weit entfernt sein könnte, um direkt mit dem aktiven Zentrum zu interagieren. Aus diesem Grund könnten die unterschiedlichen Aktivitäten der **Mb-D1** und **Mb-D1<sub>Chem</sub>** Konjugate durch unterschiedliche Modifikationspositionen der ssDNA auf der Oberfläche des Proteins hervorgerufen worden sein.



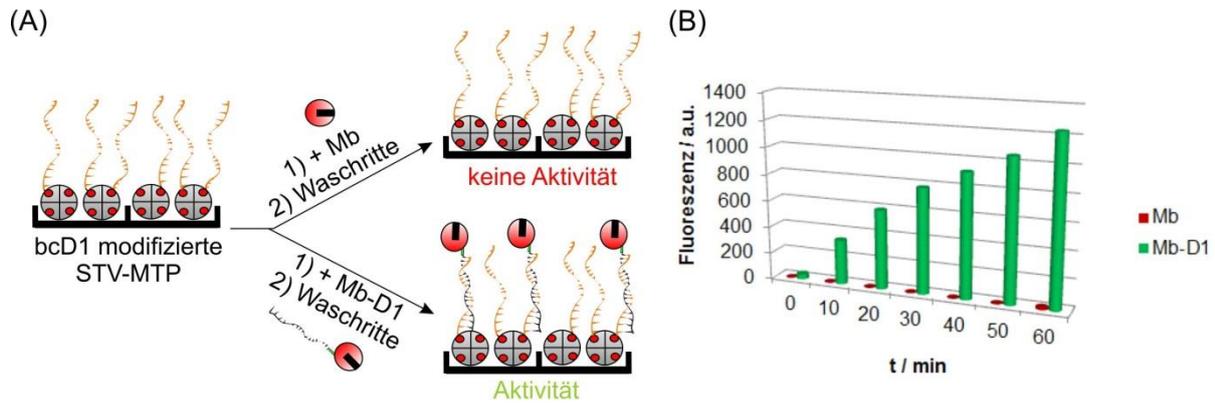
**Abbildung 34:** Darstellung der Tertiärstruktur von nativem Myoglobin **Mb** in selbst definierten Vorder-, Hinter- und Seitenansichten. Der Kofaktor Häm ist orange dargestellt während die Lysinpositionen des Proteins schwarz markiert wurden. Die unteren Darstellungen zeigen die Van-der-Waals Oberflächen der jeweiligen Darstellungen. Hierbei sind die hydrophilen Bereiche blau dargestellt, während die Hydrophobie über weiß nach orange (für die hydrophoben Bereiche) abnimmt. Die Abbildung, sowie die angegebenen Größenordnungen wurde mittels des Computerprogramms Chimera 1.9 erstellt, indem die Datei 3LR7 der Proteindatenbank verwendet wurde.

Trotz der unkontrollierten Regioselektivität konnte eindeutig gezeigt werden, dass sowohl die Bestrahlung als auch die damit verbundene ssDNA Konjugation keinen negativen Einfluss auf die Aktivität ausübt, sondern im Gegensatz zu einer Aktivitätssteigerung führt, die weitaus höher liegt als die des nativen Myoglobins.

In einem nächsten Versuch wurde getestet, ob sich das **Mb-D1** Konjugat mittels DNA vermittelter Immobilisierung (DDI) auf Oberflächen „fixieren“ lässt. Die Ergebnisse sind in dem folgenden Kapitel dargestellt.

### 3.1.8 DNA direkte Immobilisierung des lichtinduzierten DNA-Myoglobin Konjugats

Für die DNA direkte Immobilisierung (DDI) wurden zunächst Streptavidin (**STV**) beschichtete Mikrotiterplatten (MTPs) nach bekannten Literaturprotokollen hergestellt.<sup>164</sup> Da das Substrat Biotin mit einer sehr hohen Affinität an STV bindet (vgl. Einleitung Kapitel 2.2.1), konnte anschließend eine 5'-biotinylierte komplementäre ssDNA (**bcD1**; vgl. Tabelle 1) dazu verwendet werden, die Oberfläche mittels eines komplementären Fängeroligonukleotids zu modifizieren. Die einzelnen **bcD1** beschichteten MTP Kavitäten wurden anschließend für ca. 1h bei Raumtemperatur mit 50 pmol der **Mb-D1** Konjugats inkubiert. Als Negativkontrolle wurden ebenfalls einige Kavitäten mit 50 pmol nativen Myoglobin versetzt. Die Platten wurden nach der Inkubation mehrmals gewaschen und anschließend ein AmpliFlu<sup>Tm</sup> Assay durchgeführt (Abbildung 35A). Durch die Waschprozesse wurde gewährleistet, dass nur die immobilisierten **Mb-D1** Konjugate auf der Oberfläche verweilen, während das nicht „fixierte“ native Myoglobin durch die Waschprozesse aus den Kavitäten entfernt wurde.



**Abbildung 35:** (A) Schematische Darstellung der DNA direkten Immobilisierung (DDI) des lichtinduzierten Konjugats **Mb-Mal** auf **bcD1** beschichtete Mikrotiterplatten (MTP). Die MTP wurde zunächst mittels Streptavidin (**STV**) beschichtet und anschließend mittels biotinylierter komplementärer **cd1** ssDNA (**bcD1**) modifiziert. Als Negativkontrolle wurden die modifizierte MTP ebenfalls mittels nativen Myoglobin (**Mb**) behandelt. (B) AmpliFu™ Red Aktivitätstest des auf der Oberfläche immobilisierten Konjugats **Mb-D1** im Vergleich zur Negativkontrolle **Mb**.

In Abbildung 35B ist zu erkennen, dass die **Mb-D1** Probe eine steigende Fluoreszenz aufweist, welches eine erfolgreiche Immobilisierung des Konjugats auf die **bcD1** modifizierten MTP Oberflächen belegt. Die selektive Immobilisierung des Konjugats über Watson-Crick Basenpaarung wird durch die Negativkontrolle bestätigt, da in diesem Fall weitestgehend keine oder vernachlässigbare niedrigere Fluoreszenz beobachtet werden kann.

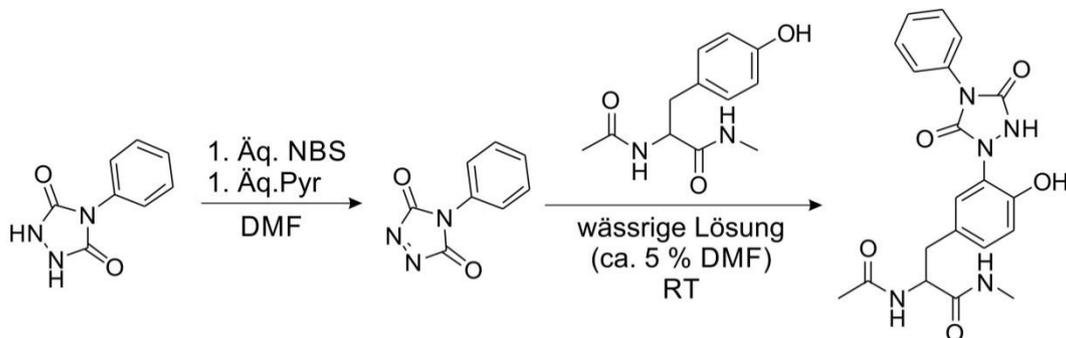
Die in diesem Kapitel demonstrierten Ergebnisse zeigen eine milde Methodik zur Herstellung von Protein-DNA Konjugaten mittels lichtaktivierbarer [2+4] Cycloaddition. Eine Einzelstrang DNA wurde das erste Mal mittels einem hetero-bifunktionelle FMP-Derivat (4-((2-Formyl-3-methyl-phenoxy)methyl)benzoesäure) chemisch modifiziert und selektiv über eine lichtinduzierten-Click-Ligation mit Maleimid funktionalisierten Myoglobin konjugiert. Der Peroxidase Test wies eine beträchtliche Aktivitätssteigerung gegenüber nativen **Mb** auf und die isolierte Konjugatspezies konnte für die DNA direkte Immobilisierung auf Oberflächen verwendet werden. Diese Erkenntnisse könnten neben neuartigen orthogonalen Techniken zur milden Protein-DNA Konjugation ebenfalls neue Anwendung zur Herstellung katalytischer Plattformen bieten. Hierzu könnte Licht verwendet werden, um eine selektive und kontrollierbare Konjugation von modifizierter FMP-DNA, wie z.B. bei der Dekoration von DNA-Origami, mit Maleimid funktionalisierten (Bio-)Molekülen durchzuführen.

Als Nachteil dieser Reaktion ist sicherlich die unkontrollierbare Regioselektivität in Bezug auf die Modifizierung der Lysine mittels sSMCC zu benennen. In diesem Zusammenhang

könnte die anschließende ssDNA Konjugation an unterschiedliche Positionen, abweichende Einflüsse auf die Aktivität des Myoglobins hervorrufen. Eine regioselektive Reaktion, speziell in Fallbeispiel des Proteins Myoglobin, welche für eine DNA-Protein Konjugation über natürlich vorkommende Aminosäuren verwendet werden kann, ist im folgenden Kapitel dargestellt.

### 3.2 Protein-DNA Konjugation über Tyrosin

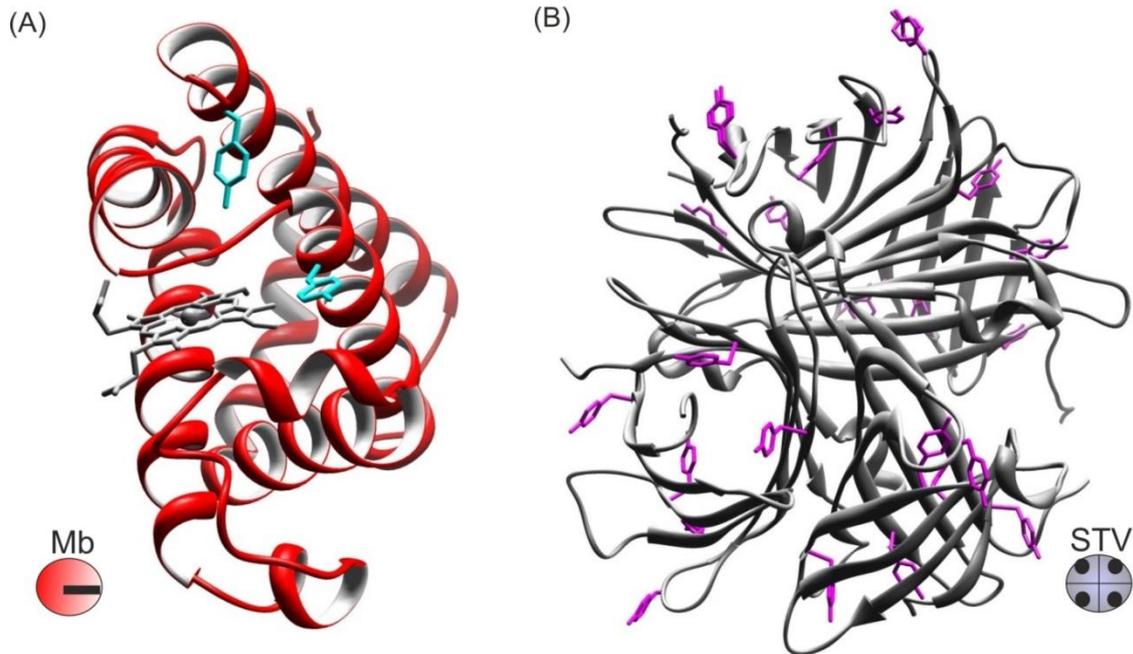
Für eine Modifizierung der natürlichen Aminosäure Tyrosin (Tyr) wurde in dieser Arbeit eine Ene-artige Reaktion ausgewählt, die im Jahre 2009 von Ban *et al.* beschrieben wurde.<sup>165</sup> In dieser Veröffentlichung konnte die Azodicarbonylverbindung 4-Phenyl-1,2,4-triazolin-3,5-dion (**PTAD**; Abbildung 36) als hoch reaktives Elektrophil verwendet werden, welches ermöglichte innerhalb von Minuten Tyrosine verschiedener Peptide und Proteine mit einem Fluorophor zu modifizieren. Für die selektive Modifizierung des Tyrosins wurde die zyklische Diazodicarboxygruppe des **PTAD** zunächst mit 1 Äq. N-Bromsuccinimid (NBS) und 1 Äq. Pyridin (Pyr) in DMF für 5 min aktiviert und anschließend innerhalb von Minuten in wässriger Lösung mit der natürlichen Aminosäure Tyrosin umgesetzt (Abbildung 36). Die Aktivierung der Diazodicarboxyamid Gruppe konnte durch einen Farbwechsel von farblos zu Rot verfolgt werden. Die Reaktion verlief in einem weiten pH Bereich (pH 2 – pH 10) mit hohen Ausbeuten (50 % - 98 %) erfolgreich. Speziell in physiologischen pH Bereichen konnten hohe Ausbeuten bis zu 90 % erzielt werden. Diese Konditionen bieten die besten Voraussetzungen zum Einsatz dieser funktionellen Gruppe im Bereich der Biokonjugation und sollten aus diesem Grund auf die Herstellung von Protein-DNA Konjugaten übertragen werden.



**Abbildung 36:** Schema für die Modifizierung der natürlichen Aminosäure Tyrosin über eine Ene-artige Reaktion mit **PTAD** in wässriger Lösung bei Raumtemperatur (RT) nach Ban *et al.*<sup>165</sup>

Als Zielproteine wurden das kommerziell erwerbliche Protein Myoglobin (**Mb**) vom Pferdeherz und Streptavidin (**STV**) verwendet. Beide Proteine besitzen keine Cysteinreste, welches ermöglichte, bi-funktionelle Crosslinker mit PTAD und einer Maleimidfunktion zu versehen. Eine thiol-modifizierte DNA kann somit direkt über eine Thiol-Michael-Addition an das modifizierte Protein gekuppelt werden. Bei Modelproteinen mit Cysteinen könnten Kreuzreaktionen über Tyr-Linker-Cys Brücken oder intramolekulare „Verbrückungen“ der Linker auf der Proteinoberfläche entstehen, welche eine kontrollierte Reaktion stören könnten.

Des Weiteren weisen beide Proteine unterschiedliche Anzahlen von Tyrosinresten auf und können somit in Bezug auf ihre Modifizierungseffizienz verglichen werden (Abbildung 37). Während **STV** insgesamt 24 Tyrosinreste (6 Tyrosinreste per Monomereinheit) weit verteilt in seiner Struktur aufweist, besitzt **Mb** nur zwei (Tyr146 und Tyr103). Ein Rest befindet sich dabei in der Nähe des C-Terminus (Tyr146) und der zweite in näherer Umgebung des katalytischen Häm-Zentrums (Tyr103). Speziell im Fall des Myoglobins kann durch eine gezielte Tyrosinmodifizierung eine höhere Regioselektivität im Gegensatz zur herkömmlichen sSMCC Modifizierung über Lysine erreicht werden (vgl. Kapitel 3.1). Des Weiteren könnte eine regioselektive Konjugation des **Mb** mit DNA in der Nähe des aktiven Zentrums eine Steigerung der Peroxidaseaktivität hervorrufen<sup>42, 43, 46</sup>(vgl. Kapitel 3.1.7).



**Abbildung 37:** Tyrosin Positionen im Protein Myoglobin (**Mb**) vom Pferdeherz (**A**) und dem Tetramer Streptavidin (**STV**) (**B**). Während Myoglobin zwei Tyrosinreste aufweist (Abbildung 37A; blau markiert), besitzt Streptavidin 24 Tyrosine (6 Tyrosine pro Monomer; Abbildung 37B; lila markiert). Pdb-Dateien: 3LR7(**Mb**) und 1STP(**STV**).

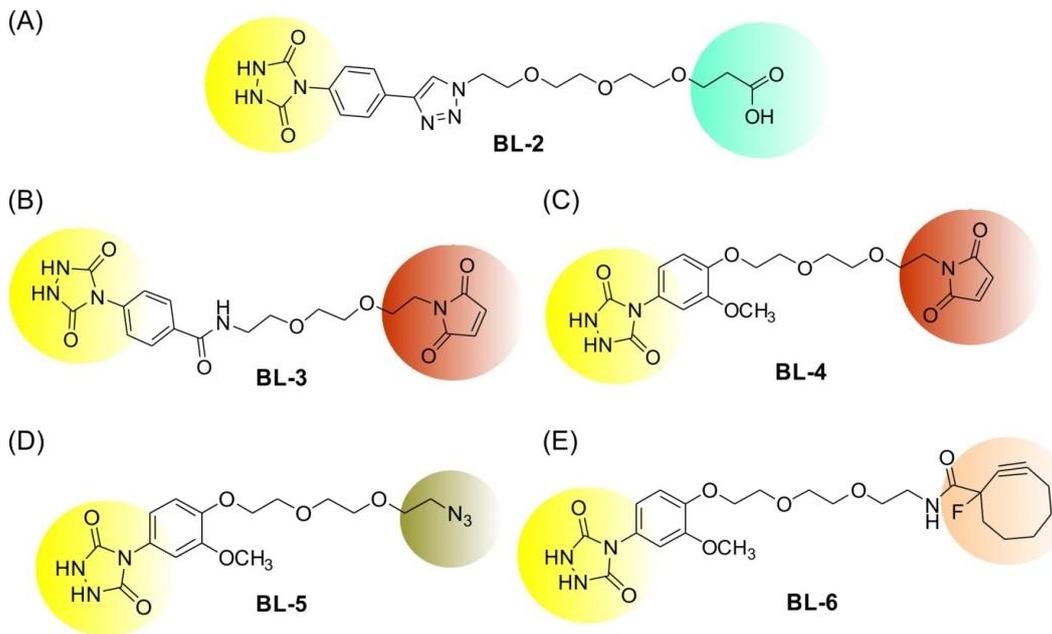
Im vorliegenden Kapitel werden nun die wichtigsten Ergebnisse erläutert, welche eine erfolgreiche Modifizierung von Tyrosinen mit DNA über speziell gestaltete bifunktionelle Crosslinker ermöglichen.<sup>151</sup>

### 3.2.1 Bifunktionelle Linker für die chemische Tyrosin-Modifizierung

Als bi-funktionelle Linker (**BL**) zur Tyrosinmodifizierung wurden mehrere Linker von Dr. Ishtiaq Ahmed (AK Dr. Fruk, Karlsruher Institut für Technologie) synthetisiert (Abbildung 38). Alle Linker enthielten eine Diazodicarboxyamid Funktionalität zur Tyrosinmodifizierung (gelb), eine kurze Polyethylenglykolkette zur besseren Löslichkeit in wässrigen Medium und eine funktionelle Gruppe zur ssDNA Konjugation. Für die ssDNA Konjugation wurden vier unterschiedliche funktionelle Gruppen gewählt, welche mit unterschiedlichen Farben in Abbildung 38 hervorgehoben sind:

- 1) Für eine Amidierungsreaktion einer Amin-modifizierter ssDNA wurde der Linker **BL-2** mit einer Carboxyfunktion (blau) versehen.
- 2) Die Linker **BL-3** und **BL-4** besitzen eine Maleimid Gruppe (rot) zur selektiven Kupplung von thiol-modifizierter ssDNA über eine Michael-Addition.

- 3) Der Linker **BL-5** wurde mit einer Azid Funktionalität (grün) versehen zur Anwendung in der Kupfer katalysierten Azid-Alkin Cycloaddition (**CuCAAC**; engl.: „*Cu(I)-catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition*“) mit einer Alkin-modifizierten ssDNA.
- 4) Der Linker **BL-5** beinhaltet eine Cyclooctin Gruppe (beige), welche für eine Kupfer freie spannungsvermittelte Azid-Alkin Cycloaddition (**SPAAC**, engl.: „*Strain-Promoted-Alkyne-Azide Cycloaddition*“) mit Azid-modifizierter ssDNA eingesetzt werden kann.



**Abbildung 38:** Strukturen der bifunktionellen Crosslinker zur Kupplung von ssDNA über Tyrosine an die Zielproteine Streptavidin (**STV**) und Myoglobin (**Mb**). Die gelb markierte funktionelle zyklische Diazodicarboxyamid Gruppe (gelb) des PTAD wurde nach Ban *et al.* zur Modifizierung der Tyrosine über eine Ene-artige Reaktion gewählt.<sup>165</sup>

Um die Reaktivität der Diazodicarboxyamid Funktionalität der einzelnen Linker zu testen, wurden die Linker in einem ersten Experiment direkt mit der natürlichen Aminosäure Tyrosin umgesetzt. Hierzu wurde die Diazodicarboxyamid Gruppe mit 1 Äq. NBS und 1 Äq. Pyr in DMF für 5 min oxidiert und die aktivierten Linker zu 0,5 Äq. L-Tyrosin (Tyr) in Wasser gegeben. Bei dieser Reaktion zeigten nur die Linker **BL-4**, **BL-5** und **BL-6** eine klare Farbveränderung von farblos nach Rot, welches auf einen erfolgreichen Umsatz hindeutet. Für Linker **BL-2** ließ sich keine und für Linker **BL-3** nur eine leichte Farbveränderung zu leicht rosa beobachten. Nach 1 h bei Raumtemperatur wurde das Lösungsmittel im Vakuum

entfernt und eine massenspektrometrische Analyse mittels „*Fast Atomic Bombardment (FAB)*“ durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5 wiedergegeben.

**Tabelle 5:** Berechnete und gemessene Massen mittels FAB der L-Tyrosin modifizierten bi-funktionellen Linker.

Bezeichnung	M <sub>Soll</sub> [g/mol]	M <sub>Gemessen</sub> [g/mol]
BL-2_Tyr	628,2	n.d.*
BL-3_Tyr	611,2	n.d.*
BL-4_Tyr	614,2	614,2
BL-5_Tyr	560,2	560,2
BL-6_Tyr	686,2	686,2

\* nicht detektiert

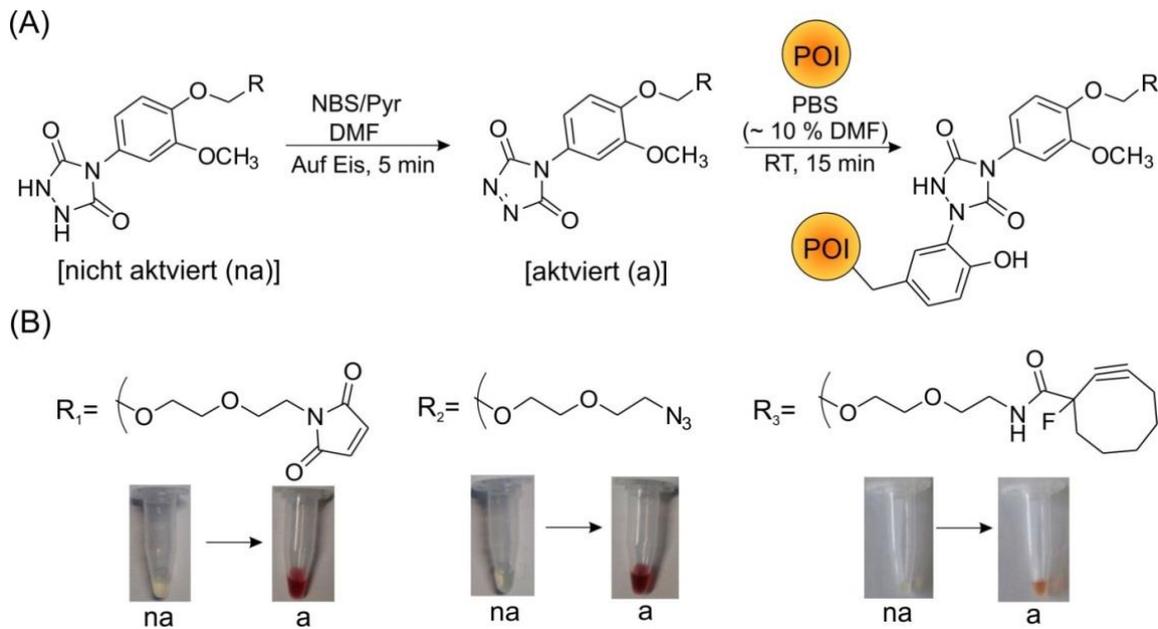
Die massenspektrometrischen Analysen zeigen, dass eine erfolgreiche Kupplung des Tyrosins nur über die speziell gestalteten Linker **BL-4**, **BL-5** und **BL-6** durchgeführt werden konnten. In diesem Zusammenhang kann erläutert werden, dass Ban *et al.* zur selben Zeit die Reaktivitäten unterschiedlichster PTAD Analoga gegenüber Tyrosinen in einer weiteren Publikation verglichen.<sup>166</sup> Hierbei wurde ebenfalls festgestellt, dass eine elektronenreiche Gruppe zur para Position des reaktiven Diazodicarboxyamids mit einer erhöhten Reaktivität der funktionellen Gruppe gegenüber Tyrosinen in Verbindung steht. Aufgrund der Ergebnisse wurden die Linker **BL-4**, **BL-5** und **BL-6** für weitere Experimente verwendet.

### 3.2.2 Fluorophor Modifizierung von Proteinen mittels Tyrosin bindenden heterobifunktionellen Linker

Als Vorbereitung für die Kupplung von DNA wurde eine erfolgreiche Oberflächenmodifizierung der Modelproteine **Mb** und **STV** mit den Crosslinkern **BL-4**, **BL-5** und **BL-6** zunächst durch Kupplung eines Fluoreszenzfarbstoffes verifiziert. Durch Reaktionen mehrerer Linker mit verschiedenen Proteinen und unterschiedlichen Fluorophoren entstand eine Vielzahl an Konjugaten, für die eine eigene Nomenklatur eingefügt wurde. Die Konjugate wurden als <sup>POI</sup>**BL-X<sub>F</sub>** bezeichnet, wobei **POI** das verwendete Protein (engl.: „*Protein of interest*“), das **X** in **BL-X** die Nummer des verwendeten Crosslinkers und **F** das entsprechende konjugierte Fluorophor darstellt.

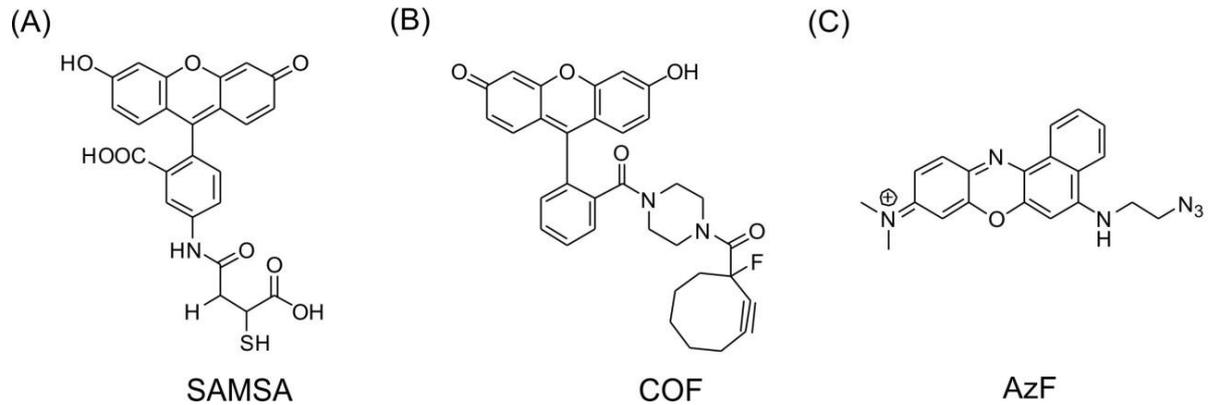
Die Linker wurden wie zuvor beschrieben mit NBS und Pyr aktiviert (Abbildung 39A) und anschließend im 4fachen Überschuss zu einer Stammlösung von **STV** bzw. **Mb** gegeben, so dass die Lösungen ca. 5-10 % DMF in PBS enthielten. Eine erfolgreiche Aktivierung der

Linker mittels NBS und Pyr konnte hierbei durch einen Farbumschlag nachgewiesen werden (Abbildung 39B). In diesem Fall muss erwähnt werden, dass ein zu hoher NBS Anteil ( $\geq 10$ facher Überschuss) zur einer Schädigung der Proteine führt und aus diesem Grund sorgfältig kontrolliert werden muss (vgl. Anhang 11.2.1, Seite 236). Nach Inkubation für 15 Minuten bei Raumtemperatur (RT) wurden die nicht reagierten kleinen Moleküle mittels Gelfiltration abgetrennt, die Proteine in PBS Puffer eluiert und sofort für die Fluorophorkupplung eingesetzt.



**Abbildung 39:** (A) Aktivierung und anschließende Oberflächenmodifizierung der Proteine mittels der Tyrosin bindenden bi-funktionellen Linker. (B) Farbumschlag der bi-funktionellen Linker **BL-4** (**R1**), **BL-5** (**R2**) und **BL-6** (**R3**) nach der Aktivierung mit N-Bromsuccinimid (NBS) und Pyridin (Pyr).

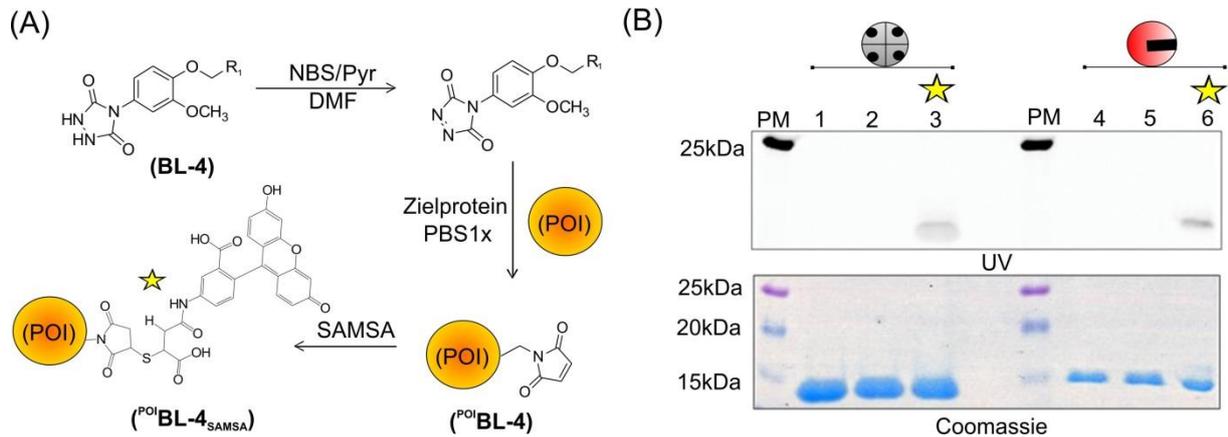
Zur Kupplung standen unterschiedliche Fluorophore zur Verfügung. Um die erfolgreiche Modifizierung der Oberfläche mit dem bi-funktionellen Linker **BL-4** (Maleimidfunktionalität) zu überprüfen, wurde das kommerziell erworbene Fluorophor **S-acteylmercapto-succinoylaminofluorescein (SAMSA)** verwendet und über eine Michael Addition an die Proteinoberfläche gekuppelt (Abbildung 40A). Für die beiden Linker **BL-5** (Azid-Funktionalität) bzw. **BL-6** (Cyclooctin-Funktionalität) wurden die jeweiligen modifizierten Fluorophore **Cyclooctinfluorescein (COF; Abbildung 40B)** bzw. das **Azid modifizierte Fluorophor (AzF; Abbildung 40C)** für eine Click Reaktion verwendet.



**Abbildung 40:** Strukturen der eingesetzten Fluorophore zur Überprüfung der Proteinoberflächenmodifizierungen von **STV** und **Mb** mit den bi-funktionellen Tyrosin-bindenden Linkern. **(A)** Thiol modifizierter Farbstoff **SAMSA** zur Kupplung an die **BL-4** (Maleimid) modifizierten Proteine. **(B)** Cyclooctin modifizierter Farbstoff **COF** zur Kupplung an die **BL-5** (Azid) modifizierten Proteine. **(C)** Azid modifizierter Farbstoff **AzF** zur Kupplung an die **BL-6** (Cyclooctin) modifizierten Proteine.

Für die Fluorophorkupplung wurden die frisch hergestellten <sup>POI</sup>**BL-X** Konjugate mit einem 10fachen Überschuss der jeweiligen Fluorophore bei 4 °C über Nacht unter Lichtausschluss inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Probelösungen wiederum mittels Gelfiltrationssäulen behandelt, um den nicht gebundenen Überschuss an Fluorophoren zu entfernen. Die Proteine wurden mittels PBS Puffer eluiert und das Volumen der Lösungen mittels Ultrafiltrationsröhrchen eingengt. Die Konzentration wurde spektrometrisch bestimmt und die erfolgreiche Kupplung der Fluorophore mittels denaturierender SDS-PAGE charakterisiert.

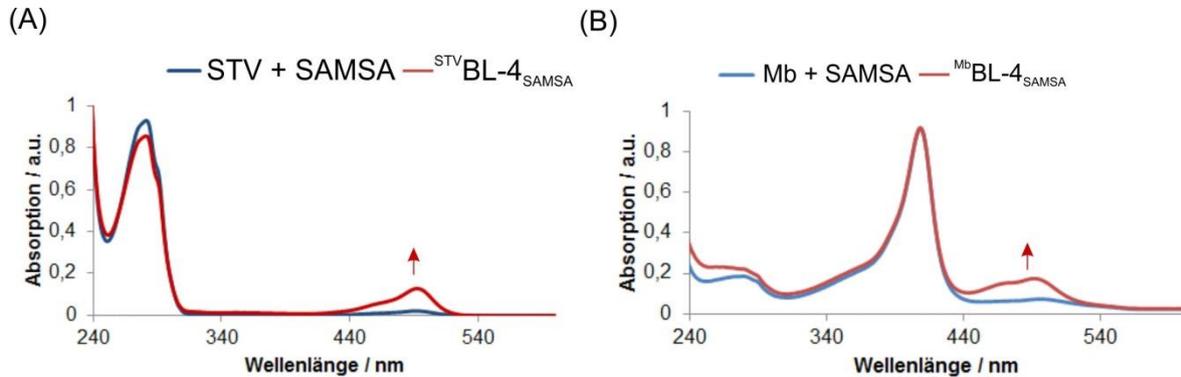
Zur Charakterisierung wurden zusätzlich sowohl die nativen Proteine **STV** und **Mb** als auch Negativkontrollen herangezogen, bei denen die nativen Proteine ohne Oberflächenmodifizierung unter denselben experimentellen Bedingungen mit den jeweiligen Fluorophoren inkubiert wurden. Zur Visualisierung wurde das Gel zunächst unter UV Bestrahlung charakterisiert, um die Positionen der Fluorophore auf dem Gel zu bestimmen. In einem zweiten Schritt wurde das Gel mittels Coomassie Brilliant Blau angefärbt, um die Positionen der Proteine auf dem Gel sichtbar zu machen. Weisen die detektierten Banden unter UV-Bestrahlung und die angefärbten Protein die gleiche elektrophoretische Mobilität auf, handelt es sich bei den Banden um Protein-Fluorophor Konjugate. Ein beispielhaftes Gel für die Synthese von <sup>POI</sup>**BL-4** modifizierten Proteinen mit anschließender **SAMSA** Kupplung ist in Abbildung 41A dargestellt.



**Abbildung 41:** (A) Schematische Darstellung der Kupplung des fluoreszierenden Farbstoffs **SAMSA** auf die **BL-4** modifizierten Proteinoberflächen. Der Farbstoff wird nach erfolgreicher Tyrosinmodifikation über eine Michael Reaktion an den bi-funktionellen Linker gekoppelt, wobei als Endprodukt die **SAMSA** modifizierten Zielproteine  $^{POI}BL-4_{SAMSAs}$  gewonnen werden können. (B) 12%ige SDS-PA-Gel zur Charakterisierung der Konjugate  $^{STV}BL-4_{SAMSAs}$  (Bahn 1-3) und  $^{Mb}BL-4_{SAMSAs}$  (Bahn 4-6). **PM**: Protein Marker; **1**: natives Streptavidin (**STV**); **2**: natives **STV** inkubiert mit **SAMSA**; **3**:  $^{STV}BL-4_{SAMSAs}$ ; **4**: natives Myoglobin (**Mb**); **5**: natives **Mb** inkubiert mit **SAMSA**; **6**:  $^{Mb}BL-4_{SAMSAs}$ . Das Gel wurde zunächst nach UV Anregung charakterisiert und anschließend die Proteine mittels Coomassie-Brilliant-Blau gefärbt.

In Abbildung 41B ist die Gel Charakterisierung der erfolgreichen Konjugation des Fluorophors **SAMSA** an die Proteine **STV** (Bahn 1-3) und **Mb** (Bahn 4-6) über den bifunktionellen Linker **BL-4** wiedergegeben. Bei der Betrachtung des Gels wird deutlich, dass nur die Maleimid funktionalisierten Proteine  $^{STV}BL-4$  (Bahn 3) und  $^{Mb}BL-4$  (Bahn 6) mit den Fluorophor **SAMSA** reagiert haben. Nur in diesen beiden Fällen ist jeweils eine deutliche Bande bei ca. 15 kDa sichtbar, die sowohl unter UV, als auch nach der Coomassie-Brilliant-Blau Färbung visualisiert wird. Die selektive Kupplung über die bifunktionellen Linker wird durch die Betrachtung der Negativkontrollen verifiziert. Die Kontrollproben in Bahn 2 für **STV** bzw. Bahn 5 für **Mb** weisen jeweils eine Bande auf, die eindeutig den nativen Proteinen in Bahn 1 bzw. Bahn 4 zugeordnet, jedoch nicht unter der UV-Bestrahlung detektiert werden können. Analoge Ergebnisse konnten für die bifunktionellen Linker **BL-5** bzw. **BL-6** mit ihren entsprechenden Fluorophoren **COF** bzw. **AzF** erzielt werden. Die entsprechenden analytischen Gele sind dem Anhang Kapitel 11.2.2 beigelegt. In diesem Zusammenhang muss erwähnt werden, dass in Bezug auf das  $^{Mb}BL-5_{COF}$  Konjugat nur eine sehr geringe Bandenintensität unter der UV-Bestrahlung beobachtet werden konnte (vgl. Kapitel 11.2.2, Abbildung 100, Seite 237). Dies könnte auf die Instabilität des verwendet **COF** Farbstoffes zurückgeführt werden, da dieser Farbstoff bereits über längere Zeit (ca. 1 Jahr) bei 4°C gelagert wurde.

Neben der Charakterisierung mittels SDS-PAGE wurden die Protein-Fluorophor Konjugate ebenfalls mittels UV-Vis Spektroskopie analysiert. In Abbildung 42 sind die Spektren der **SAMSA** Kupplung an die modifizierten Proteine  $^{POI}BL-4$  ( $^{POI}BL-4_{SAMSA}$ ; rot) und der Negativkontrollen (**POI** + **SAMSA**; blau) dargestellt.



**Abbildung 42:** (A) UV-Vis Spektren nach der Inkubation von nativen **STV** bzw. dem modifizierten  $^{STV}BL-4$  Protein mit dem Fluorophor **SAMSA**. (B) UV-Vis Spektren nach der Inkubation von nativen **Mb** bzw. dem modifizierten  $^{Mb}BL-4$  Protein mit dem Fluorophor **SAMSA**.

In den Spektren ist zu erkennen, dass nach der **SAMSA** Kupplung und Filtration nur die  $^{POI}BL-X$  Proben eine steigende Absorption bei ca. 495 nm aufweisen, welches der maximalen Anregungswellenlänge des Farbstoffes **SAMSA** entspricht. Die Negativkontrollen weisen hingegen keine Absorptionssteigerung bei 495 nm auf. Dies belegt, dass eine selektive Kupplung des Fluorophors nur über eine Oberflächenmodifizierung der Proteine mittels des bifunktionellen Linkers **BL-4** erfolgen kann. Analoge Ergebnisse konnten ebenfalls mit den anderen bifunktionellen Linkern erzielt werden (vgl. Anhang 11.2.2). Es muss jedoch erwähnt werden, dass bei dem  $^{Mb}BL-5_{COF}$  Konjugat keine entsprechende Anregungswellenlänge detektiert werden konnte (vgl. Kapitel 11.2.2, Abbildung 102, Seite 238), welches wiederum zunächst auf die Instabilität des lang gelagerten **COF** Farbstoffes zurückgeführt werden konnte.

**Tabelle 6:** Ermittelte Konzentrationen der <sup>POI</sup>BL-X<sub>F</sub> Konjugate und die daraus ermittelten Fluorophor/Protein Verhältnisse.

Konjugat	c(Protein) [μM]	c(Fluorophor) [μM]	Verhältnis Fluorophor/Protein
<sup>STV</sup> BL-5 <sub>COF</sub>	5,64	0,52	0,1
<sup>STV</sup> BL-4 <sub>SAMSA</sub>	5,17	1,56	0,3
<sup>STV</sup> BL-6 <sub>AzF</sub>	8,3	25	3,0
<sup>Mb</sup> BL-4 <sub>SAMSA</sub>	5,31	2,14	0,4
<sup>Mb</sup> BL-6 <sub>AzF</sub>	5,53	8,5	1,5
<sup>Mb</sup> BL-5 <sub>COF</sub>	5,29	n.d.*	n.d.*

\*nicht detektiert

Neben der Verifizierung einer erfolgreichen Kupplung, wurden die Spektren zur Kalkulation des Fluorophor/Protein Anteils verwendet. Hierzu wurde zunächst die Konzentration der Proteine ermittelt, indem für die Berechnung der Myoglobin-Konzentration die Soretbande bei  $A_{410}$  ( $\epsilon_{A410}(\text{Mb}) = 171000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) und für die Streptavidin-Konzentration die Eigenabsorption der aromatischen Aminosäuren bei einer Wellenlänge von 280 nm ( $\epsilon_{A280}(\text{STV}) = 165304 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) verwendet wurden. In dem präsentierten Fallbeispiel wurde die Konzentrationen des Fluorophors **SAMSA** ( $\epsilon_{A495}(\text{SAMSA}) = 80000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) über die Exzitationswellenlänge des Fluorophors bei 495 nm ermittelt. Die restlichen verwendeten Extinktionskoeffizienten für die Konzentrationsbestimmungen der Fluorophore **COF** und **AzF** sind der Tabelle 39 (Seite 211) im Anhang Kapitel DAV 10 zu entnehmen. Die daraus resultierenden einzelnen Fluorophor/Protein Verhältnisse sind in der Tabelle 6 dargestellt.

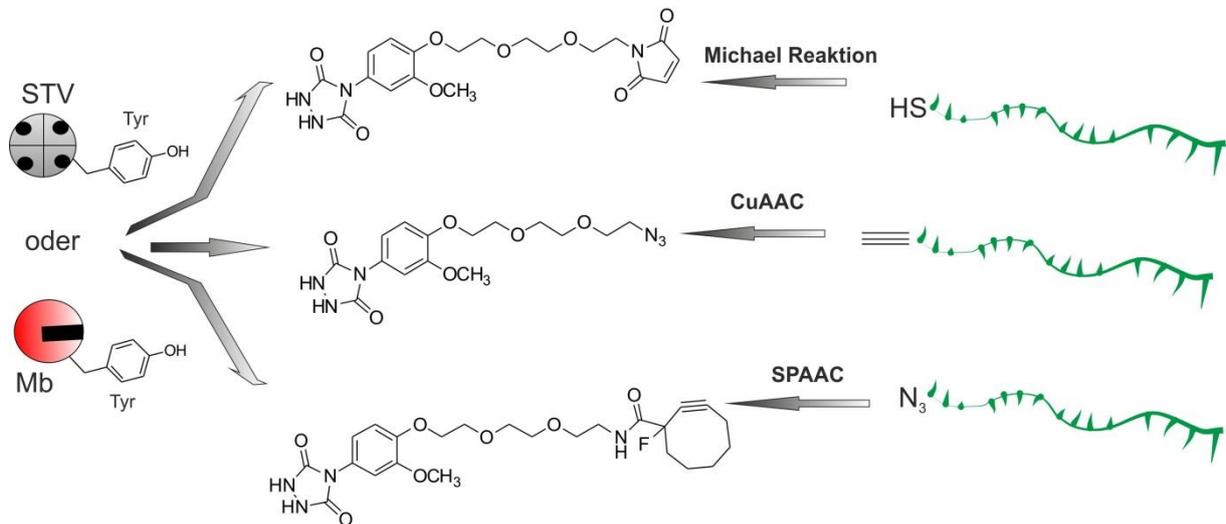
Die Ergebnisse zeigen, dass die Crosslinker zur selektiven Modifizierung der Proteinoberflächen mittels Fluorophoren verwendet werden können. Aus diesem Grund wurde in einem nächsten Schritt die bifunktionellen Linker für die selektive Protein-DNA Konjugation eingesetzt. Die wichtigsten Ergebnisse sind im folgenden Kapitel dargestellt.

### 3.2.3 Synthese und Reinigung der Tyrosin modifizierten Protein-DNA Konjugate

Für die Herstellung der Protein-DNA Konjugate wurden zwei unterschiedliche 22 Basen lange Sequenzen verwendet (**D2** und **D3**; vgl. Tabelle 7). In älteren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die verwendeten Sequenzen vorwiegend ihre komplementären ssDNA Stränge binden, ohne dass Kreuzreaktionen der einzelnen Stränge untereinander stattfinden.<sup>167, 168</sup> Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass verschiedene konjugierte DNA Sequenzen einen unterschiedlichen Effekt auf die Peroxidaseaktivität des **Mb** bewirken

können.<sup>46</sup> Die Protein-DNA Konjugate werden im folgenden Abschnitt nach der Nomenklatur  $POI^{BL-X_D}$  benannt, indem **D** die verwendeten ssDNA Sequenz **D1** oder **D2** darstellt und **X** den entsprechenden verwendeten Linker bezeichnet.

Für die einzelnen Reaktionstypen standen unterschiedlich modifizierte ssDNA Stränge zur Verfügung. Die 5'-Thiol modifizierten DNA Stränge (**SHD2** und **SHD3**) wurden zur Kupplung über eine Michael-Addition mit den **BL-4** modifizierten Proteine verwendet. Weiterhin wurden 5'-Alkin-modifizierte DNA Stränge (**AlkD2** und **AlkD3**) zur Verknüpfung über eine CuAAC mit dem Linker **BL-5** bzw. 5'-Azid modifizierten DNA Stränge (**AzD2** und **AzD3**) zur SPAAC mit dem bifunktionellen Linker **BL-6** genutzt (Abbildung 43 und Tabelle 7).



**Abbildung 43:** Schematische Darstellung der angewandten Kupplungsreaktionen zur Herstellung von Protein-DNA Konjugaten über die Tyrosinmodifizierung.

Für einen Hybridisierungstest wurden die beiden komplementären ssDNA (**cD**) Moleküle **cD2<sub>Cy5</sub>** und **cD3<sub>Cy5</sub>** verwendet, welche mit dem Cyanofarbstoff Cy5 markiert waren. Der Farbstoff Cy5 ermöglichte die Visualisierung der Hybridisierungsprodukte mittels nPAGE, wie bereits im Kapitel 3.1.6 beschrieben und angewandt wurde. Die beiden biotinylierten komplementären (**bc**) Einzelstränge **bcD2** und **bcD3** wurden für die Modifizierung von **STV** beschichteten Mikrotiterplatten verwendet, um eine selektive DNA direkte Immobilisierung (DDI) der hergestellten Myoglobin-DNA Konjugate durchzuführen.

**Tabelle 7:** Verwendete Oligonukleotide zur Herstellung, Charakterisierung und Oberflächenimmobilisierung der Tyrosin modifizierten Protein-DNA Konjugate.

Bezeichnung	Sequenzen und 5'-Modifikationen
SHD2	5'-[thioC6]GGACGAATACAAAGGCTACACG-3'
SHD3	5'-[thioC6]GTGGAAAGTGGCAATCGTGAAG-3'
AzD2	5'-[AzidC6] GGACGAATACAAAGGCTACACG-3'
AzD3	5'-[AzidC6] GTGGAAAGTGGCAATCGTGAAG-3'
AlkD2	5'-[AlkinC6] GGACGAATACAAAGGCTACACG-3'
AlkD3	5'-[AlkinC6] GTGGAAAGTGGCAATCGTGAAG-3'
cD <sub>2</sub> <sub>Cy5</sub>	5'-[Cy5]CGTGTAGCCTTTGTATTTCGTCC-3'
cD <sub>3</sub> <sub>Cy5</sub>	5'-[Cy5]-CTTCACGATTGCCACTTCCAC-3'
bcD2	5'-[biotin]TTTTTTTTTCGTGTAGCCTTTGTATTTCGTCC-3'
bcD3	5'-[biotin]TTTTTTTTTCTTCACGATTGCCACTTCCAC-3'

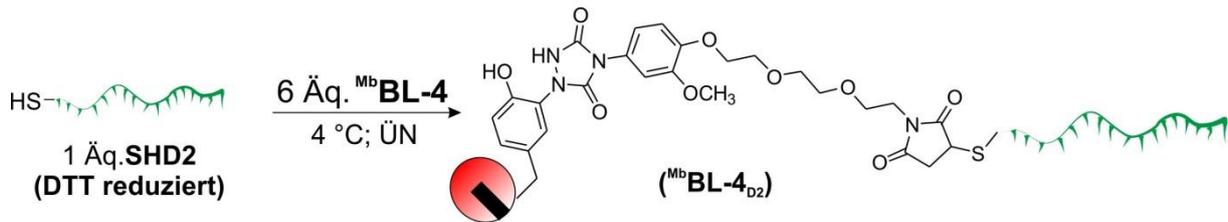
Für die Kupplung der einzelnen DNA Stränge wurden die jeweiligen Oberflächen der Proteine **STV** und **Mb** zunächst, wie in Kapitel 3.2.2 beschrieben, mit den entsprechenden Linkern modifiziert. Die <sup>POI</sup>**BL-X** Konjugate wurden dann anschließend direkt für die unterschiedlichen Reaktionen mit den entsprechenden modifizierten DNA Strängen umgesetzt. Die Reaktionsmechanismen und die anschließende Reinigungen der gewonnen Protein-DNA Konjugate ist in den folgenden Unterkapiteln jeweils für ein Fallbeispiel dargestellt.

Die kalkulierten DNA/Protein Verhältnisse wurde mittels UV-Vis Spektroskopie ermittelt und sind am Ende der jeweiligen Unterkapitel tabellarisch dargestellt. Hierbei wurde das DNA/Mb Verhältnis der <sup>Mb</sup>**BL-X<sub>D</sub>** Konjugate nach der Formel IV aus Kapitel 3.1.5 berechnet. Um das Verhältnis DNA/STV der <sup>STV</sup>**BL-X<sub>D</sub>** Konjugate zu berechnen, wurde ebenfalls die Eigenabsorptionsanteile der ssDNA bei 280 nm bzw. des Proteins bei 260 nm berücksichtigt. Die abgeleitete Formel der Berechnung ist in dem Kapitel AAV 3 (Seite 188) dargestellt und wurde für die folgenden Analysen verwendet.

### 3.2.3.1 Verknüpfung über eine Michael-Addition

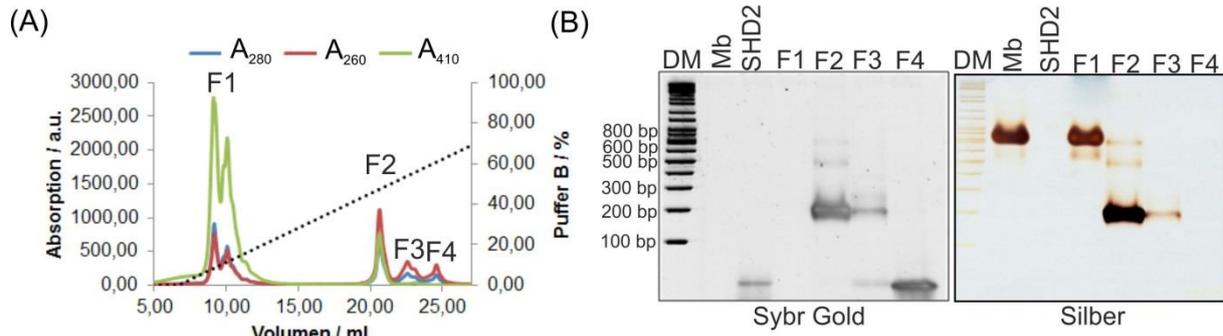
Zur Verknüpfung der ssDNA über eine Michael-Addition wurden die 5'-Thiol-modifizierten 22 Basen langen Einzelstränge **SHD2** bzw. **SHD3** zunächst für 2 h bei Raumtemperatur (RT) mit einem 6000fachen Überschuss Dithiothreitol (DTT) inkubiert, um die vorhandenen Disulfidbrücken zu reduzieren. Die reduzierten SH-DNA Einzelstränge wurden anschließend sofort mit einem 6fachen Überschuss der frisch hergestellten und

modifizierten <sup>POI</sup>BL-4 Proteine versetzt und über Nacht (ÜN) bei 4 °C inkubiert, um eine höchst mögliche Konjugationseffizienz zu erreichen. In Abbildung 44 ist die Konjugation des <sup>Mb</sup>BL-4 Proteins mit der reduzierten ssDNA SHD2 wiedergegeben, anhand dessen die Charakterisierung näher erläutert werden soll. Die restlichen Daten der Konjugation des <sup>STV</sup>BL-4 Proteins mit SHD2 und SHD3 bzw. des <sup>Mb</sup>BL-4 Proteins mit SHD3 sind dem Anhang Kapitel 11.2.3 (Seite 238) zu entnehmen.



**Abbildung 44:** Schematische Darstellung der Kupplung der reduzierten ssDNA SHD2 an das BL-4 modifizierte Protein Myoglobin (<sup>Mb</sup>BL-4) über eine Michael-Addition. Die Kupplungsreaktion erfolgte bei 4 °C über Nacht (ÜN).

Nach der Inkubation wurden die Reaktionslösungen mittels Ultrafiltrationsröhrchen eingengt und ein Pufferwechsel zu 20 mM Tris (Puffer A der FPLC Aufreinigung) durchgeführt. Anschließend wurde die Konjugate mittels FPLC gereinigt, indem eine Anionenaustauschchromatographie durchgeführt wurde. Zur Charakterisierung der Konjugate wurde sowohl die Absorption bei 280 nm (Eigenabsorption der aromatischen Aminosäuren) und 260 nm (Eigenabsorption der Nucleobasen der ssDNA) als auch die Soretbande des Kofaktors Häm bei einer Absorption von 410 nm detektiert (Abbildung 45A). Die einzelnen Hauptfraktionen wurden anschließend mittels nicht denaturierender PAGE (nPAGE) wie bereits in Kapitel 3.1.4 charakterisiert (Abbildung 45B).



**Abbildung 45:** (A) FPLC Chromatogramm der Reinigung des <sup>Mb</sup>BL-4<sub>D2</sub> Konjugats mittels Anionenaustauschchromatographie. Detektiert wurden die Absorptionen der Probe bei 280 nm (blau), 260 nm (rot) und 410 nm (grün). Die Salzkonzentration wurde graduell gesteigert, indem der Anteil des Anionenaustauschpuffers B (schwarz gepunktet) linear innerhalb von 35 min auf 100 % erhöht wurde. **Puffer A:** 20 mM Tris (pH = 8,3); **Puffer B:** 20 mM Tris, 1M NaCl (pH = 8,3). (B) Native PAGE Charakterisierung der FPLC Fraktionen F1, F2, F3 und F4. Als Referenzproben wurden die Edukte **SH<sub>2</sub>D2** und **Mb** aufgetragen. **Konditionen:** 12,5 % PA-Gel, 120 V; **Laufpuffer:** Tris-Glycin (pH = 8,3); **Reihenfolge der Färbung:** 1) SybrGold®, 2) Silber; **DM:** 10 kbp DNA-Marker.

In Abbildung 45A ist das Chromatogramm der Aufreinigung des <sup>Mb</sup>BL-4<sub>D2</sub> Konjugats dargestellt, indem sich vier Fraktionen unterscheiden lassen. Bei der Spezies der Fraktion F1 wird ein Absorptionsmaximum bei 410 nm gemessen, welches dem Absorptionsmaximum des nativen **Mb** entspricht (Soret signal) und somit dem nativen Protein zugeordnet werden kann. Diese Aussage wird bei der Betrachtung der nPAGE Charakterisierung bestätigt (Abbildung 45B), da die Spezies der Fraktion F1 nur mit Silber angefärbt werden kann und die gleiche elektrophoretische Mobilität aufweist, wie die Referenzprobe des nativen **Mb**.

Die Spezies der Fraktion F2 hingegen weist ein Absorptionsmaximum bei 260 nm auf bei gleichzeitiger niedrigerer Detektion des Mb Soretpeaks bei 410 nm, welches die Anwesenheit einer Protein-DNA Spezies vermuten lässt. Bei Betrachtung der Gelcharakterisierung wird diese Aussage bestätigt. Es kann erkannt werden, dass in der Fraktion F2 drei unterschiedliche Protein-DNA Spezies vorliegen, da die detektierten Banden sowohl mit SYBRGold®, als auch mit Silber angefärbt werden können. Das Hauptprodukt (ca. 93 %, kalkuliert über Densitometrie mittels des Computerprogramms Image J) bei ca. 200 bp weist eine erhöhte elektrophoretische Mobilität im Gegensatz zu nativen Mb auf, welches auf die erhöhte negative Ladung des Phosphatrückgrats der konjugierten ssDNA zurückgeführt werden kann. Analysen mittels UV-Vis Spektroskopie zeigten, dass es sich in diesem Fall um eine monokonguierte Protein-DNA Spezies handelt, da ein DNA/Mb Verhältnis von 1,1 ermittelt werden konnte (vgl. Tabelle 8, Seite 91). Bei den beiden Produkten bei ca. 500 bp (6 %) bzw.

800 bp (1 %) könnte es sich um einen geringen Anteil an bi- bzw. tri-konjugierte Spezies handeln, die aufgrund ihrer höheren molekularen Massen eine langsamere elektrophoretische Mobilität aufweisen als das mono-DNA Konjugat.

Da Myoglobin nur zwei Tyrosinreste in seiner Aminosäuresequenz aufweist, würde eine tri-Konjugation die Anwesenheit eines Nebenproduktes nahelegen, welches durch die Modifikation einer anderen natürlich vorkommenden Aminosäure durch den Tyrosin bindenden Linker hervorgerufen worden sein könnte. Auch Ban *et al.*<sup>165</sup> berichteten in den Zusatzinformationen von Nebenprodukten mit geringer Ausbeute, welche bei den Reaktionen des Tyrosin bindenden Linkers PTAD mit Tryptophan bzw. Lysin in LC-MS und <sup>1</sup>H-NMR Analysen detektiert werden konnten. In einer Konkurrenzreaktion, indem Tyrosin, Tryptophan und Lysin zusammen mit den Tyrosin bindenden Linker inkubiert wurde, konnte jedoch nur das gewünschte Reaktionsprodukt zwischen Tyrosin und dem Tyrosin bindenden Linker (PTAD) detektiert werden, welches eine hohe Spezifität der Reaktion widerspiegelte (vgl. Zusatzinformationen von Referenz [165]). Ob es sich bei den beiden Produkten um Nebenprodukte handelt, die durch Modifikationen von Lysin- bzw. Tryptophan- Seitenketten hervorgerufen werden, konnte in dieser Arbeit nicht ermittelt werden. Der verwendete FPLC Gradient könnten eine Auftrennung dieser Produkte erschwert haben und müssten für zukünftige Anwendung optimiert werden. Darauf wurde im Rahmen dieser Arbeit verzichtet, da zunächst die Anwendbarkeit der Kupplungsmethode gezeigt werden sollte.

Zudem wurde das Vorliegen von unspezifisch reagierten Nebenprodukten als unwahrscheinlich betrachtet, da die Gelanalyse nahelegt, dass auch ApoMyoglobin-DNA Konjugate (**ApoMb**-DNA) entstanden. In der Referenzprobe des Eduktes **Mb** ist neben der Hauptbande (Anteil ca. 98 %) bei ca. 800 bp eine weitere Bande bei ca. 600 bp zu erkennen (Anteil ca. 2 %). Diese beiden Spezies sind ebenfalls in der Fraktion F2 vorhanden und können nur mit Silber angefärbt werden. Bei der Spezies mit einem niedrigen Anteil von 2 % könnte es sich um einen geringen Anteil an **ApoMb** handeln, welches aufgrund der niedrigeren molekularen Masse eine schnellere Mobilität aufweist, als das native **Mb**. Aus diesem Grund könnte die detektierte Bande der Fraktion F2 mit einem Anteil von 6 % ein mono-konjugiertes ssDNA-**ApoMb** Produkt darstellen, welches aufgrund der höheren negativen Ladung eine schnellere Mobilität aufweist, als das detektierte native **ApoMb** in Fraktion F1. Die langsamere Mobilität gegenüber dem Mb-DNA Hauptprodukt kann über eine Entfaltung des konjugierten und unstabileren ApoMb begründet werden. Ebenso könnte durch diese Hypothese die nicht vollständige Trennung erklärt werden, da mono-konjugiertes

**ApoMb** die gleiche Oberflächenladung aufweisen würde, wie das mono-konjugierte **<sup>Mb</sup>BL-4<sub>D2</sub>**. Die Spezies der Fraktion F2 mit einem Anteil von 1 % würde somit ein bi-konjugiertes **ApoMb**-DNA oder **Mb**-DNA Produkt darstellen, welches aufgrund der verwendeten FPLC Gradienten nicht abgetrennt werden konnte.

Aufgrund der räumlichen Position der Tyrosinreste kann davon ausgegangen werden, dass dieses Produkt eher ein bi-konjugiertes **ApoMb**-DNA Produkt darstellt, da der Tyrosinrest an Position 146 durch sterische Hinderungen des Kofaktors Häm bzw. die räumlichen Orientierung im Raum erschwert modifiziert werden kann. Die Extraktion des Kofaktors würde somit eine Modifizierung an dieser Position begünstigen. Eine genauere Erläuterung dieses Phänomens ist in Kapitel 3.2.5 beschrieben und ausdiskutiert. Die Analyse dieser Spezies konnte nicht durchgeführt werden, da die geringen Ausbeuten eine Reinigung erschwerten. Aufgrund der bekannten hohen Spezifität der Reaktion nach Ban *et al.*<sup>165</sup> und der hohen Produktausbeute des Protein-DNA Konjugats von 94 % wurde die Fraktion F2 direkt für weitere Analysen verwendet und nicht weiter gereinigt.

In der Gelcharakterisierung kann ebenfalls erkannt werden, dass sich die Spezies der Fraktionen F3 und F4 hauptsächlich aus nicht reagierter **SHD2** ssDNA zusammensetzt, da die detektierten Banden unter 100 bp sich nur mit SYBRGold<sup>®</sup> anfärben lassen und die gleiche elektrophoretische Mobilität aufweisen, wie die Referenzprobe der reinen **SHD2**. Die Fraktion F3 weist neben der reinen ssDNA ebenfalls etwas an Protein-DNA Konjugat auf, welches durch den Vergleich der Fraktion F2 in der Gelcharakterisierung dargelegt wird und unter den verwendeten FPLC Konditionen nicht eindeutig abgetrennt werden konnte. Hierbei muss erwähnt werden, dass die detektierte Bande der Referenzprobe **SHD2** höchstwahrscheinlich das nicht reduzierte **SHD2** Disulfidbrücken-Produkt widerspiegelt (die **SHD2** Referenzlösung wurde vor dem Auftragen nicht mit DTT reduziert), wobei die Einzelstrang **SHD2** aufgrund der verwendeten Gelkonditionen aus dem Gel gewandert zu sein scheint. Diese Aussage wird ebenfalls durch das detektierte Absorptionsmaximum der Fraktion F3 bei 260 nm und der fast nicht vorhandenen Absorption bei 410 nm im FPLC Spektrum belegt. Aufgrund der hohen Absorption bei 260 nm kann angenommen werden, dass die Fraktion F3 hauptsächlich den reduzierten und nicht reagierten Einzelstrang **SHD2** beinhaltet, welcher aus den oben genannten Gründen nicht auf dem Gel detektiert werden kann. Die Fraktion F4 spiegelt nicht reduzierte und nicht reagierte **SHD2** wider, welches durch den Vergleich mit der **SHD2** Referenzprobe belegt werden kann.

**Tabelle 8:** Darstellung der berechneten DNA/Protein Verhältnisse von den gereinigten Hauptfraktionen der <sup>STV</sup>BL-4<sub>D</sub> bzw. <sup>Mb</sup>BL-4<sub>D</sub> Konjugate.

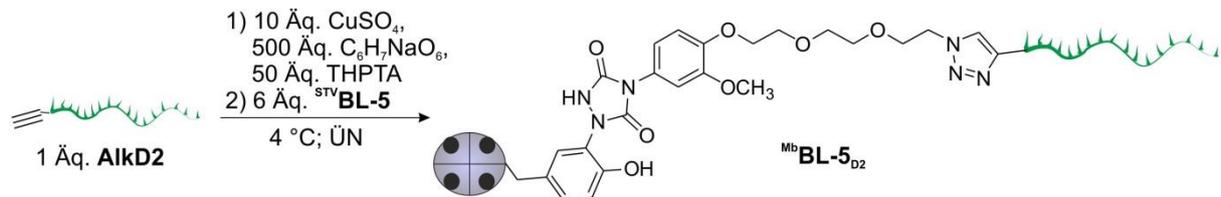
Konjugat	c <sub>(Protein)</sub> [μM]	c <sub>(DNA)</sub> [μM]	DNA/Protein
<sup>STV</sup> BL-4 <sub>D2</sub>	1,8	2	1,1
<sup>STV</sup> BL-4 <sub>D3</sub>	3,6	3,6	1
<sup>Mb</sup> BL-4 <sub>D2</sub>	7,3	8,1	1,1
<sup>Mb</sup> BL-4 <sub>D3</sub>	3,4	3,4	1

Die Ergebnisse bestätigen eine erfolgreiche Konjugation der **SHD2** an das Protein **Mb** über den bifunktionellen Linker **BL-4**. Auch die Konjugate <sup>Mb</sup>BL-4<sub>D3</sub>, <sup>STV</sup>BL-4<sub>D2</sub> und <sup>STV</sup>BL-4<sub>D3</sub> konnten erfolgreich hergestellt werden und zeigen dass die verwendete Konjugationsstrategie nicht Sequenz- oder Proteinabhängig ist. Ebenfalls konnte in allen gereinigten Hauptfraktionen ein DNA/Protein Verhältnis von nahezu 1 berechnet werden (Tabelle 8). Die FPLC Chromatogramme und die Gelcharakterisierungen der Fraktionen sind dem Anhang Kapitel 11.2.3 (Seite 238) beigelegt. In diesem Zusammenhang muss erwähnt werden, dass das Protein **STV** mehr Tyrosine in seiner Primärstruktur beinhaltet und neben mono-konjugierten Hauptprodukten (ca. 94 %, Fraktion F2, Kapitel 11.2.3, Abbildung 105 und Abbildung 106, Seite 239), eine Fraktion mit mehrfach Konjugationen (Fraktion F4, Kapitel 11.2.3, Abbildung 105 und Abbildung 106, Seite 239) detektiert werden konnte, welche jedoch nicht von der unreaktierten ssDNA abgetrennt werden konnten und aus diesem Grund nicht weiter verwendet und analysiert wurden. Der hohe Anteil der mono-konjugierten Produkte der gereinigten Hauptfraktionen kann durch die stöchiometrischen Verhältnisse erklärt werden, da für die Konjugation ein höherer Anteil an Protein im Gegensatz zu ssDNA verwendet wurde. Ein weiterer Faktor könnte die kurze Reaktionszeit zur Modifizierung der Proteine mit dem bifunktionellen Linkern sein. In diesem Fall ist zu beachten, dass nach der kurzen Reaktionszeit die nativen Proteine nicht von den modifizierten getrennt und die Reaktionslösung direkt zur ssDNA Kupplung eingesetzt wurden.

### 3.2.3.2 Verknüpfung über die Kupfer katalysierte Azid-Alkin Cycloaddition

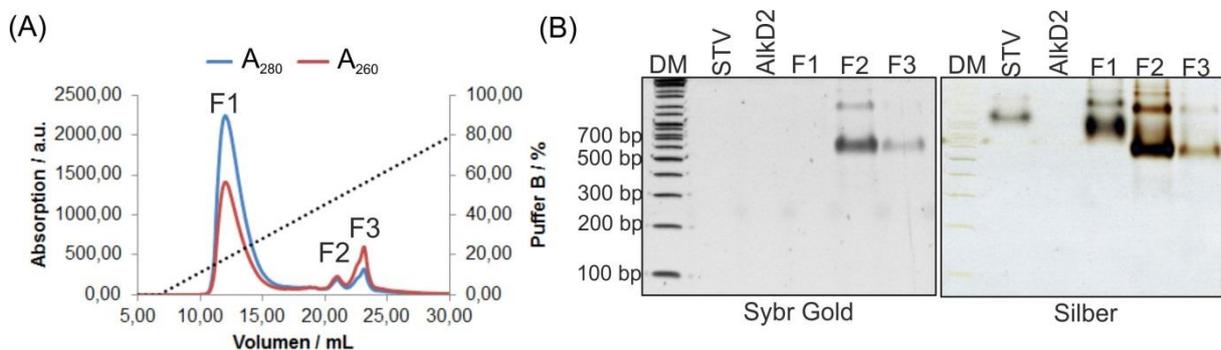
Für die Kupfer katalysierte Azid-Alkin Cycloaddition (**CuCAAC**) wurde zunächst Kupfersulfat mit Natriumascorbat versetzt. In diesem Fall konnte eine Farbveränderung von leicht blau zu leicht braun beobachtet werden und die gebildeten Cu<sup>1+</sup>-Ionen wurden mittels **Tris(3-Hydroxypropyltriazolylmethyl)amin (THPTA)** stabilisiert. Die Lösung wurde anschließend mit den 5'-Alkin modifizierten Einzelsträngen **AlkD2** bzw. **AlkD3** versetzt und

für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Lösung mit den **BL-5** modifizierten und frisch hergestellten Proteinen (<sup>POI</sup>**BL-5**) versetzt und über Nacht bei 4 °C geschüttelt. Am Beispiel der Konjugation des <sup>STV</sup>**BL-5** Proteins mit der **AlkD2** ssDNA soll die CuAAC, wie in Abbildung 46 dargestellt, erläutert werden. Die Ergebnisse für CuAAC Reaktionen mit der ssDNA **AlkD3** ist dem Anhang Kapitel 11.2.3 (Seite 238) zu entnehmen.



**Abbildung 46:** Schematische Darstellung der Kupplung der 5'-Alkin modifizierten ssDNA **AlkD2** an das **BL-5** modifizierte Proteine Streptavidin (<sup>STV</sup>**BL-5**) mittels CuAAC. Die Kupplungsreaktion erfolgte bei 4 °C über Nacht (ÜN).

Die Konjugate wurden wie bereits beschrieben mittels Anionenaustauschchromatographie gereinigt und die einzelnen Fraktionen mit nativer PAGE charakterisiert. Die Ergebnisse der <sup>STV</sup>**BL-5**<sub>D2</sub> Konjugation ist in der Abbildung 47 als Fallbeispiel dargestellt.



**Abbildung 47:** (A) FPLC Chromatogramm der Reinigung des <sup>STV</sup>**BL-5**<sub>D2</sub> Konjugats mittels Anionenaustauschchromatographie. Detektiert wurden die Absorptionen der Probe bei 280 nm (blau) und 260 nm (rot). Die Salzkonzentration wurde graduell gesteigert, indem der Anteil des Anionenaustauschpuffers B (schwarz) linear innerhalb von 35 min auf 100 % erhöht wurde. **Puffer A:** 20 mM Tris (pH = 8,3); **Puffer B:** 20 mM Tris, 1M NaCl (pH = 8,3). (B) Native PAGE Charakterisierung der FPLC Fraktionen F1, F2 und F3. Als Referenzproben wurden die Edukte **AlkD2** und natives **STV** aufgetragen. **Konditionen:** 12,5 % PA-Gel, 120 V; **Laufpuffer:** Tris-Glycin (pH = 8,3); **Reihenfolge der Färbung:** 1) SybrGold®, 2) Silber; **DM:** 10 kbp DNA-Marker.

Das FPLC Chromatogramm zur Aufreinigung des <sup>STV</sup>**BL-5**<sub>D2</sub> Konjugats (Abbildung 47A) weist drei Fraktionen auf. Die Fraktion F1 hat ein Absorptionsmaximum bei 280 nm, wobei sich das Absorptionsmaximum von Fraktion F2 über Fraktion F3 zu einer Wellenlänge von 92

260 nm verschiebt. Dies lässt die Aussage zu, dass es sich bei der Fraktion F1 um natives **STV** handelt ( $A_{\text{Max}} = 280 \text{ nm}$ ), während die Fraktion F2 das Konjugationsprodukt enthält ( $A_{280} \approx A_{260}$ ) und die Fraktion F3 hauptsächlich aus nicht reagierter **AikD2** ssDNA besteht ( $A_{\text{Max}} = 260 \text{ nm}$ ). Diese Aussagen können mittels der nPA-Gel Charakterisierung belegt werden. In Abbildung 47B ist deutlich zu erkennen, dass sich die Spezies der Fraktion F1 nur mit Silber anfärben lassen und im Vergleich zum reinen nativen **STV** Edukt die gleiche elektrophoretische Mobilität vorliegt. Die detektierten Banden der Fraktion F2 hingegen können sowohl mit SybrGold<sup>®</sup>, als auch mit Silber angefärbt werden und repräsentieren somit konjugierte Protein-DNA Spezies. Die Hauptbande bei ca. 700 bp (Ausbeute ca. 92 %) könnte das mono-konjugierte <sup>STV</sup>**BL-5D<sub>2</sub>** Konjugat entsprechen, welches aufgrund der erhöhten negativen Ladung der ssDNA eine schneller Mobilität aufweist, als das native **STV**. Diese Aussage wird verstärkt durch die Berechnung des DNA/Protein Verhältnisses von 1,4 (vgl. Tabelle 9). Dies bedeutet, dass in der Fraktion F2 im Durchschnitt 1,4 ssDNA Moleküle pro Protein vorliegen und somit davon ausgegangen werden kann, dass das Hauptprodukt eine mono-Konjugation darstellt. Die beiden Spezies bei ca. 1250 bp (ca. 7 %) und 1500 bp (ca. 1%) würden somit einen kleinen Anteil an bi- bzw. tri-konjugierte Spezies darstellen, welche aufgrund ihrer höheren molekularer Masse eine langsamere elektrophoretische Mobilität aufweisen und unter den verwendeten FPLC Gradienten nicht eindeutig voneinander getrennt werden konnten. Die Spezies der Fraktion F3 können bei der Betrachtung der Gelcharakterisierung einer Mischung aus Protein-DNA Konjugat und der nicht reagierten **AikD2** ssDNA zugeordnet werden. Der verwendete Einzelstrang **AikD2** kann unter den verwendeten Gelkonditionen nicht detektiert werden, da der Einzelstrang aufgrund der verwendeten Gelkonditionen aus dem Gel gewandert ist (vgl. **AikD2** Referenzprobe, Abbildung 47B). Das Absorptionsmaximum des FPLC Chromatogramms bei 260 nm bestätigt jedoch den hohen Anteil der nicht reagierten ssDNA in den Spezies der Fraktion F3.

**Tabelle 9:** Darstellung der berechneten DNA/Protein Verhältnisse von den gereinigten Hauptfraktionen der <sup>STV</sup>**BL-5D<sub>2</sub>** bzw. <sup>STV</sup>**BL-5D<sub>3</sub>** Konjugate.

Konjugat	c <sub>(Protein)</sub> [μM]	c <sub>(DNA)</sub> [μM]	DNA/Protein
<sup>STV</sup> <b>BL-5D<sub>2</sub></b>	3,1	4,6	1,4
<sup>STV</sup> <b>BL-5D<sub>3</sub></b>	1,6	2,7	1,6

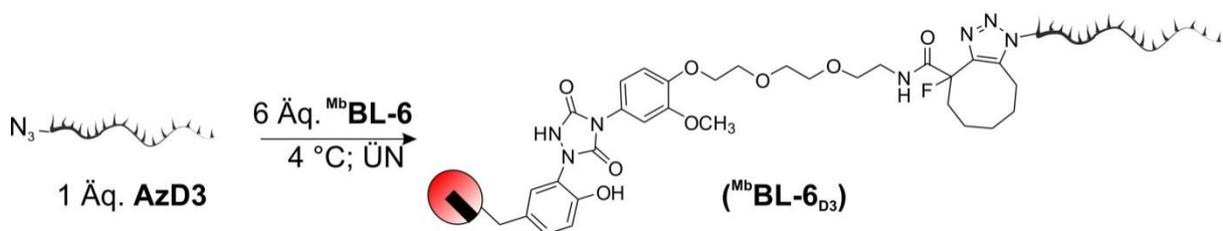
Die Ergebnisse verifizieren eine erfolgreiche Konjugation der **AikD2** mit den **BL-5** modifizierten **STV**. Das Konjugat <sup>STV</sup>**BL-5D<sub>3</sub>** konnte ebenfalls erfolgreich hergestellt werden

und das FPLC Chromatogramm sowie die nPA-Gel Charakterisierung ist dem Anhang Kapitel 11.2.3 (Abbildung 107, Seite 240) beigelegt. In diesem Fall konnte für das Hauptprodukt ein DNA/Protein Verhältnis von 1,6 berechnet werden, welches bestätigt, dass die Kupplungseffizienz nicht Sequenzabhängig ist. Die Hauptfraktionen F2 mit einer Ausbeute der mono-Konjugate von ca. 94 % wurden direkt für die weiteren Analysen verwendet.

Die Konjugation der Alkin-ssDNA über die **BL-5** modifizierten Myoglobin Konjugate konnte nicht erfolgreich durchgeführt werden. Dieses Phänomen wurde bereits in Kapitel 3.2.2 zur Fluorophorkupplung erwähnt, da auch die Fluorophorkupplung des Farbstoff **COF** über das <sup>Mb</sup>**BL-5** Konjugat nicht erfolgreich verlief. Durch die gewonnenen Ergebnisse lässt sich die Hypothese aufstellen, dass die Anwesenheit des Häm Kofaktors mit einem Fe<sup>2+</sup> Kern eine mögliche Koordinierung des Azid Linkers mit dem Kofaktor hervorruft. Die Koordinierung könnte die Stabilität und Reaktivität des Diazodicarboxamid-NBS Intermediat beeinflussen. Diese Hypothese wird durch die erfolgreiche Herstellung der Protein-DNA Konjugate mittels des Proteins **STV** ohne Häm Kofaktor und des Linkers **BL-5** verstärkt.

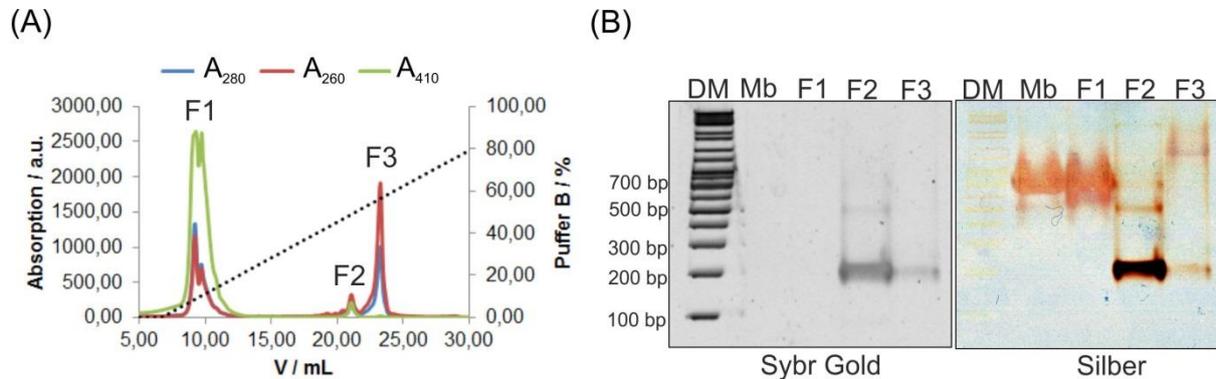
### 3.2.3.3 Verknüpfung über eine Kupfer freie spannungsvermittelte Azid-Alkin Cycloaddition

Für die Kupfer freie spannungsvermittelte Azid-Alkin Cycloaddition (SPAAC) wurden die 5'-Azid modifizierten Einzelstränge **AzD2** bzw. **AzD4** mit einem 6fachen Überschuss an frisch hergestellten **BL-6** modifizierten Proteinen versetzt (<sup>POI</sup>**BL-6**) und über Nacht bei 4 °C inkubiert. In Abbildung 48 ist als Beispiel die Kupplung der **AzD3** ssDNA an das **BL-6** modifizierte Myoglobin (<sup>Mb</sup>**BL-6**) dargestellt. Die Daten der anderen Konjugate sind dem Anhang Kapitel 11.2.3 beigelegt.



**Abbildung 48:** Schematische Darstellung der Kupplung der 5'-Azid modifizierten ssDNA **AzD3** an das **BL-6** modifizierte Myoglobin (<sup>Mb</sup>**BL-6**) über eine Kupfer freie spannungsvermittelte Alkin-Azid Cycloaddition. Die Kupplungsreaktion erfolgte bei 4 °C über Nacht (ÜN).

Die Reaktionslösung wurde bereits wie in den vorherigen Unterkapiteln gereinigt und charakterisiert. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 49 dargestellt.



**Abbildung 49:** (A) FPLC Chromatogramm der Reinigung des  $MbBL-6D_3$  Konjugats mittels Anionenaustauschchromatographie. Detektiert wurden die Absorptionen der Probe bei 280 nm (blau), 260 nm (rot) und 410 nm (grün). Die Salzkonzentration wurde graduell gesteigert, indem der Anteil des Anionenaustauschpuffers B (schwarz gepunktet) linear innerhalb von 35 min auf 100 % erhöht wurde. **Puffer A:** 20 mM Tris (pH = 8,3); **Puffer B:** 20 mM Tris, 1M NaCl (pH = 8,3). (B) Native PAGE Charakterisierung der FPLC Fraktionen F1, F2 und F3. Als Referenzproben wurden das native Myoglobin (**Mb**) aufgetragen. **Konditionen:** 12,5 % PA-Gel, 120 V; **Laufpuffer:** Tris-Glycin (pH = 8,3); **Reihenfolge der Färbung:** 1) SybrGold®, 2) Silber; **DM:** 10 kbp DNA-Marker.

In Abbildung 49A ist das FPLC Chromatogramm der Reinigung der Reaktion zwischen **AzD3** und dem modifizierten  $MbBL-6$  Protein dargestellt, indem sich insgesamt drei Fraktionen unterscheiden lassen. In der Fraktion F1 wird die höchste Absorption bei 410 nm gemessen, welche dem Absorptionsmaximum des nativen **Mb** entspricht. Diese Spezies repräsentiert das native Myoglobin-Edukt, welches durch die Gelcharakterisierung belegt wird (Abbildung 49B). Die Fraktion F2 weist hingegen im Chromatogramm ein Absorptionsmaximum bei 260 nm auf, wobei eine gleichzeitige Detektion des Myoglobin Soretpeaks bei 410 nm beobachtet werden kann. Daher kann angenommen werden, dass es sich bei dieser Fraktion um eine Protein-DNA Spezies handelt. Auch dies lässt sich durch die Gelcharakterisierung bestätigen. Nach der SYBRGold® Färbung können in der Fraktion F2 drei unterschiedliche Spezies beobachtet werden, welche sich ebenfalls mit Silber anfärben lassen und somit die Präsenz von Protein-DNA Spezies verifiziert wird. Die Hauptbande bei ca. 200 bp mit einem Anteil von ca. 96 % zeigt eine höhere elektrophoretische Mobilität, als das native **Mb** und die spektrometrische Kalkulation des DNA/Protein Verhältnisses von 1,2 lässt die Aussage zu, dass es sich weitestgehend um ein mono-konjugiertes Protein-DNA Produkt handelt (vgl. Tabelle 10). Die beiden restlichen Spezies bei ca. 500 bp (Anteil ca. 2

%) bzw. 700 bp (Anteil ca. 1%) entsprechen dem mehrfach-konjugierten **Mb**-DNA bzw. mono- und bi- konjugierte **ApoMb**-DNA Konjugaten, wie bereits im Unterkapitel 3.2.3.1 ausführlich diskutiert wurde.

**Tabelle 10:** Darstellung der berechneten DNA/Protein Verhältnisse von den gereinigten Hauptfraktionen der **STVBL-6<sub>D</sub>** bzw. **MbBL-6<sub>D</sub>** Konjugate.

Konjugat	c <sub>(Protein)</sub> [μM]	c <sub>(DNA)</sub> [μM]	DNA/Protein
<b>STVBL-6<sub>D2</sub></b>	0,5	0,5	1,2
<b>STVBL-6<sub>D3</sub></b>	0,5	0,5	1
<b>MbBL-6<sub>D2</sub></b>	1	1,2	1,2
<b>MbBL-6<sub>D3</sub></b>	2,7	3,5	1,2

Die Ergebnisse zeigen, dass eine erfolgreiche **SPAAC** Click-Reaktion zwischen der **AzD3** ssDNA und dem modifizierten Protein **MbBL-6** durchgeführt werden konnte. Auch die Konjugate **MbBL-6<sub>D2</sub>**, **STVBL-6<sub>D2</sub>** und **STVBL-6<sub>D3</sub>** konnten erfolgreich synthetisiert und hergestellt werden und die entsprechenden FPLC-Chromatogramme und Gelcharakterisierungen sind im Anhang Kapitel 11.2.3 (Seite 238) dargestellt. Im diesem Zusammenhang muss erläutert werden, dass alle gereinigten Hauptfraktion ein DNA/Protein Verhältnis von nahezu 1 aufwiesen (Tabelle 10).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Tyrosinkonjugation weitestgehend erfolgreich verlief und dass für beide Proteine eine passende Linker-Gestaltung gefunden wurde, um eine effektive Konjugation über die natürliche Aminosäure Tyrosin durchzuführen. Die verwendeten ssDNA Sequenzen wiesen keinen Unterschied in Bezug auf die Konjugationseffizienz auf, was darauf hindeutet, dass die Konjugation mittels der verwendeten DNA Einzelsträngen nicht sequenzspezifisch erfolgt. Die DNA/Protein Verhältnisse wiesen bei allen Hauptfraktionen einen Wert von nahezu 1 auf, welches darauf zurückschließen lässt, dass die Produkte der Hauptfraktionen hauptsächlich aus mono-konjugierten Spezies bestehen. Im Unterkapitel 3.2.3.1 wurde bereits dargelegt, dass die vorwiegende einfach-Konjugation durch die verwendeten stöchiometrischen Verhältnisse zwischen **POI<sup>BL-X</sup>** und eingesetzter DNA erklärt werden kann.

Des Weiteren konnten die Ausbeuten der mono-konjugierten Hauptfraktionen bestimmt werden. Hierzu wurde die reagierte ssDNA Menge der Hauptfraktionen (Endvolumen = 100 - 200 μL) ermittelt und die Ausbeute der mono-konjugierten Produkte über die eingesetzte DNA Menge (10 nmol pro Reaktion) berechnet (vgl. Tabelle 11). Die Ausbeute der Modifikation des Myoglobins mittels des bifunktionellen Linkers **BL-4** (Maleimid Funktion)

und der **SHD2** (15 %) bzw. **SHD3** (7 %) ssDNA ist vergleichbar mit der Modifizierungsstrategie über Lysine mit Hilfe des kommerziellen Linkers sSMCC (8 % bzw. 9 %), welche für einen Vergleich der Aktivitätsmessungen (vgl. hierzu Kapitel 3.2.5) synthetisiert und eingesetzt wurden.

**Tabelle 11:** Berechnete Konzentrationen der gereinigten Protein-DNA Konjugate  $^{POI}BL-X_D$  und die daraus ermittelten DNA/Protein Verhältnisse.

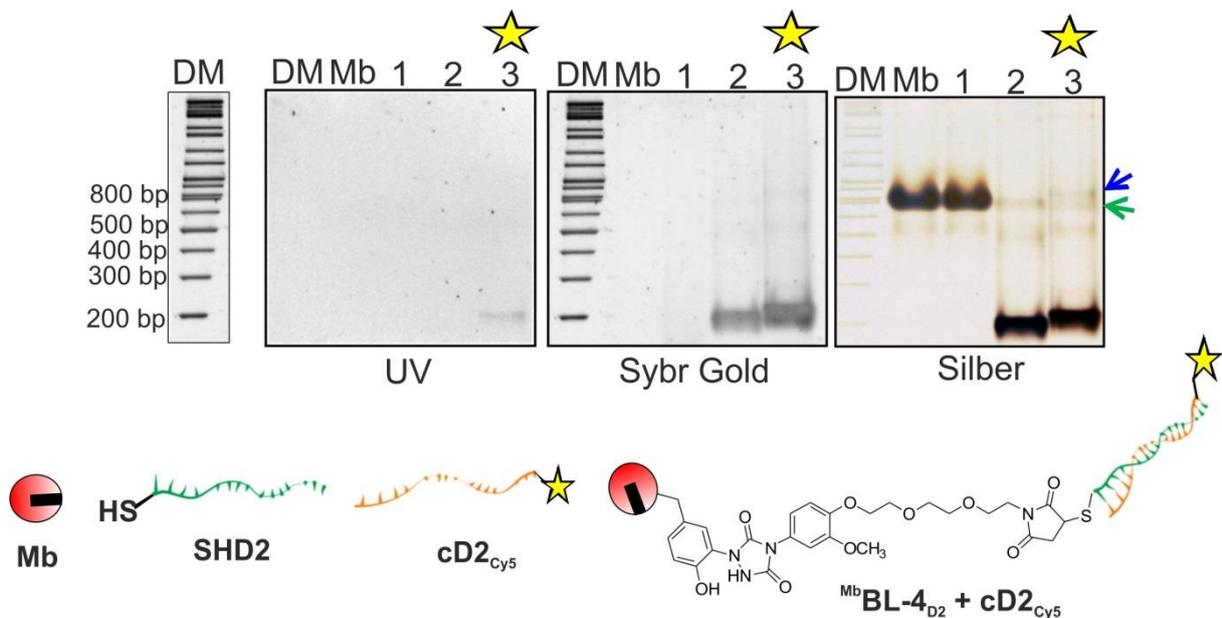
Konjugat	$c_{(Protein)}$ [ $\mu$ M]	$c_{(DNA)}$ [ $\mu$ M]	DNA/Protein	Ausbeute [%]
$^{STV}BL-4_{D2}$	1,8	2	1,1	3,6
$^{STV}BL-4_{D3}$	3,6	3,6	1	3,5
$^{STV}BL-5_{D2}$	3,1	4,6	1,4	6,2
$^{STV}BL-5_{D3}$	1,6	2,7	1,6	3,2
$^{STV}BL-6_{D2}$	0,5	0,5	1,2	1
$^{STV}BL-6_{D3}$	0,5	0,5	1	1,1
$^{Mb}BL-4_{D2}$	7,3	8,1	1,1	15
$^{Mb}BL-4_{D3}$	3,4	3,4	1	7
$^{Mb}BL-6_{D2}$	1	1,2	1,2	7,5
$^{Mb}BL-6_{D3}$	2,7	3,5	1,2	4,5

Als Nachweis der erfolgreichen Synthese der Konjugate muss zusätzlich ihre Funktionalität getestet werden. Aus diesem Grund wurde ein Hybridisierungstest der Konjugate mit ihrer komplementären Sequenz durchgeführt. Die Ergebnisse sind im folgenden Kapitel dargestellt.

### 3.2.4 Hybridisierungstest der Tyrosin modifizierten Protein-DNA Konjugate

Um die Funktionalität der synthetisierten Konjugate zu überprüfen, wurde ein Hybridisierungstest durchgeführt. Hierzu wurden 40 pmol der Konjugate mit einem 10fachen Überschuss einer komplementären und Fluorophor modifizierten ssDNA für ca. 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die komplementären ssDNA Stränge waren am 5'-Ende mit dem Cyanin Farbstoff Cy5 ( $cD2_{Cy5}$  bzw.  $cD3_{Cy5}$ ) modifiziert. Zur Analyse der Hybridisierungseffizienz wurde eine native PAGE durchgeführt und das nPA-Gel in drei unterschiedlichen Schritten charakterisiert (vgl. Abbildung 50). Zunächst konnte mittels UV-Bestrahlung die Position der Cy5 markierten DNA auf dem Gel visualisiert werden. In folgenden Färbeschritten wurde das Gel mit SybrGold<sup>®</sup> angefärbt, um die ssDNA Positionen zu bestimmen und in einem letzten Schritt wurden die Proteine mittels Silber gefärbt. Als

Referenzproben wurden ebenfalls das native **Mb** und das native **Mb**, welches zuvor mit **SHD2** und **cD2<sub>Cy5</sub>** unter den gleichen experimentellen Bedingungen inkubiert worden war, aufgetragen. Die Charakterisierung wird in diesem Kapitel anhand des **<sup>Mb</sup>BL-4<sub>D2</sub>** Konjugats mit der komplementären Sequenz **cD2<sub>Cy5</sub>** beispielhaft dargestellt, während die Gelcharakterisierungen der anderen Konjugate dem Anhang Kapitel 11.2.4 (Seite 242) wiedergegeben sind.



**Abbildung 50:** Testhybridisierung des **<sup>Mb</sup>BL-4<sub>D2</sub>** Konjugats mit der komplementären ssDNA **cD2<sub>Cy5</sub>** und die Charakterisierung mittels nPAGE. **DM:** 10 kbp DNA-Marker; **Mb:** natives Myoglobin; **1: Negativ Kontrolle, Mb** inkubiert mit **SHD2** und **cD2<sub>Cy5</sub>**; **2:** **<sup>Mb</sup>BL-4<sub>D2</sub>** Konjugat; **3:** **<sup>Mb</sup>BL-4<sub>D2</sub>** Konjugat inkubiert mit einem 10-fachen Überschuss an **cD2<sub>Cy5</sub>**; **Konditionen:** 12,5 % PA-Gel, 120 V; **Laufpuffer:** Tris-Glycin; **Reihenfolge der Visualisierung:** 1) UV-Anregung 2) SybrGold®-Färbung, 2) Silberfärbung.

Wie in der Abbildung 50 sichtbar konnte eine erfolgreiche Hybridisierung des Protein-DNA Konjugats **<sup>Mb</sup>BL-4<sub>D2</sub>** mit der komplementären ssDNA **cD2<sub>Cy5</sub>** durchgeführt werden. Das Hybridisierungsprodukt bei ca. 200 bp in Bahn 3, welches mittels SYBRGold und Silberfärbung visualisiert werden kann, weist eine langsamere elektrophoretische Mobilität auf, als die Spezies des reinen Konjugats in Bahn 2. Dies lässt sich auf die erhöhte molekulare Masse des Hybridisierungsproduktes zurückführen. Eine erfolgreiche Hybridisierung wird durch die Betrachtung der UV Aufnahme weiter bestätigt, da die detektierte Bande die Anwesenheit des komplementären **cD2<sub>Cy5</sub>** verifiziert. Die bereits in Kapitel 3.2.3.1 erwähnten Nebenprodukte bei ca. 500 bp (Anteil ca. 6 %) bzw. 800 bp (Anteil ca. 1 %) weisen ebenfalls eine geringere Mobilität auf, als die reinen Spezies in Bahn 2, können jedoch nicht unter UV detektiert werden. Als Grund kann hier die zu geringe Ausbeute genannt werden, welche eine

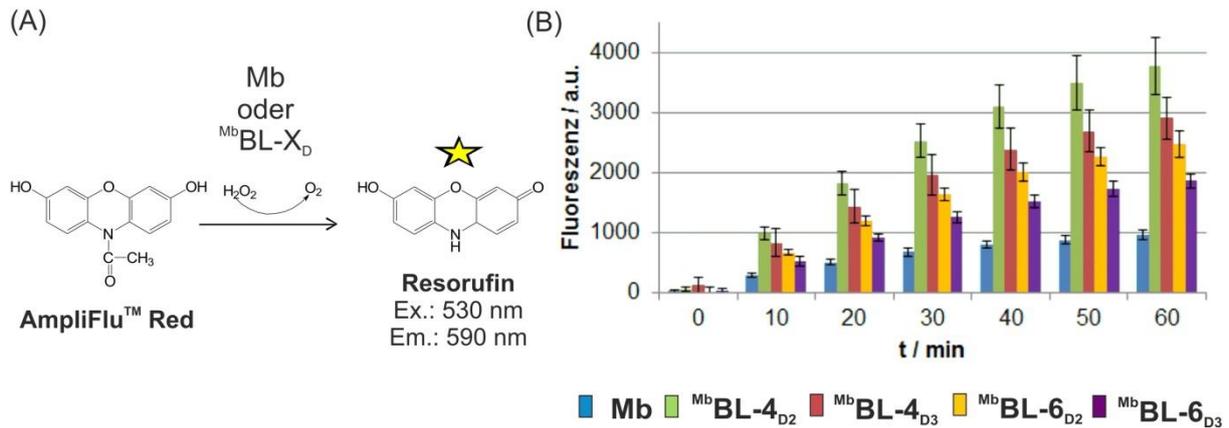
UV Anregung mit anschließender Detektion erschwert. Bei der genaueren Betrachtung der Bahn 3 kann ebenfalls erkannt werden, dass das bereits in Kapitel 3.2.3.1 erwähnte Konjugationsprodukt mit einer Ausbeute von 1 % bei ca. 800 bp (grüner Pfeil) nur zum Teil als Hybridisierungsprodukt vorliegt (blauer Pfeil). Dies lässt die Annahme zu, dass die Position und die räumliche Orientierung der konjugierten DNA eine Hybridisierung mit der komplementären Sequenz erschwert. Wie bereits im Unterkapitel 3.2.3.1 erläutert, könnte dieses Produkt ein tri-konjugiertes **Mb**-DNA Nebenprodukt oder ein bi-konjugiertes **ApoMb**-DNA Produkt widerspiegeln. Die schlechte Zugänglichkeit der ssDNA zur Hybridisierung, lassen jedoch die Hypothese zu, dass es sich in diesem Fall eher um eine bi-konjugierte **ApoMb**-DNA Spezies handelt. Eine genauere Erläuterung zu diesem Phänomen ist dem folgenden Kapitel 3.2.5 dargestellt, indem die bevorzugten Modifizierungspositionen näher diskutiert werden.

Die Ergebnisse zeigen, dass eine erfolgreiche Hybridisierung des <sup>Mb</sup>**BL-4<sub>D2</sub>** mit der komplementäre ssDNA **cD2<sub>Cy5</sub>** durchgeführt werden konnte. Auch die restlichen **Mb**-DNA Konjugate <sup>Mb</sup>**BL-4<sub>D3</sub>** und <sup>Mb</sup>**BL-6<sub>D</sub>**, sowie **STV**-DNA Konjugate <sup>STV</sup>**BL-4<sub>D</sub>**, <sup>STV</sup>**BL-5<sub>D</sub>** und <sup>STV</sup>**BL-6<sub>D</sub>** konnten erfolgreich mit den komplementären Strängen hybridisiert werden und die Analysegele sind dem Anhang Kapitel 11.2.4 (Seite 242) beigefügt.

Neben der erfolgreichen DNA Konjugation der Proteine und deren Funktionalität musste getestet werden, ob die Bindung der DNA über die natürliche Aminosäure Tyrosin die Pseudoperoxidase Aktivität der <sup>Mb</sup>**BL-4<sub>D</sub>** und <sup>Mb</sup>**BL-6<sub>D</sub>** beeinflusst. Die Ergebnisse sind im folgenden Kapitel erläutert.

### 3.2.5 Aktivitätstests der Tyrosin modifizierten Myoglobin-DNA Konjugate

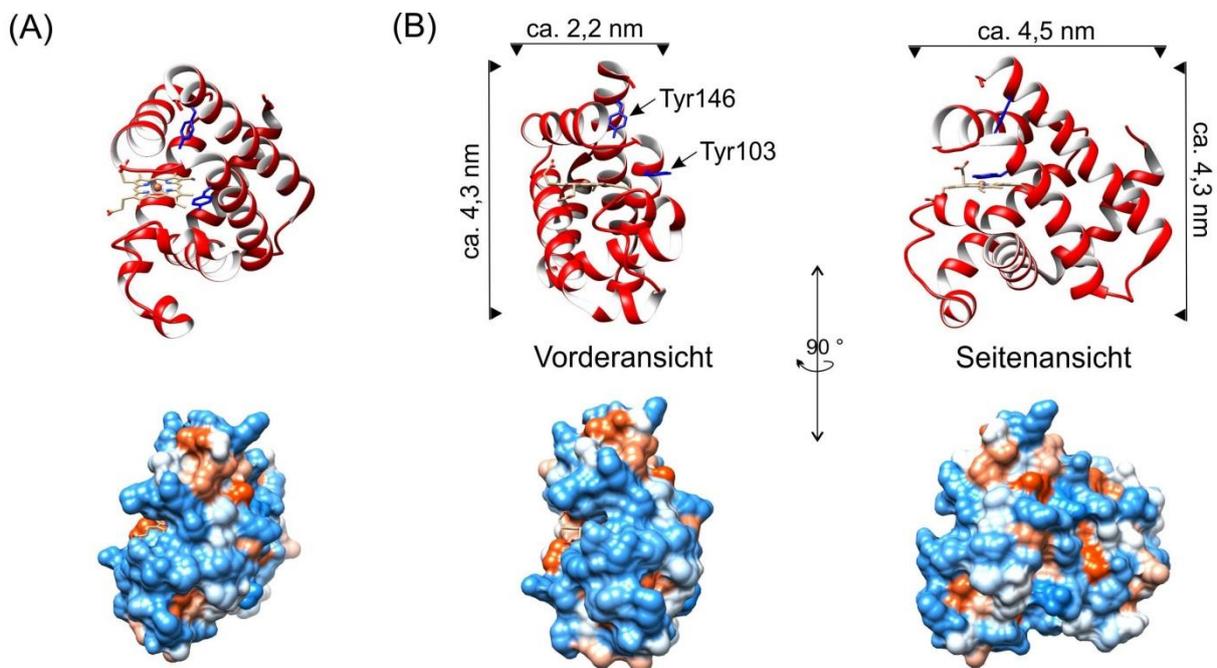
Für den Aktivitätstest wurde 1 pmol der Konjugate <sup>Mb</sup>**BL-4<sub>D</sub>** und <sup>Mb</sup>**BL-6<sub>D</sub>** verwendet und einen AmpliFlu<sup>TM</sup> Test durchgeführt (Abbildung 51A), indem die Umsetzung des Substrats AmpliFu<sup>TM</sup> Red in das fluoreszierende Endprodukt Resorufin in Abhängigkeit der Zeit verfolgt wurde (Abbildung 51B). Als Referenzprobe wurde der Test ebenfalls mit 1 pmol nativen Myoglobin (**Mb**) durchgeführt und in allen Fällen eine 4fach Bestimmung getätigt.



**Abbildung 51:** (A) Umsetzung des Substrates AmpliFu™ Red zu dem fluoreszierenden Produkt Resorufin in Anwesenheit von  $H_2O_2$  und den getesteten Myoglobin-DNA Spezies bzw. nativen Myoglobin **Mb**. Die Fluoreszenz des fluoreszierenden Farbstoffs Resorufin wird bei einer Emissionswellenlänge von 590 nm verfolgt, nachdem eine Anregung bei einer Wellenlänge von 530 nm erfolgte. (B) AmpliFu™ Red Aktivitätstests der Myoglobin-DNA Konjugate  $MbBL-4_D$  und  $MbBL-6_D$  im Vergleich zum nativen Myoglobin **Mb**. **Endkonzentration:** 50  $\mu M$  Amplex® Red, 1 mM  $H_2O_2$  und 10 nM **Mb** bzw.  $MbBL-X_D$ .

In Abbildung 51B ist deutlich zu erkennen, dass alle Protein-DNA Konjugatproben eine signifikant höhere Fluoreszenzsteigerung im Gegensatz zum nativen Myoglobin zeigen. Das Phänomen der erhöhten Aktivität der Myoglobin-DNA Konjugate im Gegensatz zu nativen **Mb** wurde bereits erläutert und konnte auf bereits erlangte Erkenntnisse<sup>41, 46</sup> zurückgeführt werden (sowohl die Positionierung der ssDNA auf der Oberfläche des Proteins, als auch die Länge und Sequenz der DNA scheint einen merklichen Effekt auf die Peroxidaseaktivität des Myoglobins zu haben). In einer genaueren Betrachtung ist weiterhin zu erkennen, dass die jeweiligen  $MbBL-X_{D2}$  Konjugate höhere Fluoreszenzsignale aufweisen, als die  $MbBL-X_{D3}$  Konjugate. Dies lässt die Aussage zu, dass die DNA Sequenz **D2** einen höheren Stabilisierungseffekt des aktiven Zentrum bewirkt, als die DNA Sequenz **D3**. Die Hypothese, dass die Interaktion der ssDNA mit der Umgebung des hydrophilen Bereichs des aktiven Zentrums zu einer Stabilisierung führt, könnte auch in diesem Fall die unterschiedlichen Aktivitätssteigerungen erklären. Da beide Sequenzen die gleiche Länge und den gleichen Purin bzw. Pyrimidinanteil besitzen (vgl. Tabelle 7, Seite 86), kann der Stabilisierungseffekt nur auf die Anordnung der Basen zurückgeführt werden. Zum Beispiel könnten die Basenpositionen einen unterschiedlichen Effekt auf die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Nukleobasen und der Proteinoberfläche bewirken, welche wiederum einen unterschiedlichen Effekt auf das aktive Zentrum ausüben könnten.

Ein weiterer Effekt der beobachtet werden kann, ist das die Proteine, welche mit dem Linker **BL-4** (Maleimid-Funktion) modifiziert wurden ein höheres Signal gegenüber nativen **Mb** aufweisen, als die Proteine welche mit dem Linker **BL-6** (Cyclooctin-Funktion) modifiziert wurden. Die niedrigere Steigerung der <sup>Mb</sup>**BL-6<sub>D2</sub>** (ca. 2mal höher als **Mb**) bzw. <sup>Mb</sup>**BL-6<sub>D3</sub>** (ca. 1,5mal höher als **Mb**) Konjugate könnte durch eine mögliche räumliche Hinderung oder andersartige Formen von Interaktionen des ausgebildeten Cyclooctin-Azid Rings nach der Click Reaktion hervorgerufen werden, welche eine direkte Interaktion der DNA mit dem aktiven Zentrum und mit dem Kofaktor Häm (welcher im Fall von Myoglobin nah an der Oberfläche des Proteins positioniert ist) erschweren. Die Hypothese wird durch die fast doppelt so hohe gemessene Fluoreszenz der mit dem Linker **BL-4** (Maleimid) modifizierten Proteine <sup>Mb</sup>**BL-4<sub>D2</sub>** (ca. 4mal höher als **Mb**) bzw. <sup>Mb</sup>**BL-4<sub>D3</sub>** (ca. 3mal höher als **Mb**) verstärkt.



**Abbildung 52:** (A) Darstellung der Tyrosinpositionen (Tyr146 und Tyr103) in der Tertiärstruktur des Proteins Myoglobin vom Pferdeherz aus einer selbst definierten Vogelperspektive. (B) Darstellung der Tyrosinpositionen in selbst definierter Vorder- und Seitenansicht. Der Kofaktor Häm ist grau dargestellt während die Lysinpositionen des Proteins dunkel blau markiert wurden. Die unteren Darstellungen zeigen die Van-der-Waals Oberflächen der jeweiligen Blickwinkel. Die hydrophilen Bereiche sind blau dargestellt, während die Hydrophobie über weiß nach orange (für die hydrophoben Bereiche) abnimmt. Die Abbildung und die angegebenen Größenordnungen wurden mittels des Computerprogramms Chimera 1.9 und unter Verwendung der Datei 3LR7 der Proteindatenbank generiert bzw. kalkuliert.

Um diese Hypothese weiter zu bekräftigen kann die Zugänglichkeit der beiden Tyrosinreste für die Modifizierungsreaktionen diskutiert werden, indem die Van-der-Waals Oberfläche des Proteins genauer betrachtet wird (Abbildung 52). Wie bereits erwähnt, besitzt **Mb** vom Pferdeherz zwei Tyrosinreste (Tyr103 und Tyr 146), welche beide nah am aktiven Zentrum positioniert vorliegen (vgl. Abbildung 52A und Abbildung 52B). Bei der Betrachtung der räumlichen Positionen fällt auf, dass sich der Tyrosinrest an Position 146 in der Nähe des C-Terminus befindet. Des Weiteren ist Tyr146 durch drei Helixstrukturen umgeben, welche den Tyrosinrest in einem vorwiegend hydrophoben Bereich „ummanteln“. Die Positionierung dieses Tyrosinrestes könnte eine Modifizierung mittels der Linker bzw. eine DNA Konjugation erschweren, da die jeweiligen Kupplungsreaktionen durch räumliche Hinderung bzw. der starken Hydrophobizität erschwert werden könnten. Der Tyrosinrest an Position 103 ist im Gegensatz jedoch „frei-zugänglich“ und in einem hydrophilen Bereich auf der Oberfläche des Proteins lokalisiert. Dies lässt die Annahme zu, dass eine Modifizierung an der Position Tyr103 stark bevorzugt ist und dass die Hauptprodukte mit einem durchschnittlich Anteil von 94% (vgl. Kapitel 3.2.3.1) hauptsächlich durch Modifikationen an genau dieser Position gebildet werden. Die Nähe zum aktiven Zentrum begründet die Aktivitätssteigerung im Gegensatz zu nativen **Mb**, da die starke Hydrophilie in diesem Bereich die Wechselwirkung der ssDNA mit dem aktiven Zentrum erleichtert.

Wenn davon ausgegangen wird, dass eine Modifikation an der Position 104 bevorzugt stattfindet, müssen die verschiedenen Linkerstrukturen einen unterschiedlichen Einfluss auf die Interaktionen der ssDNA mit dem aktiven Zentrum hervorrufen, welche z.B. durch sterische Hinderungen des Linkers **BL-6** oder durch die räumliche Anordnungen der ssDNA auf der Oberfläche des Proteins erklärt werden kann. Für eine genauere Untersuchungen dieser Hypothese müssten die Modifikationspositionen bestimmt werden, indem z.B. die modifizierten Proteine mittels einer Protease verdaut, die einzelnen Fragmente mittels HPLC gereinigt und massenspektrometrisch analysiert werden. Einen weiteren interessanten Beitrag könnten molekularbiologische Ansätze bieten. Hierzu könnte ein einzelnes Tyrosin aus der Primärstruktur entfernt und die Mutanten hinsichtlich ihrer Modifizierungseffizienz untersucht und verglichen werden.

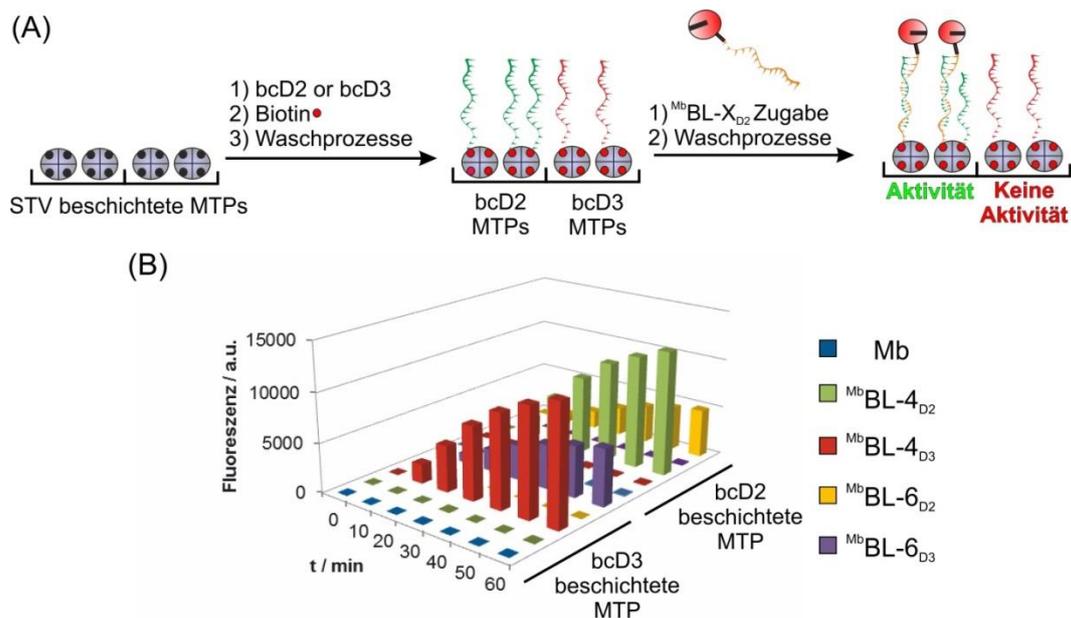
Zusätzlich kann durch die Betrachtung der räumlichen Orientierung der Tyrosinpositionen auch die in Kapitel 3.2.3.1 aufgestellte Hypothese zum gebildeten Nebenprodukt des <sup>Mb</sup>**BL-4<sub>D2</sub>** Konjugates genauer untersucht werden. Bei der Betrachtung der räumlichen Orientierung des Tyr146 Restes (vgl. Abbildung 52A und die Seitenansicht in Abbildung 52B) ist deutlich

zu erkennen, dass der Tyr146 Rest direkt zum Kofaktor Häm orientiert ist. Eine Modifizierung dieser Position mit ssDNA könnte durch sterische Hinderung des Kofaktors blockiert werden, da sich ein 22 Basen langer DNA Einzelstrang (Länge von ca. 8 nm) in einen dichten Reaktionsraum „orientieren“ müsste. Eine Abwesenheit des Kofaktors würde somit eine Modifizierung begünstigen, da ein größerer Reaktionsraum innerhalb des aktiven Zentrums vorliegen würde. Des Weiteren würde eine DNA Modifizierung des **ApoMb** an dieser Position ebenfalls die erschwerte Reinigung mittels der Anionenaustauschchromatographie erklären. Das konjugierte ssDNA Molekül würde aufgrund der räumlichen Anordnung des Tyr146 Restes eher im inneren des Proteins (evtl. sogar im aktiven Zentrum) von den Helices „ummantelt“ vorliegen und somit keinen großen Einfluss auf die Veränderung der Oberflächenladung des Proteins ausüben. Die Einbettung der DNA in das „freie“ aktive Zentrum des **ApoMb** könnte ebenfalls die schlechte Hybridisierungsfähigkeit dieser Spezies in Kapitel 3.2.4 erklären, da die ssDNA schwer zugänglich wäre und die Ausbildung zu einer starren dsDNA mit einer Länge von ca. 8 nm durch sterische Hinderungen erschwert wird.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass alle hergestellten Konjugate eine erhöhte Aktivität im Gegensatz zum nativen **Mb** aufweisen. Außerdem kann speziell im Fall des **Mb** eine erhöhte Regioselektivität der Konjugation erreicht werden, welche eine Positionierung der ssDNA in der unmittelbaren Nähe des aktiven Zentrums gewährleistet und somit einen hohen Vorteil im Gegensatz zu gängige Modifikationstypen (wie z.B. die Lysinmodifizierungen mittels sSMCC) bietet. An dieser Stelle muss erläutert werden, dass ein Vergleich zu Protein-DNA Konjugaten durchgeführt wurde, die mittels des kommerziell erhältlichen funktionellen Linkers sSMCC hergestellt wurden. Bei der Konjugation von **Mb** mittels sSMCC und der ssDNA **SHD2** konnte eine 2fache Erhöhung der Fluoreszenzsignale gegenüber nativen **Mb** gemessen werden, während die Konjugation mit der ssDNA **SHD3** nur eine 1,5fache Erhöhung hervorgerufen hat (vgl. Anhang 11.2.5, Seite 246). Diese ermittelten Werte sind weitaus niedriger als die gemessenen Werte nach der Konjugation mit dem Maleimid funktionalisierten Linker **BL-4** (4mal höher bei <sup>Mb</sup>**BL-4<sub>D2</sub>** und ca. 3mal höher bei <sup>Mb</sup>**BL-4<sub>D3</sub>**). Dieses Phänomen kann ebenfalls auf eine regioselektivere Kontrolle der Kupplung in der Nähe des aktiven Zentrums zurückgeführt werden.

### 3.2.6 DNA vermittelte Immobilisierung der Tyrosin modifizierten Myoglobin-DNA Konjugate

Um zu testen, ob die hergestellten Myoglobin-DNA Konjugate  $^{Mb}BL-4_D$  und  $^{Mb}BL-6_D$  auch für eine DNA vermittelte Immobilisierung (DDI) eingesetzt werden können, wurden die einzelnen Konjugate auf **bcD2** bzw. **bcD3** beschichteten STV Mikrotiterplatten immobilisiert. Die Herstellung der beschichteten Mikrotiterplatten erfolgte wie bereits im Kapitel 3.1.8 beschrieben. Um eine selektive Bindung der hergestellten  $^{Mb}BL-X_D$  Konjugate zu demonstrieren, wurden die Kavitäten, die mit komplementären oder nicht komplementären Fängeroligonukleotiden beschichtet waren, mit 50 pmol der Konjugate für eine Stunde bei RT inkubiert (vgl. Abbildung 53A). Nach der Inkubation wurde mehrmals gewaschen und die Fluoreszenzentwicklung der einzelnen Proben anschließend mittels AmpliFlu<sup>TM</sup> Tests untersucht (vgl. Abbildung 53B). Als Negativkontrolle wurden die Kavitäten ebenfalls mit nativen **Mb** inkubiert. Zur Analyse wurde eine 4fache Bestimmung durchgeführt und der Mittelwert der einzelnen Messwerte gebildet.



**Abbildung 53:** (A) Schematische Darstellung der DNA direkten Immobilisierung (DDI) eines  $^{Mb}BL-X_{D2}$  Konjugats auf **bcD2** beschichtete Mikrotiterplatten (MTP). Die MTP wurde zunächst mittels Streptavidin (STV) beschichtet und anschließend die einzelnen Kavitäten mittels biotinylierter komplementärer **bcD2** bzw. **bcD3** ssDNA modifiziert, um die selektive Hybridisierung des Konjugats mit seiner komplementären Sequenz zu verifizieren. Als Negativkontrolle wurden die modifizierte MTP ebenfalls mittels nativen Myoglobin (**Mb**) behandelt. (B) AmpliFlu<sup>TM</sup> Red Aktivitätstest der auf der Oberfläche selektiv immobilisierten  $^{Mb}BL-4_D$  und  $^{Mb}BL-6_D$  Konjugate im Vergleich zur Negativkontrolle mit nativen **Mb**. **Endkonzentration:** 50  $\mu$ M Amplex<sup>®</sup> Red, 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Die Ergebnisse in Abbildung 53B zeigen, dass die einzelnen Konjugate erfolgreich und selektiv über Watson-Crick Basenpaarung auf den **bcD2** bzw. **bcD3** modifizierten Oberflächen immobilisiert werden können. In den **bcD2** beschichteten Kavitäten können nur dort Fluoreszenzsignale beobachtet werden, indem zuvor die  $^{Mb}\mathbf{BL-X}_{D2}$  Konjugate inkubiert wurden, während analog in den **bcD3** beschichteten Kavitäten nur Signale bei den  $^{Mb}\mathbf{BL-X}_{D3}$  Konjugaten erkannt werden können. Weiterhin ist zu erkennen, dass die Fluoreszenzintensitäten der einzelnen Proben die gleiche Reihenfolge aufweisen, wie das Experiment in Lösung. Somit können bei den Konjugaten, welche mit dem Linker **BL-4** modifiziert wurden, höhere Fluoreszenzwerte beobachtet werden, als bei den Konjugaten, welche mit dem Linker **BL-6** hergestellt wurden. Des Weiteren weisen die mit der ssDNA **D2** modifizierten Konjugate wiederum höhere Signale auf, als die mit der **D3** modifizierten Spezies.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Linker **BL-4**, **BL-5** und **BL-6** erfolgreich für die Synthese von Protein DNA Konjugaten eingesetzt werden können. Hierzu kann eine zweistufige Reaktion eingesetzt werden, welche es erlaubt, DNA Moleküle über eine Tyrosinmodifizierung und einfacher Click-Chemie auf den Proteinoberflächen zu binden.

Besonders die Myoglobin-DNA Konjugate zeigten interessante Ergebnisse. Somit wiesen die hergestellten  $^{Mb}\mathbf{BL-X}_D$  Konjugate eine höhere Aktivität auf als das native **Mb** und konnten ebenfalls erfolgreich für eine DNA vermittelte Immobilisierung verwendet werden.

Die DNA vermittelte Immobilisierung auf STV modifizierten Mikrotiterplatten ermöglicht jedoch keine Abstandskontrolle der immobilisierten Konjugate. Wie bereits in der Einleitung erwähnt kann in diesem Fall die Origamitechnik eingesetzt werden. In dem nächsten Kapitel soll nun gezeigt werden, wie ein rechteckiges DNA Origami gestaltet und zusätzlich als Immobilisierungsplattform eingesetzt werden kann.

### 3.3 DNA-Origami als Immobilisierungsplattform

Wie in der Einleitung erwähnt, haben sich die Selbstassemblierungsprozesse von DNA Molekülen zu einem attraktiven Weg herauskristallisiert, da durch die hohe Spezifität der Watson-Crick Basenpaarung eine spontane Zusammenlagerung der Oligonukleotide zu zwei- und dreidimensionalen Konstrukten planbar und vorhersagbar wird<sup>98, 101, 106, 107</sup>. Die DNA-Nanostrukturen ermöglichen jedoch nicht nur eine Faltung in maßgeschneiderte geometrische Objekte, sondern gewährleistet ebenfalls eine Dekoration der Oberflächen mit DNA-(Bio-) Molekül Konjugaten in Nanometer Präzision (vgl. Einleitung Kapitel 2.4). Hierzu kann die geometrische Form der Doppelstrang DNA (dsDNA) ausgenutzt werden, um die gestalteten

Strukturen mit Einzelstrang DNA auf der Oberfläche zu dekorieren, welche als Fängeroligonukleotide eine Immobilisierung von DNA-(Bio-)Molekül Konjugaten in definierter räumlicher Position gewährleisten. Auch in dieser Arbeit sollte ein DNA-Origami Konstrukt entwickelt werden, das zukünftige Anwendung zur Immobilisierung von Protein-DNA Konjugaten in präzisen Abständen sicherstellt. In diesem Kapitel wird nun erläutert, wie ein rechteckiges DNA-Origamikonstrukt gestaltet, charakterisiert und mit Fängeroligonukleotiden modifiziert werden kann, um als Immobilisierungsplattform für zukünftige Anwendungen zu dienen.

### 3.3.1 Gestaltung eines rechteckigen DNA Origamis

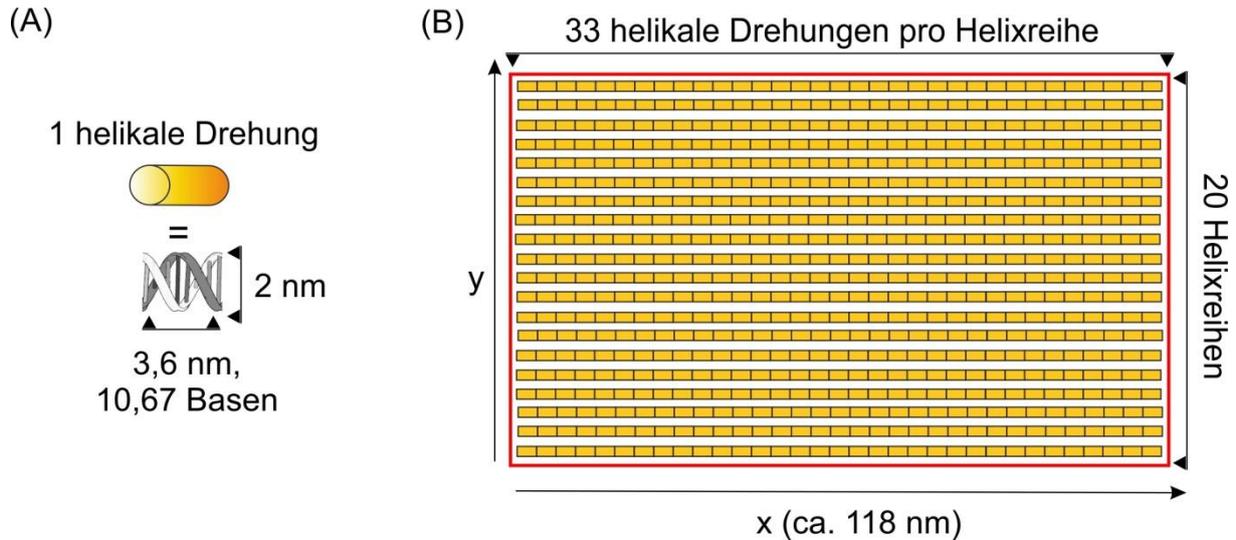
Das Prinzip des Origami-Designs kann insgesamt in zwei Hauptschritte eingeteilt werden. In dem ersten Schritt wird ein theoretisches Modell des Designs erstellt um es in einem zweiten Schritt mittels eines Computerprogramms zu vollenden. In dieser Arbeit wurde das Programm SARSE (engl.: „*Semi-Automated RNA Sequence Editor*“)<sup>104</sup> verwendet, welches ursprünglich zur RNA Sekundärstrukturanalyse entwickelt wurde. Eine modifizierte Version des Programms ist vom „*Center for DNA Nanotechnology (CDNA)*“ in Dänemark entwickelt worden und ist kostenlos unter <http://cdna.au.dk/software/> herunterladbar. Das Prinzip des Programms basiert auf die Einführung von gestalteten Bilddateien, indem es die spezifischen Umrisse einer Datei erkennt und automatisiert eine Vorversion des Origami-Konstrukts formt. Die Bilddateien können mit Hilfe eines theoretischen Modells konstruiert werden, wobei die Konstruktion in dieser Arbeit aufgrund der Komplexität des Programms nicht näher erläutert wird. Eine genauere Beschreibung zur Verwendung des Programms und zur Herstellung der Bilddateien kann entweder auf der Internetseite selbst oder aber auch in der Veröffentlichung von E. S. Andersen *et al.* eingesehen werden<sup>104</sup>. Dieser Abschnitt konzentriert sich auf die Erstellung des theoretischen Origami-Modells nach P. W. Rothemund<sup>29</sup>, um das Verständnis des Designs näher zu erläutern. In diesem Zusammenhang muss erwähnt werden, dass das Computerprogramm SARSE für eine 1,5fache helikale Windung ( $360^\circ + 180^\circ$ ) 16 Basen kalkuliert, welches 10,67 Basen pro Helixwindung ( $360^\circ$ ) widerspiegelt und mit der Windung der natürlichen B-DNA korrespondiert. Diese Werte wurden für die Erstellung des theoretischen Modells berücksichtigt.

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, setzt sich eine DNA Origami Nanostruktur aus einem langen, meist zirkulären Einzelstrang (über 1000 Basen) und meist hunderten kleinerer Einzelsträngen (zwischen 25-50 Basen) zusammen. Während als langer Gerüststrang, der sog.

„Scaffoldstrang“, meist die zirkuläre virale M13Mp18 ssDNA dient, sind die kürzeren Einzelstränge, sog. „Helferstränge“, leicht über DNA-Synthese zugänglich. Auch in dieser Arbeit wurde als Gerüststrang der kommerziell erwerbliche M13Mp18 Einzelstrang verwendet und zur Assemblierung eines rechteckigen DNA-Origamis eingesetzt.

Da der Scaffoldstrang als Templat zur Assemblierung des Origami-Konstruktes dient, darf ein theoretisches Model die Gesamtbasenzahl des M13Mp18 Genoms von 7249 Basen<sup>29</sup> nicht überschreiten. Aus diesem Grund wird in einem ersten Schritt zunächst ein Bild des gewünschten Konstruktes erstellt und anschließend wird die gewünschte Form mittels Doppelhelixreihen aufgefüllt, so dass ein sogenanntes Helixrastermodel entsteht (vgl. Abbildung 54). Die Doppelhelices selbst können als Zylinder dargestellt werden (Abbildung 54A), wobei jeder einzelne Zylinder eine helikale Windung von  $360^\circ$  mit einer Länge von ca. 3,6 nm und einer Breite von 2 nm darstellt. Da eine helikale dsDNA Windung einer Länge von ca. 10,67 Basen im Durchschnitt entspricht, können für das theoretische Model insgesamt ca. 679 Zylindereinheiten verwendet werden, ohne dass die Gesamtbasenzahl des Scaffoldstranges überschritten wird.

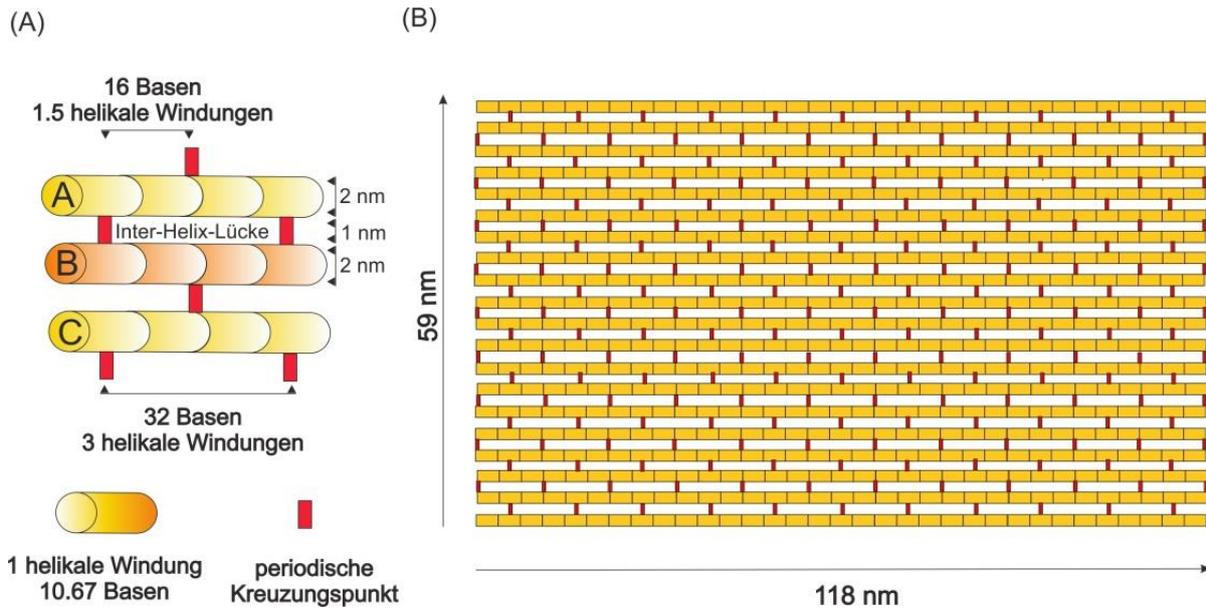
Für die Gestaltung eines Rechteckes wurden für das theoretische Model insgesamt 660 Einheiten (ca. 7042 Basen) verteilt und symmetrisch in insgesamt 20 Helixreihen angeordnet, wohingegen 19 Einheiten (ca. 207 Basen) nicht in das Design integriert wurden (Abbildung 54B). In diesem Zusammenhang muss erwähnt werden, dass das M13Mp18 Genom einen stabile Haarnadelstruktur mit einem 20 bp langen Stamm aufweist<sup>29</sup>, welche im späteren Design außerhalb des Faltungsbereiches lokalisiert wurden um eine bestmögliche Faltung des Konstruktes zu gewährleisten. Die einzelnen Zylinder dienen anschließend der theoretischen Kalkulation der Länge des Origamikonstruktes in x-Richtung, wobei die Länge der x-Strecke eine multiple Anzahl von 3,6 nm widerspiegelt. Somit kann eine theoretische Länge des Konstruktes von ca. 118 nm ermittelt werden ( $3,6 \text{ nm} * 33 \text{ helikale Windungen} = 118 \text{ nm}$ ).



**Abbildung 54:** Schematische Darstellung des theoretischen Helixrastermodells in Gestalt eines Rechtecks (rot) nach P. W. Rothmund.<sup>29</sup> Eine helikale Windung der dsDNA wird als Zylinder dargestellt, welcher eine Länge von 10,67 Basen (3,6 nm) und einer dsDNA Breite von 2 nm widerspiegelt.

Damit das Origami-Konstrukt „zusammengehalten“ werden kann, muss in einem nächsten Schritt der Verlauf der kurzen Helferstränge definiert werden. Hierzu werden sogenannte periodische Kreuzungspunkte (engl.: „*periodic cross-over*“) in das Design eingearbeitet (vgl. rote Übergänge in Abbildung 55). Die Kreuzungspunkte sind so gewählt, dass die Helferstränge, welche entlang einer Helixreihe verlaufen, an definierten geometrischen Stellen auf die benachbarten Helixreihen übergehen und antiparallel verlaufenden Helixreihen bilden (für den genaueren Verlauf der Helferstränge siehe untere Abbildung 57). Um eine planare zweidimensionale Faltung des langen Scaffoldstranges zu gewährleisten, sind die Kreuzungspunkte systematisch kalkuliert und sollen kurz an einem Beispiel erläutert werden (Abbildung 55A):

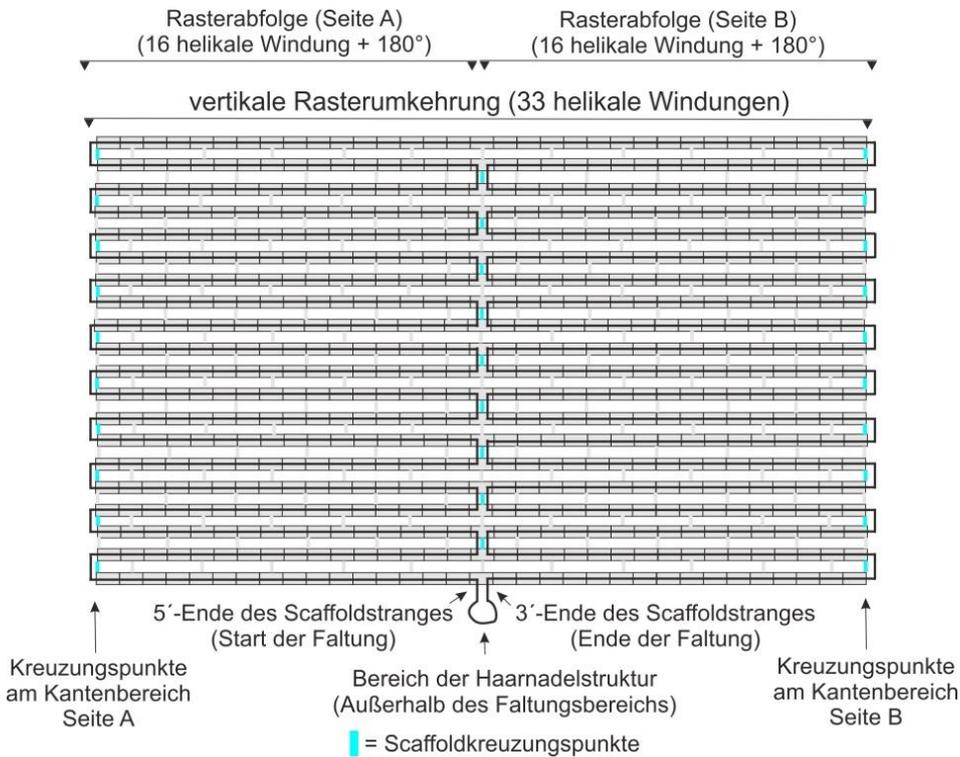
Verlaufen drei Helixreihen A, B und C parallel zueinander, so werden die periodischen Kreuzungspunkte so gewählt, dass der Übergang der Helferstränge zwischen den beiden Helixreihen A und B alle 32 Basen lang stattfindet. Diese Anordnung entspricht drei vollständigen helikalen Drehungen von  $3 \cdot 360^\circ$ . Die Kreuzungspunkte der beiden Helixreihen B und C sind jedoch im Vergleich zu den Kreuzungspunkten der Helixreihen A und B um 16 Basen ( $360^\circ + 180^\circ$ ) verschoben. Durch diese spezifische Anordnung wird gewährleistet, dass die mittlere Helixreihe B alle 16 Basen einen alternierenden Kreuzungspunkt mit der Helixreihe A und C aufweist und das Konstrukt somit weitestgehend planer vorliegt.



**Abbildung 55:** Schematische Darstellung der theoretischen Anordnung der periodischen Kreuzungspunkte (rot) innerhalb des DNA-Origami-Konstruktes.

Die systematischen periodischen Kreuzungspunkte wurden in das Helixrastermodell des Rechteckes eingefügt und die theoretische Breite des Konstruktes ermittelt (Abbildung 55B). Für zwei parallel verlaufender Helixreihen innerhalb des Konstruktes gilt, dass eine Helixreihe eine helikale DNA-Breite von ca. 2 nm widerspiegelt. Ältere Untersuchungen haben gezeigt<sup>29</sup>, dass parallel verlaufende Helices nicht dicht gepackt vorliegen, sondern aufgrund der elektrostatischen Abstoßungen des negativ geladenen Phosphatrückgrats eine Inter-Helix-Lücke von ca. 1 bis 2 nm aufweisen (Abbildung 55A), womit sich für die Kalkulation der Breite zweier parallel verlaufender Helices ein Wert von ca. 5 nm ergibt. Für die Gesamtbreite des Origami-Konstruktes in Abbildung 55B resultiert hieraus ein Wert von ca. 59 nm, welcher sich aus 20 Helixreihen ( $20 * 2 \text{ nm}$ ) und insgesamt 19 Inter-Helix-Lücken ( $19 * 1 \text{ nm}$ ) zusammensetzt.

In einem folgenden Schritt wurde der theoretische Verlauf des langen Gerüststranges in das Rastermodell eingefügt (Abbildung 56; schwarze Linie). Der Verlauf des Gerüststranges wurde so organisiert, dass in der Mitte des Konstruktes eine sogenannte Naht (engl.: „*seam*“) entsteht. Die Naht repräsentiert einen Bereich der Nanostruktur, welche nicht von dem Gerüststrang durchlaufen wird. Das Einfügen einer Naht reduziert die Spannkraft bei der Faltung eines zirkulären Einzelstranges und erhöht somit die Stabilität der Struktur<sup>29</sup>. Ebenfalls wird gewährleistet, dass bei einem zirkulären Genom die maximale Anzahl der Gerüststrangbasen für den Faltungsprozess zur Verfügung stehen.



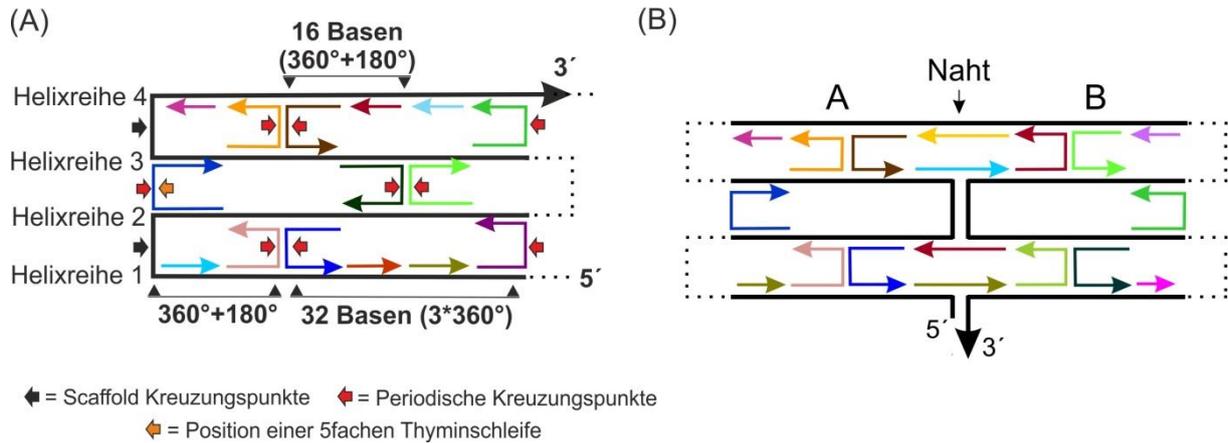
**Abbildung 56:** Theoretische Verlauf des Gerüststranges (schwarz) innerhalb des DNA-Origami-Nanokonstruktes. Die Scaffold-Kreuzungspunkte sind hellblau dargestellt, während für eine bessere Übersicht die einzelnen Zylinder des Rastermodells und die periodischen Kreuzungspunkte der Helferstränge grau hinterlegt wurden.

Der Verlauf des Gerüststranges kann in zwei verschiedene Richtungen eingeteilt werden. Der Startpunkt der Faltung des zirkulären Einzelstranges liegt am 5'-Ende in der Mitte des unteren Bereichs der Rastermodells (Abbildung 56). Anschließend wandert der Strang von einer Helixreihe zur parallel liegenden nächsten, wobei bei dem Übergang sogenannte Scaffold-Kreuzungspunkte (engl.:*“Scaffold cross-over“*) entstehen. Die Kreuzungspunkte liegen entweder an den Kantenbereichen der rechteckigen Struktur oder bilden in der Mitte des Konstruktes die Naht. Im oberen Bereich folgt nach dem Durchlaufen von 33 helikalen Drehungen eine sogenannte vertikale Rasterumkehrung und der Scaffoldstrang wandert entlang der Helixreihen zurück zum Startpunkt der Faltung. Bei der Ausbildung der Naht in der Mitte des Konstruktes entstehen somit zwei gleich große Helixrasterseiten, die im Konstrukt als Seite A und B bezeichnet werden. Die beiden Seiten weisen in ihrem Verlauf eine spezifische Abfolge der Scaffold-Kreuzungspunkte auf. Für die stufenweise Faltung des Stranges gilt, dass der Abstand von zwei aufeinander folgenden Kreuzungspunkten zweier benachbarter Helixreihen eine ungerade Anzahl von halben helikalen Windungen aufweisen muss ( $33 \cdot 180^\circ$ ). Somit wird die Stabilität des Origami-Konstruktes in einer Ebene

gewährleistet, da die räumlich Anordnung der Kreuzungspunkte von einer Helixreihe zu den benachbarten parallelen Helices um  $180^\circ$  verschoben ist ( $16 * 360^\circ + 180^\circ$ ). Eine Ausnahme stellt hier der Bereich der vertikalen Rasterumkehrung dar, bei dem die Kreuzungspunkte an derselben räumlichen Position angeordnet werden und eine gerade Anzahl von halben helikalen Drehungen aufweisen ( $66 * 180^\circ$  oder  $33 * 360^\circ$ ).

Um den genaueren Verlauf der Helferstränge und des Gerüststranges innerhalb des Origami-Konstruktes besser nachvollziehen zu können, ist in der Abbildung 57 der Verlauf mittels Pfeilen schematisch dargestellt. Hierbei ist der Gerüststrang schwarz dargestellt, während die einzelnen kurzen Helferstränge mit unterschiedlichen Farben koloriert wurden. Die Pfeilspitzen stellen das 3'-Ende der Einzelstränge dar, wohingegen die Pfeilursprünge das 5'-Ende repräsentiert. Die systematische Anordnung der periodischen Kreuzungspunkte ist durch einen roten Blockpfeil und die der Scaffold-Kreuzungspunkte durch einen schwarzen Blockfeil gekennzeichnet.

Wie bereits erwähnt, ist der Verlauf so gewählt, dass die Helferstränge beim Übergang auf die benachbarte Reihe antiparallel verlaufende Helixreihen mit dem Gerüststrang ausbilden. In diesem Zusammenhang muss erwähnt werden, dass an den Positionen der Kreuzungspunkte keine Hybridisierungen zwischen komplementären Basen stattfinden, sondern die Stränge direkt auf die benachbarte Helixreihe übergehen. Eine spezielle Gestaltung wurde jedoch bei den periodischen-Kreuzungspunkten am Kantenbereich durchgeführt (Abbildung 57A, orangener Blockpfeil). Hierbei wurden die Kreuzungspunkte mit einer 5fachen Thyminschleife (T) versehen, um zwischen zwei parallel laufenden Helices etwas an Flexibilität und somit Stabilität im Kantenaußenbereich zu gewährleisten und die Kräfte der elektrostatischen Wechselwirkungen der dicht gepackten Helixreihen auszugleichen. Die fünf Thyminen entsprechen einer Länge von ca. 1,7 nm, welche die ungefähre Breite der Inter-Helix-Lücke widerspiegelt.



**Abbildung 57:** (A) Schematische Darstellung des Verlaufs der Scaffold- (schwarzer Blockpfeil) und periodischen Kreuzungspunkte (roter Blockpfeil) in einem Teilbereich des Origami-Nanokonstrukts. (B) Schematische Darstellung der Gestaltung der Helferstränge im Bereich der Naht. Der Gerüststrang ist schwarz dargestellt, während die kurzen Helferstränge unterschiedliche koloriert wurden. Die Pfeilspitzen stellen das 3'-Ende eines Einzelstranges dar, wohingegen der Pfeilursprung das 5'-Ende repräsentiert.

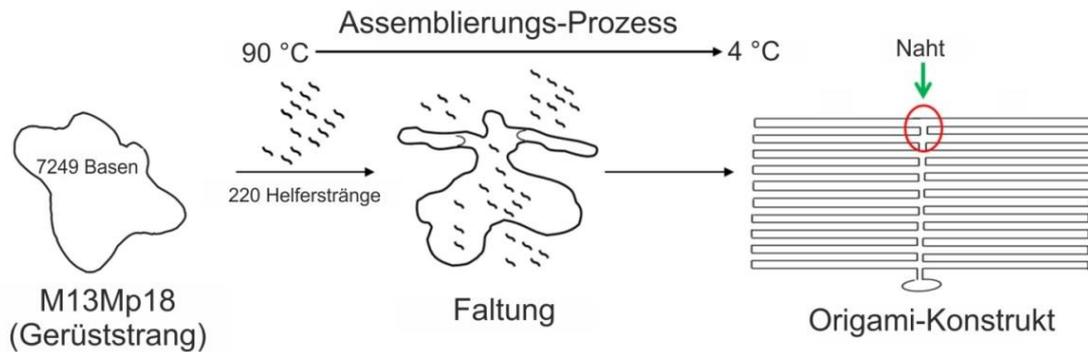
Auch im Bereich der Naht wurde der Verlauf der Helferstränge speziell gestaltet (Abbildung 57B). Um die beiden Konstruktsseiten A und B zusammenzuhalten, die durch die Einführung einer Naht entstehen, wurde der Verlauf so bestimmt, dass die einzelnen Helixreihen der beiden Seiten direkt über den Verlauf der Helferstränge „verbrückt“ werden. Der Grund der spezifischen Modifikation liegt darin, dass die einzelnen Helferstränge die Seite A und die Seite B des Origamikonstruktes verbinden und somit das Konstrukt stabilisieren. Des Weiteren wird durch den speziellen Verlauf gewährleistet, dass im Bereich der Naht beide Seiten dicht gepackt vorliegen.

Mittels des theoretischen Rastermodells kann letztendlich mittels der ermittelten Größe des Konstruktes eine Bilddatei erstellt werden<sup>104</sup>. Diese Bilddatei konnte anschließend dazu verwendet werden, die einzelnen Helferstränge unter der Zuhilfenahme des Computerprogramm SARSE zu gestalten und die spezifischen Sequenzen zu ermitteln, welche zur Assemblierung des langen M13Mp18 Stranges in eine rechteckige Gestalt verwendet werden können. Insgesamt wurden 220 Helferstränge gestaltet mit einer Länge zwischen 20 und 50 Basen und von der Firma Sigma erworben.

### 3.3.2 Assemblierung und Charakterisierungen des DNA Origamis

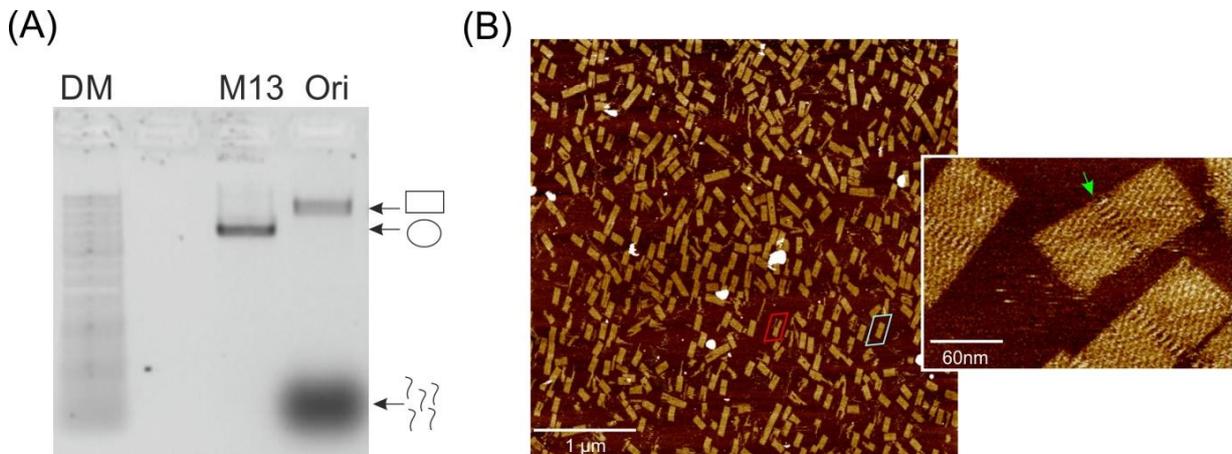
Die Assemblierung des Origami-Konstruktes erfolgte nach den praktischen Protokollen von P.W. Rothemund. Hierzu wurde der M13Mp18 Gerüststrang mit einem 100fachen Überschuss an Helfersträngen versetzt und die DNA-Mischung in einem Thermozykler auf

90 °C erhitzt (Abbildung 58). Anschließend wurde die DNA-Lösung in 0,1 °C pro Sekunde auf 4 °C abgekühlt, um die Hybridisierung und die damit verbundene Faltung in das Origami-Konstrukt zu gewährleisten.



**Abbildung 58:** Schematische Darstellung der Assemblierung des M13Mp18 Gerüststranges mit 220 Helfersträngen in ein rechteckig gestaltetes Origami-Konstrukt.

Nach der Assemblierung wurde das Origami mittels Agarosegelelektrophorese und Rasterkraftmikroskopie (engl.: „*Atomic Force Microscopy*; AFM“) charakterisiert.

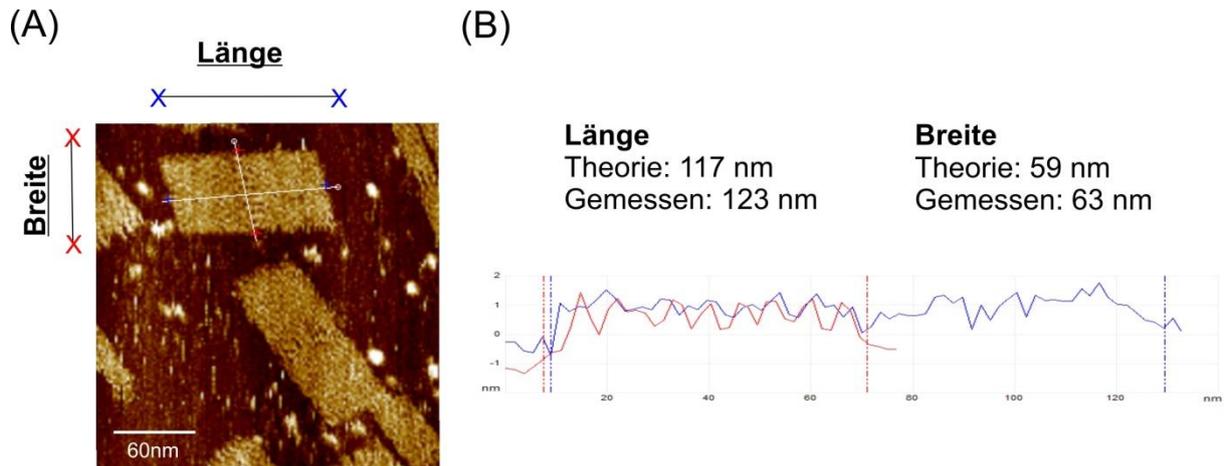


**Abbildung 59:** (A) Charakterisierung des Origamikonstrukts mittels Agarose-Gelelektrophorese. **DM:** 10 kbp DNA Marker; **M13:** M13Mp18 Einzelstrang; **Ori:** Assembliertes DNA-Origami. **Konditionen:** 1 % Agarosegel, TAE 1x Laufpuffer (pH 8,0), 50 V; **Laufzeit:** 1 h. (B) Rasterkraftmikroskopie Aufnahme des gefalteten DNA-Origamis. Als Fallbeispiel ist in der Übersichtsaufnahme ein beschädigtes Origami rot und ein richtig gefaltetes Origami blau markiert worden. Die Position der Naht innerhalb des Konstruktes ist in der Vergrößerung durch einen grünen Pfeil gekennzeichnet.

In Abbildung 59A ist die Charakterisierung des Origamikonstruktes mittels Agarose-Gelelektrophorese dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass das Origamikonstrukt (**Ori**) unter den verwendeten Gelkonditionen bei ca. 8 kbp eine langsamere elektrophoretische

Mobilität aufweist, als der M13Mp18 Einzelstrang (**M13**). Die langsamere Mobilität lässt sich durch die erhöhte Masse des Origamikonstruktes nach der Hybridisierung mit den Helfersträngen erklären. Bei der breiten Bande im unteren Gelbereich handelt es sich um den Überschuss der Helfersränge, welche nicht mit dem M13Mp18 Einzelstrang hybridisierten. Für eine genauere Charakterisierung wurde die Origami-Lösung ohne weitere Behandlungsschritte zur Analyse mittels AFM verwendet.

Die Abbildung 59B zeigt eine Rasterkraftmikroskopie-Aufnahme, welche in Zusammenarbeit mit Dr. B. Sacca vom Zentrum für Medizinische Biotechnologie (Universität Duisburg-Essen) erstellt wurde. In der Übersichtsaufnahme mit einer Auflösung von  $4 \times 4 \mu\text{m}$  können zahlreich gefaltete Rechtecke erkannt werden, welche eine erfolgreiche Assemblierung des DNA-Origamis verifizieren (als Fallbeispiel sind einzelne Konstrukte blau markiert). Neben der erfolgreichen Assemblierung konnten jedoch zahlreiche Konstrukte erkannt werden, welche Defekte in unterschiedlichen Größenordnungen aufweisen, wobei einige dieser Konstrukte mittels eines roten Rechtecks hervorgehoben sind. Diese Defekte können durch das Abtasten der Oberfläche mit dem *Cantilver* entstanden sein oder aber durch die schnelle Assemblierungszeit des Origami-Konstruktes von ca. 15 min ( $0,1 \text{ }^\circ\text{C/s}$ ). Eine langsamere Assemblierungszeit konnte jedoch nicht getestet werden, da bei dem vorhandenen Thermozykler kein langsamerer Gradient eingestellt werden konnte. Trotz allem konnte durch Auszählung der Rasterkraftmikroskopiebilder eine hohe Ausbeute der richtig gefalteten Strukturen von nahezu 89 % ermittelt werden, welches mit bereits veröffentlichten Daten anderer planarer Konstrukte im Einklang steht<sup>29, 169</sup> und die Stabilität der Gestaltung unterstreicht. In der Nahaufnahme mit einer Auflösung von ca.  $220 \times 220 \text{ nm}$  in Abbildung 59B sind die einzelnen Helixreihen und der speziell gestaltete Bereich der Naht (grüner Pfeil) deutlich zu erkennen.



**Abbildung 60:** (A) Rasterkraftmikroskopieaufnahme und die Positionen der ermittelten Breite (rot) und Länge (blau) des rechteckig gefalteten Origamis. (B) Gemessenen Werte der Größenordnung mittels des Computerprogramms *NanoScope*.

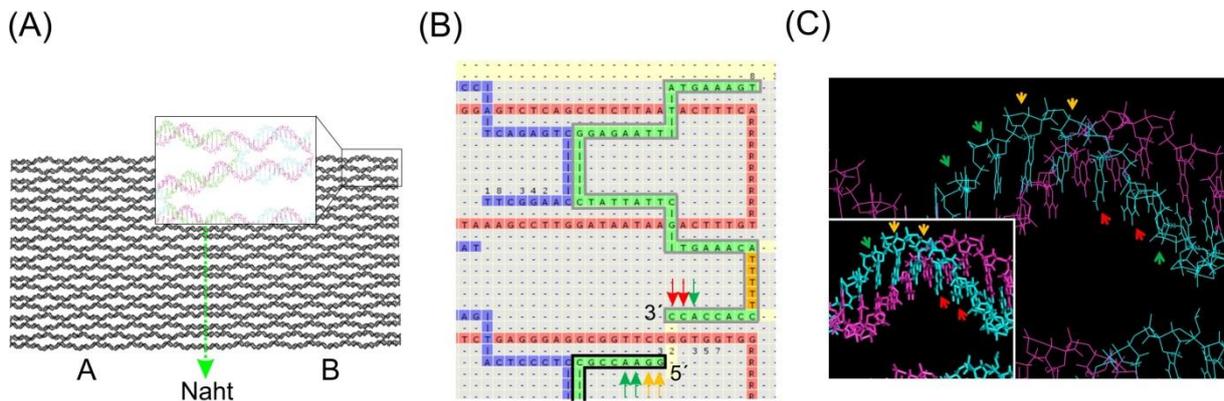
Neben der Kalkulation der Ausbeute konnten die AFM Aufnahmen zur Analyse der Größe des Origamis verwendet werden (vgl. Abbildung 60A und Abbildung 60B). Hierzu wurde das Computerprogramm *NanoScope* von *Digital Instruments/Veeco* verwendet und die Länge und Breite des Konstruktes ermittelt (vgl. Abbildung 60B farblicher Graph). Die detektierte Nanostruktur in Abbildung 60A besitzt eine Länge von ca. 63 nm und eine Breite von ca. 123 nm, wobei die gemessenen Werte um ca. 5 % von den theoretisch ermittelten Werten abweichen. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die zweidimensionale Darstellung des theoretischen Rastermodells die Verzerrung und Flexibilität der parallel verlaufenden Helices an den periodischen Kreuzungspunkten und an den Scaffoldkreuzungspunkten nicht berücksichtigt. Aus diesem Grund sind speziell die y- Dimensionen des theoretischen Modells meistens um ein vielfaches größer, als die beobachteten Strukturen unter dem AFM.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Origami-Assemblierung erfolgreich durchgeführt werden konnte und hohe Ausbeuten der richtig gefalteten Strukturen unter den angewandten Konditionen erreicht werden. Um jedoch die Immobilisierung von Protein-DNA Konjugaten in Nanometer Präzision zu gewährleisten, musste die Nanostruktur mit Fängeroligonukleotiden versehen werden.

### 3.3.3 Modifizierung des Origamis mit Fängeroligonukleotiden

Die Modifizierung des Origamis mit Biomolekül-DNA Konjugaten wird über Modifikationen der kurzen Helferstränge garantiert. Hierbei kann der geometrische Verlauf der Stränge dazu verwendet werden, an bestimmten Basenpositionen eine spezifische

Einzelstrangverlängerung durchzuführen, welche anschließend als sogenannte Fängeroligonukleotide (engl.; „*protruding arms*“) aus der Oberfläche des Konstruktes herausragen. In diesem Zusammenhang müssen zunächst die Modifikationspositionen für die Einzelstrangverlängerungen bestimmt werden. Die Positionen wurden so gewählt, dass sich die Fängeroligonukleotide auf der Oberfläche des Nanokonstruktes befinden, um eine weitestgehend senkrechte Immobilisierung von Protein-DNA Konjugaten zu gewährleisten. Die Wahl der Modifikationen wird im Folgenden an einem Fallbeispiel kurz erläutert.



**Abbildung 61:** (A) Dreidimensionale Darstellung des Origamis mittels des Computerprogramms Chimera 1.9. Der obere Kantenbereich der Seite B an der vertikalen Rasterumkehrung ist vergrößert dargestellt worden. (B) Darstellung des Verlaufs der gestalteten Helferstränge (grün und blau) entlang des Scaffoldstranges (rot) innerhalb des Computerprogramms SARSE. (C) Dreidimensionale Darstellung der Position von den markierten Basen in Abb. B (Pfeile) mittels des Computerprogramms PyMol 1.6.

In Abbildung 61A ist die Struktur des rechteckigen Origamis in einer Frontalansicht dargestellt. Die Abbildung wurde mittels der SARSE Daten und des Computerprogramms PyMol 1.6 erstellt. Um die Gestaltung der betrachteten Origamioberfläche mit Fängeroligonukleotide näher zu erläutern, müssen zunächst die räumliche Anordnung der einzelnen Basen näher analysiert werden. Zur Anschauung wurde der Kantenbereich der vertikalen Rasterumkehrung innerhalb der Seite B gewählt (vgl. Markierung).

In Abbildung 61B ist der markierte Bereich der Abbildung 61A und der Verlauf des Gerüststranges und der Helferstränge innerhalb des SARSE Programms abgebildet. Der Verlauf des Gerüststranges ist rot angezeigt, während die Verläufe der Helferstränge grün bzw. blau koloriert sind. Die Zahlen Y.X geben die Positionen des einzelnen Helferstränge innerhalb des Programms wieder (Y: Reihe; X: Spalte), wobei die Zahlenmarkierungen gleichzeitig das 5'-Ende der Helferstränge repräsentieren. Die einzelnen Nukleobasen sind mit den bekannten Abkürzungen A, T, G und C dargestellt, während die gelbe Markierung

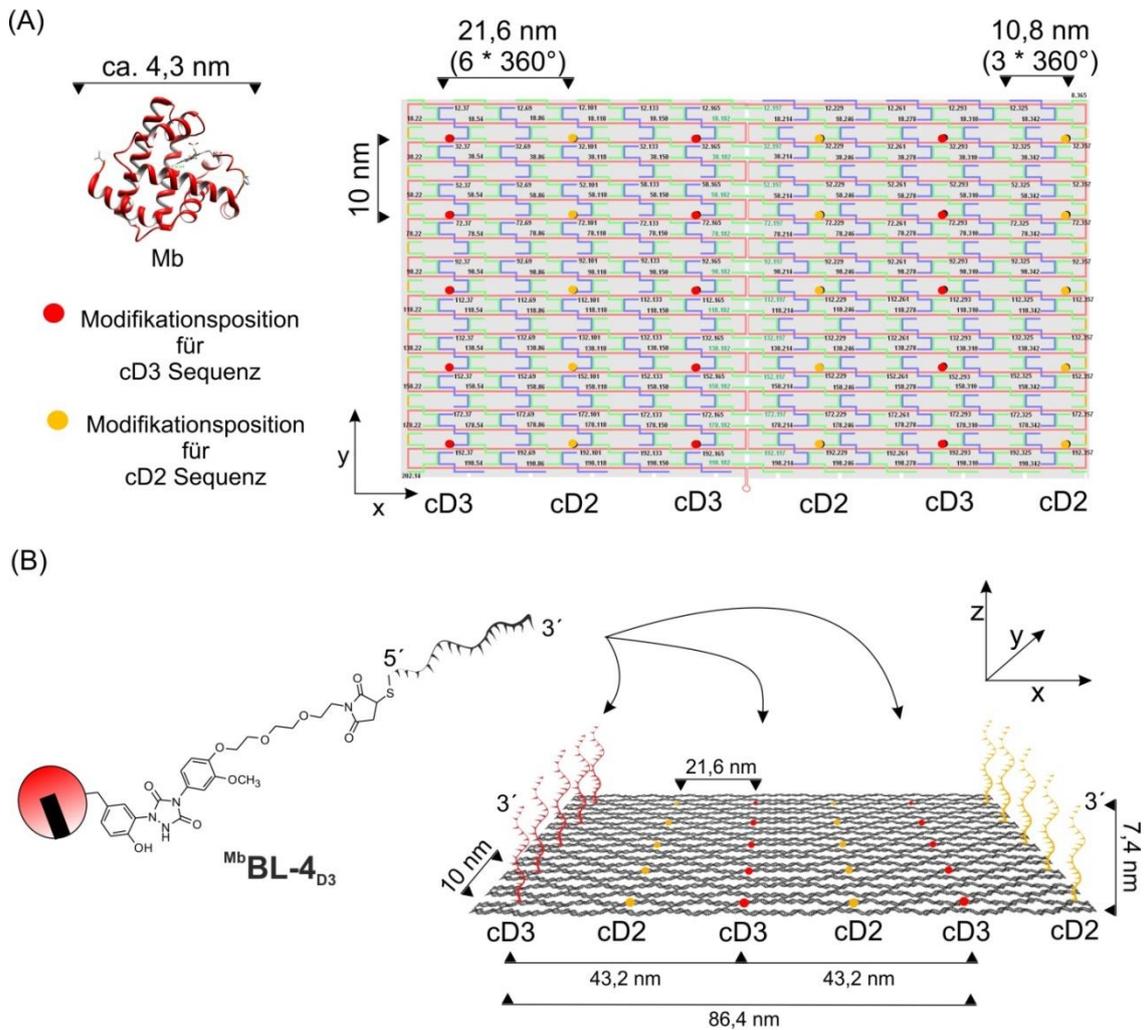
eine speziell gestalteten Thyminschleife an dem Kantenbereich des Konstruktes wiedergibt (vgl. Abbildung 57). Die R Bereiche an den Kreuzungspunkten des Gerüststranges beinhaltet keine Basen und werden zur zweidimensionalen Darstellung automatisiert vom SARSE Programm eingefügt.

Betrachtet man die räumliche Position der Basen des grau markierten und des schwarz markierten Helferstranges, so ist in der dreidimensionalen Darstellung in Abbildung 61C deutlich zu erkennen, dass sich die Basen an den 5'- bzw. 3'-Endpositionen beider Helferstränge auf der Oberfläche des Nanokonstrukts befinden (vgl. Abbildung 61B und Abbildung 61C, Pfeile). Eine Verlängerung der Helferstränge-Sequenzen an einer dieser Positionen würde somit eine Modifizierung des Origamis gewährleisten, indem sich die Fängeroligonukleotid-Sequenzen auf der Oberfläche des Konstrukts befinden.

Um diesen Sachverhalt etwas genauer zu erläutern, kann der Verlauf der restlichen Helferstränge in Abbildung 62A näher betrachtet werden. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Helferstränge innerhalb des Konstruktes die gleiche systematische Gestaltung aufweisen. Somit sind die Basenpositionen innerhalb einer Helixreihe an den 3'- bzw. 5'-Enden um genau  $3 \cdot 360^\circ$  (ca. 10,8 nm) voneinander entfernt und liegen alle hinsichtlich ihrer räumlichen Positionen auf der definierten Oberflächenseite des Origamis. Aus diesem Grund kann das Origami gezielt durch Verlängerungen einzelner Helferstränge an den 5' bzw. 3'-Enden in Nanometerabständen mit Fängeroligonukleotiden modifiziert werden.

Für die folgenden Testimmobilisierungen wurden die hergestellten Myoglobin-DNA Konjugate <sup>Mb</sup>BL-4<sub>D2</sub> und <sup>Mb</sup>BL-4<sub>D3</sub> aus Kapitel 3.2.3.1 verwendet. Um eine Immobilisierung der Konjugate sicherzustellen, wurden einzelne Helferstränge an definierten Positionen der 3'-Enden mit der jeweiligen komplementären Sequenz verlängert (vgl. Abbildung 62A). Für die Abstände der Modifikationspositionen in x- bzw. y-Richtung wurde der theoretische Durchmesser des Proteins Myoglobin von ca. 4,3 nm berücksichtigt, um sterische Hinderungen der Immobilisierung zu minimieren. Aus diesem Grund wurde innerhalb einer Helixreihe in x-Richtung ein Abstand von insgesamt 6 helikalen Windungen (21,6 nm) gewählt, wobei alternierend eine **cd2** bzw. **cd3** Sequenz an die 3'-Enden der Helferstränge integriert wurde. Für die Modifizierung in y-Ausrichtung wurde hingegen ein Abstand von 4 Helixreihen (ca. 10 nm) verwendet. Insgesamt konnten somit 30 Fängeroligonukleotide auf der Oberfläche des Origamis integriert werden, indem insgesamt 6 parallel verlaufender Fängeroligonukleotid-Reihen gestaltet wurden in denen pro Reihe 5 Proteine immobilisiert werden können. Die Anordnungen der Modifikationspositionen sind in Abbildung 62 zwei-

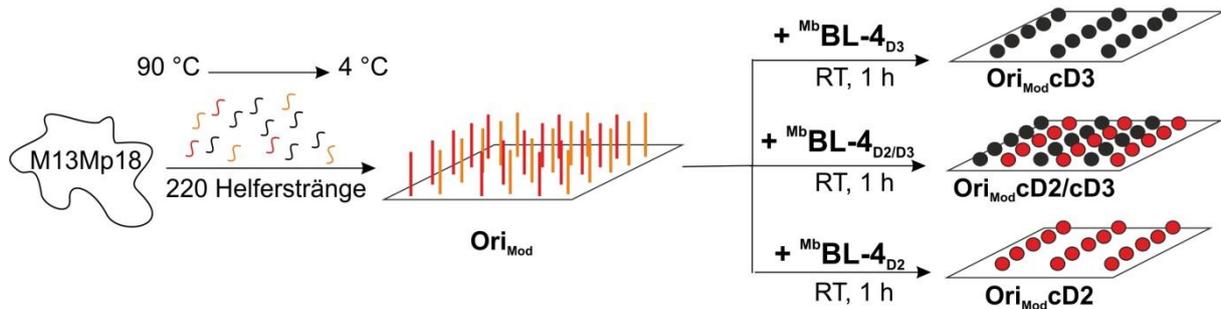
und dreidimensional schematisch dargestellt. Die Verlängerung der 3'-Enden sichert ebenfalls eine senkrechte Immobilisierung der Konjugate mit einem Abstand des Proteins zur Origamioberfläche von ca. 7,5 nm in z Richtung (22 Basen) (vgl. Abbildung 62B). Durch den Immobilisierungsabstand werden elektrostatische Wechselwirkung der negativ geladenen Origamioberfläche mit der Oberflächenladung des Proteins verringert, welche eine Hybridisierung der Konjugate in senkrechter Ausrichtung erschweren könnten.



**Abbildung 62:** (A) Modifikationspositionen an den Helfersträngen zur systematischen Dekorierung der Oberfläche des Origami-Konstrukts mit Fängeroligonukleotiden. Die roten Punktmarkierungen geben die 3'-Positionen wieder, welche zur Einführung der komplementären **cD3** Sequenz verwendet wurden, während die gelben Punkte die Modifikationsposition der **cD2** Sequenz darstellen. (B) Schematische Darstellung der Hybridisierung des <sup>Mb</sup>BL-4<sub>D3</sub> Konjugats auf die Oberfläche der modifizierten Origami-Struktur. Die Positionen der Fängeroligonukleotide mit der **cD2** (gelb) bzw. **cD3** (rot) Sequenz sind am Randgebiet als Einzelstränge abgebildet, während ihre Modifikationspositionen innerhalb des Konstruktes aufgrund der Übersicht als Punkte dargestellt wurden.

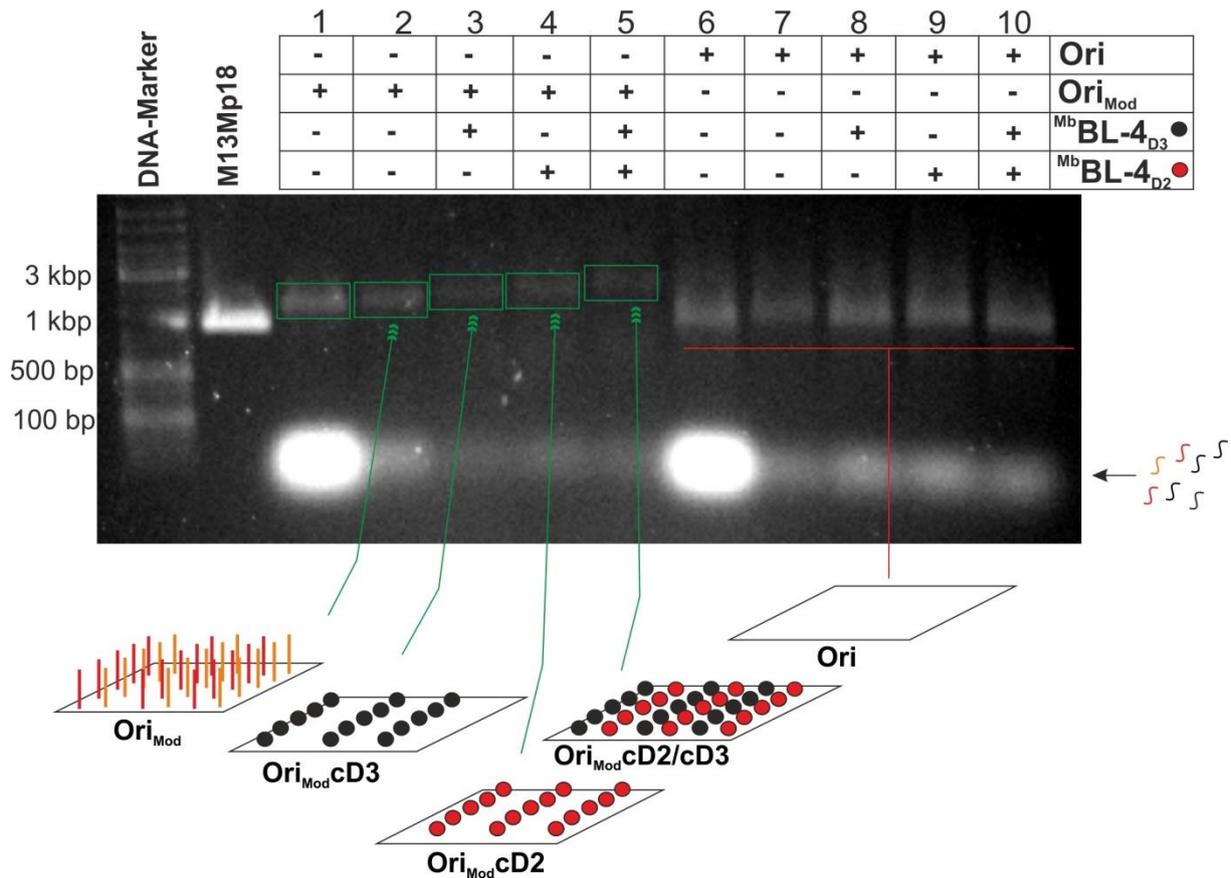
### 3.3.4 Immobilisierung von Myoglobin-DNA Konjugaten

Die aus Kapitel 3.3.3 modifizierten Helferstränge wurden von der Firma Sigma erworben und die Assemblierung des Origamis wurde nach Kapitel DAV 14 durchgeführt, indem die Gerüststranglösung mit einem 100fachen Überschuss an Helfersträngen versetzt und von 90 °C auf 4 °C in 0,1 °C pro Minute abgekühlt wurde. Anschließend wurde die Lösung mit den Fängeroligonukleotiden modifizierte Origami (**Ori<sub>Mod</sub>**) mittels Zentrifugalfiltrationsröhrchen behandelt, um den Überschuss an Helferstränge zu entfernen. Für die Testhybridisierungen wurde das **Ori<sub>Mod</sub>** mit frisch hergestellten <sup>Mb</sup>**BL-4<sub>D2</sub>** bzw. <sup>Mb</sup>**BL-4<sub>D3</sub>** Konjugaten für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert (Abbildung 63). Hierbei wurde ein 50facher Überschuss der Konjugate im Vergleich zur eingesetzten Menge der Helferstränge verwendet, um eine vollständige Hybridisierung zu gewährleisten.



**Abbildung 63:** Schematische Darstellung der Assemblierung des mit Fängeroligonukleotiden modifizierten Origamis **Ori<sub>Mod</sub>** und anschließende Immobilisierung der <sup>Mb</sup>**BL-4<sub>D2</sub>** bzw. <sup>Mb</sup>**BL-4<sub>D3</sub>** Konjugate.

Als Immobilisierungstest wurden drei verschiedene Experimente durchgeführt. Das **Ori<sub>Mod</sub>** wurde entweder mit einem der beiden Konjugate oder aber mit beiden Konjugaten zusammen inkubiert. Aus diesem Grund konnten drei unterschiedliche Immobilisierungsprodukte gewonnen werden, welche als **Ori<sub>Mod</sub>cD2**, **Ori<sub>Mod</sub>cD3** oder **Ori<sub>Mod</sub>cD3/cD4** bezeichnet wurden, je nachdem welche Fängeroligonukleotidsequenzen, entweder **cD2** oder **cD3**, mit den korrespondierenden Konjugaten zur Immobilisierung verwendet wurden (Abbildung 63). Die Produkte wurden anschließend mittels Agarose-Gelelektrophorese charakterisiert. Als Negativkontrolle wurde das nicht modifizierte Origami (**Ori**) unter gleichen Bedingungen mit den Konjugaten inkubiert und als Vergleichsproben in das Gel aufgetragen (Abbildung 64).



**Abbildung 64:** Charakterisierung der Immobilisierung der MbBL-X<sub>D2</sub> bzw. MbBL-X<sub>D3</sub> Konjugate auf das mit Fängeroligonukleotid modifizierte Origami (Ori<sub>Mod</sub>) mittels Agarose-Gelelektrophorese. **Konditionen:** 0,75 % Agarosegel, TBE 1x Laufpuffer (pH 8,0), 80 V; 4 °C **Laufzeit:** 2 h, **Färbung:** SYBRGold®. **Bahn 1:** Ori<sub>Mod</sub> nach der Assemblierung, **Bahn 2:** Ori<sub>Mod</sub> nach der Behandlung mit Ultrafiltrationsröhrchen; **Bahn 3-5:** Inkubation von Ori<sub>Mod</sub> mit den jeweiligen Konjugaten MbBL-4<sub>D2</sub> bzw. MbBL-4<sub>D3</sub>; **Bahn 6:** Ori nach der Assemblierung; **Bahn 7:** Ori nach der Behandlung mit Ultrafiltrationsröhrchen; **Bahn 8-10:** Inkubation von Ori mit den jeweiligen Konjugaten MbBL-4<sub>D2</sub> bzw. MbBL-4<sub>D3</sub>.

In Abbildung 64 ist die Analyse der Hybridisierungsexperimente mittels Agarose-Gelelektrophorese dargestellt. In diesem Zusammenhang muss erläutert werden, dass für jedes Experiment aus einer Stammlösung die gleiche Menge an Origami eingesetzt und für die anschließende Gelcharakterisierung verwendet wurde. Somit ist es möglich, mittels des Computerprogramms ImageJ und über Densitometrie die Ausbeuten bzw. den Verlust an DNA quantitativ zu bestimmen. Bei der Betrachtung des Gels ist zunächst zu erkennen, dass ca. 70 % der überschüssigen Helferstränge der assemblierten Ori bzw. Ori<sub>Mod</sub> Proben (Vergleiche Bahn 1 und 2 bzw. Bahn 6 und 7) durch die Behandlung mittels Ultrafiltrationsröhrchen entfernt werden konnten, welches durch die Abnahme der Bandenintensitäten erkannt werden kann (vgl. Pfeilmarkierung). Neben der Entfernung der Helferstränge kann jedoch ebenfalls entnommen werden, dass nach der Behandlung der Origamiprobe mittels

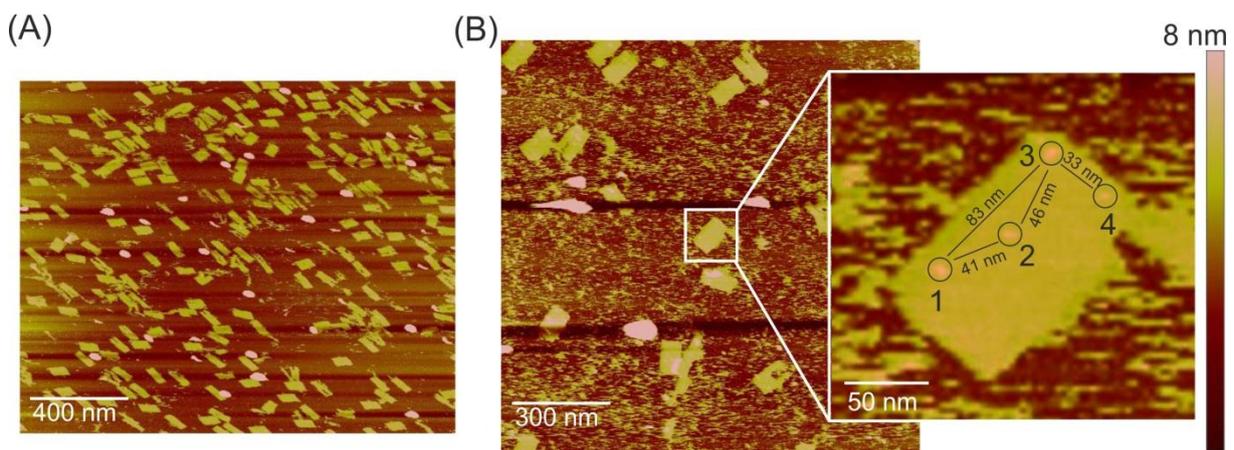
Zentrifugation ca. 40 bis 60 % der gefalteten Produkte bei ca. 1,5 kbp verloren gegangen sind. Um die Verluste für zukünftige Experimente zu verringern, müssten die Behandlungsmethoden angepasst werden, indem mildere experimentellere Bedingungen, wie z.B. Größenausschlussverfahren, zur Entfernung der Helferstränge verwendet werden könnten.

Bei der Betrachtung der Immobilisierungsexperimente mit dem modifizierten Origami **Ori<sub>Mod</sub>** in den Bahnen 3-5 kann festgestellt werden, dass nach der Zugabe des <sup>Mb</sup>**BL-X<sub>D2</sub>** (Bahn 4) bzw. <sup>Mb</sup>**BL-X<sub>D3</sub>** (Bahn 3) Konjugats eine etwas langsamere elektrophoretische Mobilität gegenüber der reinen **Ori<sub>Mod</sub>** Probe in Bahn 2 auftritt, wobei sich die langsamere Mobilität über die erhöhte molekulare Masse und die damit verbundenen erfolgreiche Immobilisierung der einzelnen Konjugate erklären lässt. Diese Hypothese kann durch die Betrachtung der Bahn 5 des **Ori<sub>Mod</sub>cD2/cD3** und den Negativkontrollen in den Bahnen 7-10 verstärkt werden. Nach der Inkubation des **Ori<sub>Mod</sub>** mit beiden Konjugaten (vgl. Bahn 5) kann wiederum eine etwas langsamere Mobilität gegenüber der **Ori<sub>Mod</sub>cD2** bzw. **Ori<sub>Mod</sub>cD3** Produkte in den Bahnen 3 bzw. 4 beobachtet werden, welches auf die erfolgreiche Immobilisierung beider Konjugate hindeutet. Des Weiteren kann keine Veränderungen des Laufverhaltens bei den Negativkontrollen in den Bahnen 7-10 erkannt werden, indem das nicht modifizierte Origami **Ori** mit den jeweiligen Konjugaten inkubiert wurde. Dies lässt die Annahme zu, dass die Konjugate nur über die vorhandenen Fängeroligonukleotide des **Ori<sub>Mod</sub>** spezifisch auf der Oberfläche immobilisiert werden und die Immobilisierung erfolgreich durchgeführt werden konnte.

Um die Immobilisierung der Protein-DNA Konjugate weiter verifizieren zu können, wurden in Zusammenarbeit mit Frau Dr. R. Meyer (AK Prof. Niemeyer, KIT) erste Testexperimente zur Detektion der modifizierten Strukturen mittels Rasterkraft-Mikroskopie durchgeführt. In diesem Zusammenhang muss erläutert werden, dass zum Zeitpunkt der Analysen einige Probleme bei der Kalibrierung des AFM Systems vorlagen, welches eine Detektion der Strukturen in Nanometer Maßstab behinderte. Somit konnten nur einige Übersichtsaufnahmen mit einer Auflösung von minimal 1,5 x 1,5 µm erstellt werden, welches die Detektion der Myoglobine auf der Oberfläche des Origamis mit einem Durchmesser von ca. 4,3 nm erschwerte. Aus diesem Grund müssten die ersten Experimente wiederholt und experimentell angepasst werden, um eine genauere Analyse der Strukturen durchzuführen. Nichts desto trotz konnten erste Erkenntnisse erzielt werden, welche für zukünftige Durchführungen herangezogen werden können.

Vor den Immobilisierungsexperimenten wurde zunächst das reine **Ori<sub>Mod</sub>** Konjugat mittels AFM charakterisiert. In der Übersichtsaufnahme in Abbildung 65A mit einer Auflösung von  $1,7 * 1,7 \mu\text{m}$  können zahlreiche gefaltete Rechtecke erkannt werden. Durch die Auszählung der richtig gefalteten Strukturen kann eine Ausbeute von nahezu 83 % ermittelt werden, welches die Stabilität der modifizierten Origamistruktur **Ori<sub>Mod</sub>** bekräftigt.

Anschließend wurde für ein erstes Immobilisierungsexperimente das Konjugat **<sup>Mb</sup>BL-X<sub>D3</sub>** verwendet. Hierzu wurde das **Ori<sub>Mod</sub>** frisch assembliert und ohne weitere Behandlung für den Immobilisierungstest eingesetzt. Das Origami wurde für 30 min bei Raumtemperatur mit einem 4fachen Überschuss an Konjugat inkubiert und die AFM Analyse direkt durchgeführt (vgl. Abbildung 65B). Der Überschuss wurde in Bezug auf die eingesetzte Menge an Helfersträngen, welche zur Assemblierung der Struktur verwendet wurden, gewählt. Somit sollten statistisch gesehen maximal vier Protein-DNA Konjugate auf der Oberfläche des Origamis vorliegen. Im Gegensatz zu einem 4fachen Überschuss wurde ebenfalls ein 15facher bzw. 50facher Überschuss verwendet, um eine vollständige Sättigung der Fängeroligonukleotide zu gewährleisten. In diesen Fällen konnte jedoch keine Visualisierung der immobilisierten Konjugate durchgeführt werden, da die hohen Proteinnengen auf der Micaoberfläche eine Detektion zusätzlich erschwerte. Für zukünftige Experimente müsste die nicht immobilisierten Konjugate und die überschüssigen Helferstränge vor der AFM Charakterisierung entfernt werden, indem die Probe vorher z.B. mittels Ultrafiltrationsröhrchen oder Größenausschlussverfahren behandelt wird.

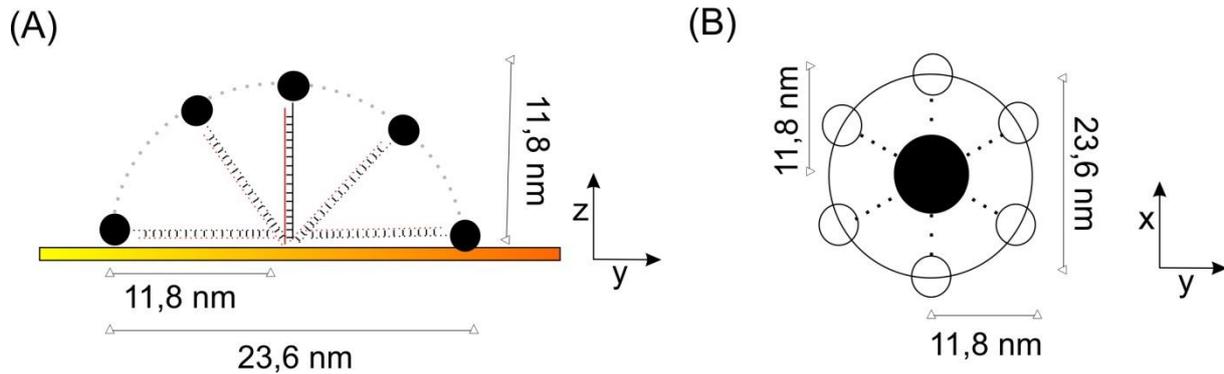


**Abbildung 65:** (A) Rasterkraftmikroskopie Aufnahme des modifizierten DNA-Origamis **Ori<sub>Mod</sub>** (Auflösung:  $1,7 * 1,7 \mu\text{m}$ ). (B) Rasterkraftmikroskopie Aufnahme des immobilisierten Konjugats **<sup>Mb</sup>BL-4<sub>D3</sub>** auf die **Ori<sub>Mod</sub>** Oberfläche (Auflösung:  $1,5 * 1,5 \mu\text{m}$ ). Zur Immobilisierung wurde das **Ori<sub>Mod</sub>** mit einem 4fachen Überschuss an Konjugat für ca. 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die angegebenen Abstände der beobachteten Proteine auf der Oberfläche der Struktur wurden mittels des Computerprogramms NanoScope ermittelt.

In Abbildung 65B ist eine AFM Aufnahme gezeigt, in welcher eine Origamistruktur erkannt wird, die eine erfolgreiche Immobilisierung der Konjugate verifizieren könnte. Bei der näheren Betrachtung der Nanostruktur in der Mitte der AFM-Aufnahme (weiße Markierung) können insgesamt vier Objekte auf der Oberfläche erkannt werden (schwarz umrandet), welche einen Durchmesser von ca. 5 nm aufweisen und somit mit dem theoretisch kalkulierten Durchmesser des Myoglobins von 4,3 nm korrespondieren.

Des Weiteren können die Abstände der einzelnen Objekte mittels des Computerprogramms NanoScope bestimmt werden. Bereits in Kapitel 3.3.3 wurden die theoretisch kalkulierten Abstände erläutert und grafisch dargestellt. Vergleicht man die theoretisch kalkuliert mit den gemessenen Werten (vgl. Abbildung 62, Seite 118), so kann erkannt werden, dass die Werte nahezu übereinstimmen. Der Abstand zwischen den beiden Objekten 1 und 3 beträgt ca. 83 nm und weicht um etwa 4 % von dem theoretisch kalkulierten Abstand (ca. 86,4 nm) ab. Auch der Abstand zwischen den Objekten 1 und 2 (41 nm) bzw. 2 und 3 (46 nm) zwischen zwei parallel verlaufender Fängeroligonukleotidreihen liegt nahe an den theoretisch kalkulierten Wert von ca. 43,2 nm (Abweichung von ca. 7 %). Betrachtet man den Abstand von 33 nm der Objekte 3 und 4, so könnte dieser Wert den theoretischen Abstand von ca. 30 nm zweier Proteine innerhalb einer Fängeroligonukleotidreihe repräsentieren und würde somit um ca. 9 % abweichen.

Die Abweichungen können über die Flexibilität der parallel verlaufenden Helices innerhalb des Origami-Konstruktes erklärt werden. Weiterhin muss jedoch beachtet werden, dass die Protein-DNA Konjugate nicht zwangsläufig senkrecht auf der Oberfläche des Konstruktes immobilisiert vorliegen, sondern sich auf der Oberfläche flexibel bewegen können. Speziell eine elektrostatische Wechselwirkung der Proteine mit der negativ geladenen Oberfläche des Origamis könnte eine dramatische Verschiebung der Abstände zur Folge haben. Die flexible Bewegung selbst kann durch eine dreidimensionale Pendelbewegung der Konjugate erklärt werden<sup>170</sup>. Zur genaueren Veranschaulichung ist in Abbildung 66 die flexible Bewegung eines Konjugats in der Seitenansicht (Abbildung 66A) und der Oberflächenansicht (Abbildung 66B) schematisch dargestellt.



**Abbildung 66:** (A) Schematische Darstellung der Flexibilität des Myoglobin-DNA Konjugats auf der Oberfläche der Origamistruktur (gelb) in der Seitenansicht (z/y Ebene). (B) Darstellung des maximalen Flexibilitätsradius eines Konjugats auf der Origami-Oberfläche in der x/y Ebene.

Die Abbildung 66A zeigt die Pendelbewegung des <sup>Mb</sup>BL-4<sub>D3</sub> Konjugats in der Seitenansicht (z/y Ebene) des Origamis. Hierbei ist das Protein als schwarzer Kreis dargestellt. Das zur Origamioberfläche (gelb) senkrecht stehende Konjugat repräsentiert hierbei die optimale Ausrichtung des Konjugats zur Oberfläche ausgehend vom Hybridisierungsursprung. Die kalkulierte Höhe des Konjugats setzt sich aus den 22 Basen der konjugierten **D3** Sequenz (ca. 7,5 nm) und dem theoretisch kalkulierten Durchmesser des Proteins Myoglobin (ca. 4,3 nm) zusammen. Die vorhandene Flexibilität des hybridisierten Konjugats kann in einer Pendelbewegung erklärt werden (grau gestrichelte Linie), indem sich das Konjugat in einem definierten Winkel zur optimalen senkrechten Ausrichtung bewegt. Eine maximale Ausrichtung von ca. 90 ° könnte durch eine elektrostatische Wechselwirkung des Proteins mit der Origamioberfläche begünstigt werden und würde eine Verschiebung der Protein Detektion von maximal 11,8 nm in y Richtung hervorrufen.

Betrachtet man die Pendelbewegung in der Oberflächenansicht (x/y Ebene; vgl. Abbildung 66B), so können die Bewegungen des Proteins als ein Kreis dargestellt werden. Der schwarze Mittelpunkt deutet eine optimale senkrechte Ausrichtung des Konjugats zur Oberfläche an, während die einzelnen Randpunkte des Kreises die maximale Pendelbewegungen des Proteins von ca. 90° mit einem Abstand zum Hybridisierungsursprung von maximal. 11,8 nm definieren. Eine Bewegung der Proteine auf der Oberfläche des Origamis hätte somit zur Folge, dass der Abstand einzelner Proteine stark variieren könnte. Speziell der Abstand zweier Proteine innerhalb einer Fängeroligonukleotidreihe in y-Richtung (Abstand ca. 10 nm) könnte im Design zu kurz gewählt worden sein. Einzelne Protein-DNA Konjugate mit einer Länge von ca. 11,8 nm könnten somit in unmittelbarer Nähe zueinander liegen oder aber die Immobilisierung der Konjugate an benachbarten Positionen durch sterische Hinderungen

verhindern. Um diesen Effekt zu senken, könnten für zukünftige Experimente kürzere Fängeroligonukleotide bzw. komplementäre Einzelstränge zur Proteinkonjugation eingesetzt werden. Hierdurch würde der Bewegungsradius der Proteine verkleinert werden und somit eine höhere Kontrolle des Abstandes einzelner Proteine gesichert werden.

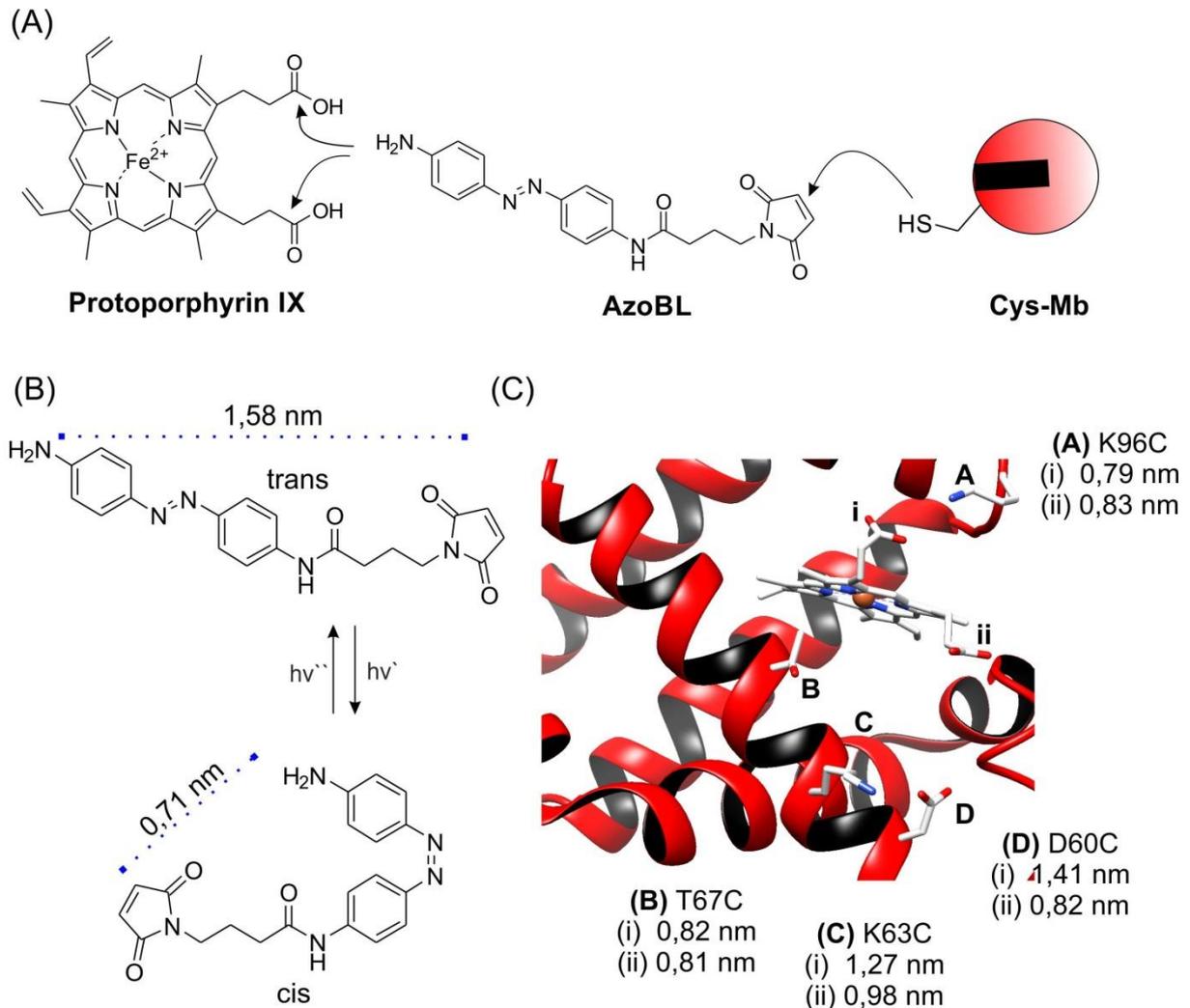
In diesem Kapitel konnte ein rechteckiges Origami gestaltet, assembliert und erfolgreich charakterisiert werden. Das Origami konnte ebenfalls mittels Fängeroligonukleotiden ausgestattet und mit hohen Ausbeuten assembliert werden. Des Weiteren wurden erste Ergebnisse erzielt, welche auf eine erfolgreiche Immobilisierung der Myoglobin-DNA Konjugate hindeuten und somit eine zukünftige Anwendung sicherstellen. Die praktischen Durchführungen müssten jedoch optimiert werden, um eine erfolgreiche Verifizierung der immobilisierten Konjugate mittels AFM zu gewährleisten.

### 3.4 Klonierung von rekombinanten Myoglobin

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, sollten für eine Zukunftsprojekt Cystein-Myoglobinvarianten bereitgestellt werden, um das Protein Myoglobin (**Mb**) mit einem bifunktionellen Azobenzolderivat modifizieren zu können, welches eine lichtinduzierte Kontrolle der Proteinaktivität ermöglicht (vgl. hierzu Kapitel 2.5). Das Projekt wurde in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Gorostiza (IBEC, Barcelona) durchgeführt. In der Gruppe wurde ein Azobenzol-Crosslinker (**AzoBL**) mit zwei orthogonalen funktionellen Gruppen synthetisiert, welches eine Verbrückung des Kofaktors Häm mit der Proteinoberfläche gewährleisten sollte. Hierzu zählte einerseits ein primäres Amin, welches zur kovalenten Verknüpfung an den Kofaktor über eine Amidierungsreaktion und andererseits eine Maleimid Gruppe, welches zur **Mb** Oberflächenkupplung verwendet werden sollte (Abbildung 67A). Da die native Proteinstruktur des **Mb** keine Cysteinreste aufweist, welche zur selektiven Kupplung eines Azobenzolderivats auf der Oberfläche des Proteins über eine Micheal Addition verwendet werden können, wurden molekularbiologische Techniken verwendet, um die Cysteine gezielt auf der Oberfläche zu positionieren. Hierbei wurden definierte Abstände gewählt, um eine lichtensitive Kontrolle der **Mb** Funktion für zukünftige Anwendung gewährleisten zu können (Abbildung 67B und C).

Für den Lichtschaltungsprozess des Myoglobins ist es wichtig, das der kovalent gebundene Kofaktor nach der lichtinduzierten Isomerisierung des Azobenzens in unmittelbarer Nähe des aktiven Zentrum liegt, um eine Einführung des Protoporphyrin IX in die aktive Tasche zu gewährleisten. Aus diesem Grund wurden zunächst die Abstände der funktionellen Gruppen

des **AzoBL** in cis und trans Konformation mittels der Computerprogramms *ChemBio3D Ultra* bestimmt. Der Häm Kofaktor soll nach Anregung mit Licht in die aktive Tasche des Enzym „geleitet“ werden. Aus diesem Grund wurden die Aminosäurepositionen auf der Oberfläche des **Mb** so gewählt, dass die Abstände der Cysteinpositionen zu den Carboxylgruppen des Kofaktors ca. im gleichen Längenbereich liegen, wie die Abstände der funktionellen Gruppen des Azobenzolderivats (i und ii, Abbildung 67C).



**Abbildung 67:** (A) Struktur des bifunktionellen Crosslinker **AzoBL** und die schematische Darstellung der bifunktionellen Gruppen zur Kupplung des Kofaktors Häm und zur Oberflächenmodifizierung von **Mb** über Cysteine. (B) Cis-Trans Isomerie der Azobenzol-Crosslinkers **AzoBL** und der ermittelte Abstand der orthogonalen funktionellen Gruppen in cis und trans Konformation. Die Abstände wurden mittels des Computerprogramms *ChemBio3D Ultra* ermittelt. (C) Klonierungspositionen zur Einführung der Cysteinreste in natives **Mb**. Die Tertiärstruktur wurde mittels des Computerprogramms *Chimera* erstellt und die Abstände ermittelt.

Zur Klonierung wurden insgesamt vier Positionen gewählt. Hierzu zählten die Lysine an Position 96 und 63 (**K96** bzw. **K63**), der Threoninrest an Position 67 (**T67**) und die Asparaginsäure an Position 60 (**D60**). Alle vier Positionen besaßen einen Abstand zur Carboxylgruppe zwischen 0,8 nm und 1,3 nm, welche mit den ermittelten Abstandswerten der funktionellen Gruppen des Azobenzolderivats korrelieren.

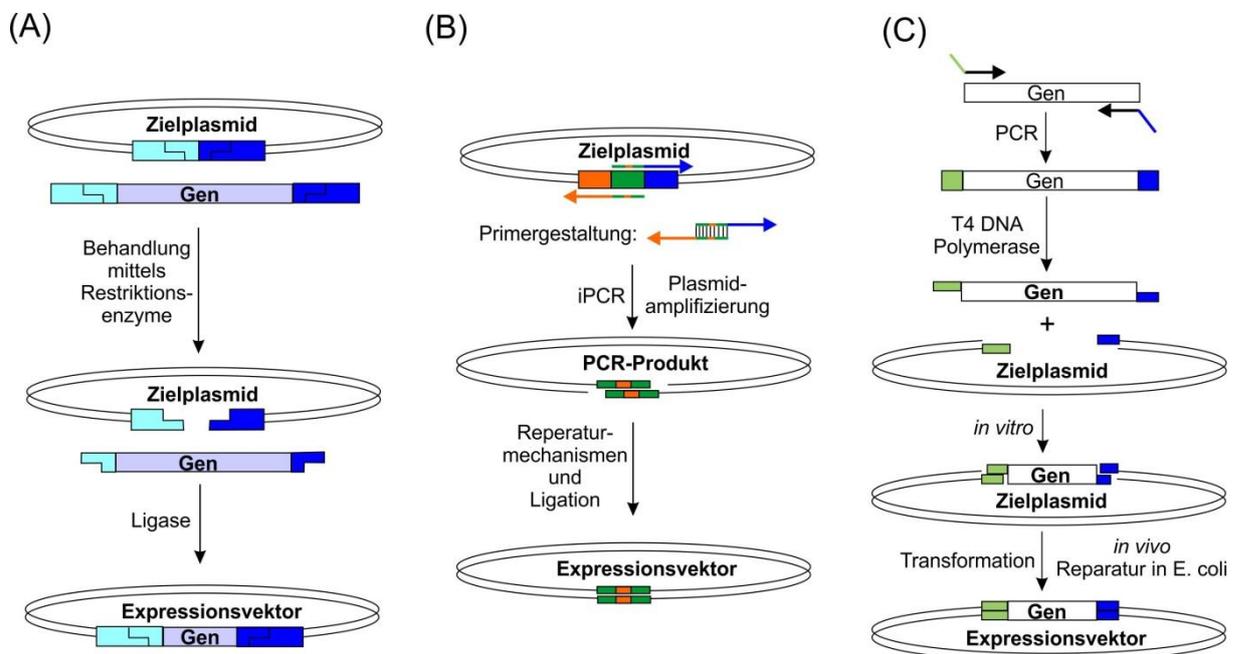
In diesem Kapitel wird nun dargestellt, wie ein simples Klonierungssystem verwendet werden kann, um die Cysteinreste gezielt auf die Myoglobinoberfläche zu positionieren. Bevor die wichtigsten Ergebnisse präsentiert werden, soll jedoch zunächst die grundsätzliche Überlegung zur Wahl der verwendeten molekularbiologischen Technik erläutert werden.

### 3.4.1 Grundsätzliche Überlegungen zur Klonierungsmethode

Das klassische Klonieren ist heutzutage ein Standardverfahren, welches zur genetischen Manipulation von Organismen angewandt wird.<sup>171-173</sup> Das Prinzip beruht auf den Einsatz von Restriktionsendonukleasen<sup>174-177</sup>, welche Zielvektoren bzw. Gene an spezifischen Erkennungssequenzen schneiden und somit kompatible Enden zwischen den beiden Fragmenten erzeugen (Abbildung 68A). Diese kompatiblen Enden können anschließend mit Hilfe von Ligasen<sup>178, 179</sup> über ihr Phosphatrückgrat miteinander verknüpft werden. Die klassische Technik wurde im Laufe der letzten Jahrzehnte optimiert, stellt sich bis zum heutigen Zeitpunkt jedoch zahlreichen Herausforderungen. Neben der Problematik einer erfolgreichen und effizienten Ligation der einzelnen Fragmente, muss ebenfalls die Zugänglichkeit zahlreicher Restriktionsenzyme gewährleistet werden, welche an gezielten Positionen schneiden um die gewünschten Fragmente zur Ligation entstehen zu lassen. Des Weiteren muss bei dem Einsatz von Restriktionsenzymen sichergestellt werden, dass keine weiteren Erkennungssequenzen innerhalb des verwendeten Gens bzw. Vektors existieren. Gerade bei maßgeschneiderten Klonierungen stehen meist nicht die passenden Enzyme zur Verfügung, welches mit zeitaufwendigen und komplizierten Klonierungsschritten verbunden ist<sup>180</sup>. Aus diesem Grund suchen Forscher nach alternativen Klonierungsstrategien, welche diese Herausforderungen umgehen.

Einige Strategien, welche sich in den letzten Jahren als sehr erfolgreich etabliert haben, nutzen das Prinzip des DNA Reparaturmechanismus der homologen Rekombination<sup>181</sup>. Der Reparaturmechanismus ist ein komplexes System, welches *in vivo* von zahlreichen Prozessen abhängig ist. Hierzu zählen die Einführung von Doppelstrangbrüchen, die Herstellung von ssDNA durch Exonukleasen, das Erkennen von homologen Rekombinationsbereichen durch

Rekombinasen sowie die Reparatur von Überhängen und Lücken durch das Zusammenspiel zahlreicher Enzyme wie Nukleasen, Resolvasen und Polymerasen.<sup>181</sup> Trotz der Komplexität konnten zahlreiche *in vitro* Systeme erschaffen werden, welche eine Einführung von Mutationen durch weiterentwickelte Protokolle der gezielten Mutagenese (SDM, engl: „*side directed mutagenesis*“) <sup>182</sup> durchführbar machen. In diesem Zusammenhang kann sowohl das *QuickChange™ Side Directed Mutagenese System* (QCM)<sup>183</sup> der Firma Stratagen genannt werden, als auch das von Elledge *et al.* entwickelte *univector plasmid-fusion-System* (UPS)<sup>184</sup> oder auch das in Laboren etablierte und angewandte *Gateway System*.<sup>185, 186</sup> Alle genannten Systeme eliminieren den Einsatz von DNA Ligasen, indem sie sich die Polymerase Kettenreaktion (PCR)<sup>187</sup> und die Anwendung von Rekombinasen zunutze machen.



**Abbildung 68:** (A) Schematische Darstellung der klassischen Klonierung. Das Zielplasmid und Zielgen werden zunächst mittels Restriktionsenzymen behandelt, so dass komplementäre Überhänge entstehen. Anschließend werden die gewonnenen Fragmente mittels einer Ligase kovalent zusammengeführt und zirkularisiert. (B) Schematische Darstellung der gezielten Mutagenese (SDM).<sup>182</sup> Mittels eines Primerpaares, welches am 5'-Ende komplementär zueinander ist, wird eine Amplifizierung des Zielplasmids mittels iPCR durchgeführt. Der komplementäre Bereich beinhaltet eine Mutation (orangene Markierung), welche über die homologen Enden des PCR-Produktes nach der Reparatur und Ligation eingeführt wird. (C) Schematische Ablauf von SLIC.<sup>188</sup> Zunächst wird ein Zielgen mittels eines Primerpaares und PCR amplifiziert. Die Primer besitzen Überhänge (farbige Markierungen), die komplementär zu den Endsequenzen eines Zielplasmids sind, welches mittels Restriktionsenzymen geschnitten wurde. Nach Behandlung mittels T4-DNA Polymerase werden die komplementären Fragmente zusammengeführt und *E. coli* transformiert. Die Fragmente werden *in vivo* über die Reparaturmechanismen kovalent verknüpft und zirkularisiert.

Im Allgemeinen werden bei der gerichteten Mutagenese speziell gestaltete Primerpaare verwendet, welche an ihren 5'-Enden komplementär zueinander sind (Abbildung 68B). Die Primerpaare können dazu verwendet werden vollständige Plasmide mittels PCR zu amplifizieren, wobei die synthetisch hergestellten PCR Produkte durch die spezifische Gestaltung der Primer homologe Endsequenzen besitzen. Die komplementären Bereiche der Primer können genetische Information einer gewünschten Mutation enthalten und somit gezielt in die homologen Endsequenzen der amplifizierten Plasmide oder Genabschnitte integriert werden. Nach der PCR werden die Template mittels DpnI verdaut und *E. coli* Zellen mit den mutierten PCR Produkten transformiert. Die homologen Endsequenzen werden von dem Reparaturmechanismus der Zelle erkannt, zusammengeführt und zu einem gewünschten Vektorprodukt repariert. Es wird angenommen, dass eine unvollständige PCR zu homologen klebrigen Enden führt, welche eine Anlagerung der Enden und die anschließende Ligation und Reparatur in *E. coli* begünstigt.<sup>188</sup>

Neben einer erfolgreichen Klonierung besitzen die oben genannten Systeme jedoch einige Einschränkungen. Neben dem Einsatz von teuren Enzymen, wie zum Beispiel der Gebrauch von Rekombinasen bei dem Gateway System<sup>186</sup>, ist eine der wichtigsten Begrenzung, dass die Methoden nur angewandt werden können, wenn die Zielvektoren spezifischen Rekombinasen Erkennungssequenzen zur homologen Rekombination aufweisen. Eine Weiterentwicklung wurde im Jahre 2007 von Li und Elledge mit der beschriebenen Klonierungsmethode „*Sequence and ligation independent cloning*“ (SLIC)<sup>188</sup> durchgeführt (Abbildung 68C). In diesem Verfahren werden spezifische Primergestaltungen verwendet um Gene gezielt zu amplifizieren. Die Primerpaare werden hierbei mit Überhängen ausgestattet, welche komplementäre Sequenzen zu einem Restriktionsenzym verdauten linearisierten Vektorprodukt aufweisen. Die PCR-Produkte (Transgene; engl.: „*Inserts*“) werden anschließend mittels T4-DNA Polymerase behandelt, so dass 5'-klebrige Enden entstehen welche komplementär zu den Endsequenzen des verdauten Zielvektors sind. Die T4-DNA Polymerase besitzt eine 3'→5' Exonukleaseaktivität, welche erlaubt die 3'-Enden des PCR Produktes gezielt abzubauen.<sup>188</sup> Der Zielvektor und das PCR Produkt werden anschließend *in vitro* zusammengeführt und *E. coli* Zellen mittels der Produkte transformiert. Die *in vitro* hergestellten rekombinanten Intermediate können somit direkt *in vivo* kovalent zirkularisiert werden ohne dass zeitaufwendige und kostspielige Vorbehandlungen erfolgen müssen, indem das Reparatursystem der *E. coli* Zellen ausgenutzt wird. Neben einer Zweifragmenten

Klonierung konnten mit dieser Methode ebenfalls PCR amplifizierte Multifragmente gezielt und maßgeschneidert zusammengeführt werden.<sup>188</sup>

Bei der Optimierung der SLIC Methode zur T4-DNA Polymerase Behandlung erkannten Elledge und Li, dass die PCR-Produkte, welche nicht mit T4-DNA Polymerase behandelt wurden, ebenfalls eine Klonierungseffizienz aufwiesen. Hierzu wurde wiederum die Hypothese einer unvollständigen PCR (engl: „iPCR; incomplete PCR) als Erklärung herangezogen, welche eine Anlagerung der homologen Enden in *E. coli* begünstigt. Um dies zu testen, haben die Autoren identische Fragmente mittels spezifischen Restriktionsenzymen hergestellt und mit den PCR-synthetisierten Transgenen verglichen. Hierbei zeigten die PCR hergestellten Fragmente eine weitaus höhere Transformationseffizienz als die durch Restriktionsenzyme hergestellten, welches die Hypothese einer iPCR bekräftigt.

Die erfolgreichen Klonierungsmethoden der gerichteten Mutagenese und die Ergebnisse der SLIC Methode zeigen eine schnelle und effiziente Methode zur Einführung von Mutationen in Plasmide. Bereits in der Masterarbeit an der TU Dortmund konnte zusammen mit Erkelenz *et al.* eine Methode entwickelt werden<sup>169</sup>, welche beide Klonierungsmethoden vereint. Hierzu wurden speziell gestaltete Primerpaare mit spezifischen Überhängen verwendet, welche auf unterschiedliche Bereiche eines Plasmids binden. Nach der Amplifikation besaßen die PCR-Produkte homologe Endsequenzen, welche mit einer zusätzlichen genetische Informationen versehen wurden, die zur enzymatischen Herstellung von zirkulärer Einzelstrang DNA eingesetzt werden konnten. Die Hybridisierungspositionen der Primer wurden so gewählt, dass das Plasmid gezielt gekürzt werden konnte und die synthetisierten Einzelstränge wurden zur Faltung von DNA Origami Nanostrukturen verwendet. Wie von Elledge und Li beschrieben wurden die PCR Produkte lediglich zur Transformation von *E. coli* verwendet und letztendlich *in vivo* repariert, ohne dass zeitaufwendige und komplizierte *in vitro* Bearbeitungsschritte durchgeführt werden mussten.

Auch in der Arbeitsgruppe Fruk sollte eine schnelle und effiziente Klonierungsmethode eingeführt werden. Die Ergebnisse der Vergangenheit ließen die Überlegung zu, auch die Cystein Mutationen in **Mb** über eine homologe rekombinatorische Klonierungstrategie einzuführen. Hierbei könnten speziell gestaltete Primerpaare verwendet werden, welche an ihren 5'-Enden komplementär zueinander sind und die genetischen Tripletts Kodierungen für Cysteine besitzen. Die Primerpaare dienen wie bei der SDM (Abbildung 68B) zur vollständigen Amplifizierung eines Plasmids mittels PCR, wobei die PCR Produkte homologe Endsequenzen aufweisen, welche die Cystein Mutation des Mb-Gens kodieren. Nach

Transformation von *E. coli* konnten die PCR-Produkte zu den gewünschten Expressionsvektoren zirkularisiert werden (vgl. Kapitel 3.4.3).

Neben der Klonierung der Cysteine sollten ebenfalls eine Methode zur Einführung von Reinigungstags etabliert werden. Hierzu wurde die Überlegung durchgeführt, ein spezielles Primerpaar zu verwenden, welches an einer gezielten Position des Mb Gens bindet und als Überhänge die genetischen Informationen des Reinigungstags enthalten. Wie nach der SLIC Methode (Abbildung 68C) konnten somit die Plasmide vollständig amplifiziert werden und zusätzlich mit homologen Endsequenzen flankiert werden, welche die genetischen Informationen des Reinigungstags tragen. Die homologen Endsequenzen werden nach der Transformation von *E. coli* zirkularisiert, indem die genetischen Informationen gezielt in den Expressionsvektor eingebaut werden (vgl. hierzu Kapitel 3.4.8).

Als Zusatzversuch wurde ebenfalls eine Methode etabliert, welche zur Herstellung von Fusionsproteinen verwendet werden kann (vgl. Kapitel 3.4.13), indem ebenfalls rekombinatorische Verfahren angewandt wurden. Die Ergebnisse der Klonierungen, Proteinexpressionen und Reinigungen sind in den folgenden Unterkapiteln dargestellt.

### 3.4.2 Nomenklatur

Das Plasmid, welches zur Integration der Cysteine in natives Myoglobin verwendet wurde, wurde von Frau Dr. Nienhaus (AK Prof. Dr. Nienhaus, KIT) zur Verfügung gestellt. Der Vektor bestand aus einem **pUC19** Rückgrat und konnte bereits von der Arbeitsgruppe zur gentechnologischen Veränderungen verwendet werden, indem die genetische Information zur Expression des nativen Myoglobins vom Pottwal (**Mb**) eingefügt wurde. Neben dem Myoglobin besitzt der Vektor ein Ampicillin- Resistenzgen, welches eine Selektion von **pUC19** positiven Bakterienstämmen auf Ampicillin Nährmedium nach ihrer Transformation garantiert.

Zur Einführung der Cystein Triplet Codons an unterschiedliche Positionen wurden spezifisch gestaltete Primerpaare verwendet. Hierbei wurde die Primer, welche zur Amplifizierung des kodierenden Stranges verwendet wurden als **FW-X** Primer (FW, engl.: „Forward“) bezeichnet. Das **X** repräsentiert hierbei die veränderte Aminosäureposition im exprimierten Protein. Somit wurde z.B. der FW-Primer, welcher zur Amplifizierung des kodierenden Stranges zum Austausch der Asparaginsäure (D) zu Cystein (C) verwendet wurde, als **FW-D60C** bezeichnet. Analog wurden die Primer zur Amplifizierung des nicht kodierenden Stranges als **BW-X** (BW, engl.: „backward“) benannt. Die Bezeichnung der

Primer zur Einführung eines Reinigungstags erfolgte ebenfalls analog. Hierbei repräsentiert das **X** lediglich die Abkürzung des verwendeten Tags.

Die Nomenklatur der Expressionsvektoren des Cystein-Myoglobin Mutanten erfolgte nach einer spezifischen Regel. Der Vektor zur Expression des nativen Myoglobins wurde als **MbpUC19** bezeichnet, während die Nomenklatur zu allgemein **mMbpUC19** nach Einklonierung des kodierenden Cystein Triplets verändert wurde. Hierbei bezeichnet das **m** in **mMbpUC19** die veränderte Aminosäurenposition im exprimierten Protein. Wurde zum Beispiel die Aminosäure Asparaginsäure (D) gegen ein Cystein (C) an Position 60 des nativen **Mb** ausgetauscht, wurde der zugehörige Expressionionsvektor als **D60CMbpUC19** bezeichnet. Nach der zusätzlichen Einführung der Reinigungstags wurde die Nomenklatur der Expressionvektoren zu **mMbpUC19Y** geändert. Hier bezeichnet das **Y** den zusätzlich eingeführten N-terminalen Tag.

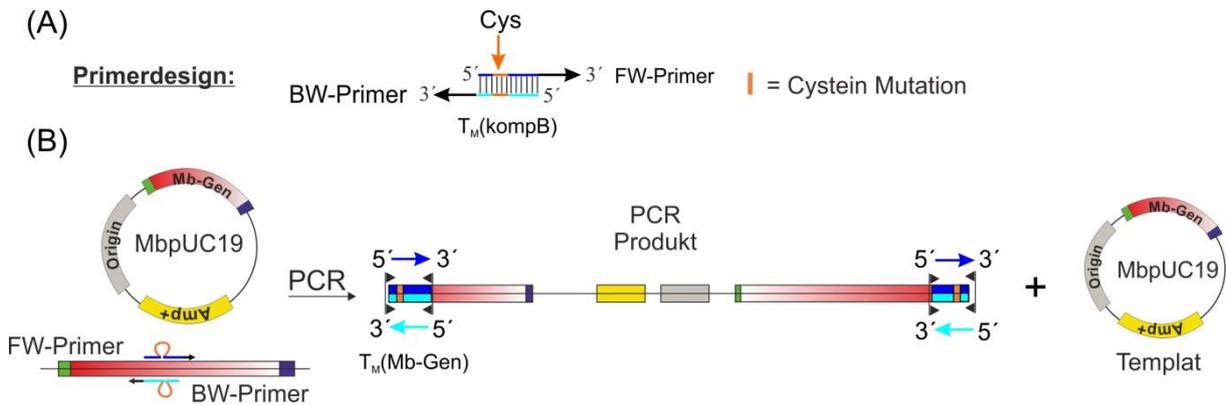
Die exprimierten Proteinmutanten wurden letztendlich als **mMb** gekennzeichnet, indem das **m** wiederum die ausgetauschte Aminosäurenposition widerspiegelte. Wurde ebenfalls ein N-terminaler Tag eingefügt, wurde die Nomenklatur der exprimierten Proteine zu **mMbY** erweitert, indem **Y** den eingeführten Tag beschreibt.

### 3.4.3 Einführung von Cystein Modifikationen in natives Myoglobin

Die genetische Veränderung des Triplett-Codons zur Einführung der jeweiligen Cysteinreste erfolgte über die vollständige Amplifizierung des **MbpUC19** Templats mittels PCR (Abbildung 69). Die jeweiligen FW- bzw. BW-Primer mit einer Länge von 34-43 Basen wurden so gestaltet, dass 22 bzw. 23 Basen der 5'-Enden komplementär zueinander sind und die genetischen Informationen zum Austausch der Basen des Triplet-Codons beinhalten, welcher die Aminosäure Cystein kodiert (Abbildung 69A, orange). Die beiden Primer binden somit an den gleichen Bereichen des Plasmids, verursachen jedoch eine Amplifikation in entgegengesetzten Richtungen. Da es sich um ein zirkuläres Plasmid handelt wird dadurch eine vollständige Kopie des Plasmids erzeugt, wobei die genetischen Informationen der Cysteinreste durch eine Ausbuchtung (engl.: „*bulg*“) während der ersten PCR Zyklen in das Plasmid synthetisch eingeführt werden. Durch die komplementären Sequenzbereiche der Primer spiegeln die linearen PCR-Produkte eine gänzliche Amplifikation des **MbpUC19** Plasmids wider, welche als Zusatz mit definierten homologen Endsequenzen flankiert wurden und die genetischen Informationen zur Cystein-Modifizierung beinhalten (Abbildung 69B). Die homologen Sequenzbereiche sind in Abbildung 69B farblich hervorgehoben und mit

Pfeilen gekennzeichnet, indem die Pfeilspitze das 3'-Ende repräsentiert und der Pfeilursprung das 5'-Ende darstellt.

Li und Elledge berichteten in ihrem entwickelten SLIC Verfahren<sup>188</sup> über eine erhöhte Klonierungseffizienz, sobald die homologen Sequenzbereiche von 20 auf 30 bp verlängert wurden. Anlass dieser Erkenntnisse wurde für die unten erläuterte Strategie ein komplementärer Sequenzbereich der Primerpaare von mehr als 20 Basen gewählt, welche bereits in älteren Protokollen erfolgreich angewandt werden konnten.<sup>169</sup>



**Abbildung 69:** (A) Schematische Darstellung der Gestaltung eines Primerpaares mit einer integrierten Triplet-Information zur Einführung eines Cysteinrestes (orange) in das Mb-Gen mittels PCR. (B) Schematische Darstellung der Primerpositionen auf dem Mb-Gen des **MbpUC19** Plasmids und des gewonnenen amplifizierten linearen PCR-Hauptproduktes. Das Gen zur Ampicillinresistenz ist gelb dargestellt, während der Replikationsursprung (Origin) grau und das Mb-Gen rot koloriert wurde. Der grüne Bereich innerhalb des Mb-Gens präsentiert die Position des Startcodons und der lila gefärbte Bereich die Position des Stopcodons.

Um eine erfolgreiche PCR zu gewährleisten, wurden die Schmelztemperaturen der einzelnen Primer mit dem Mb-Gen ( $T_M(\text{Mb-Gen})$ ) und die Schmelztemperaturen der komplementären Bereiche der einzelnen Primerpaare ( $T_M(\text{kompB})$ ) angepasst. Hierzu wurde die Hybridisierungspositionen der Primer so gewählt, dass die Schmelztemperatur  $T_M(\text{Mb-Gen})$  ca. 10 °C über der Schmelztemperatur  $T_M(\text{Mb-kompB})$  lag (vgl. Tabelle 12). Hierdurch wurde gewährleistet, dass während der PCR bei einer Primerhybridisierungstemperatur von über 60 °C die komplementären Bereiche der Primerpaare denaturiert vorliegen und eine vollständige Hybridisierung der einzelnen Primer mit dem Mb-Gen sichergestellt werden kann. Die Schmelztemperaturen sind in der Tabelle 12 dargestellt, während die Primersequenzen dem Anhang Kapitel 11.4.1 zu entnehmen sind

**Tabelle 12:** Schmelztemperaturen der hybridisierten Primerpaare mit dem Mb-Gen ( $T_M(\text{Mb-Gen})$ ) bzw. der komplementären Sequenzen der einzelnen Primerpaare ( $T_M(\text{kompB})$ ) zur vollständigen Amplifizierung des **MbpUC19** Templats mit der integrierten Triplet Kodierungen für Cysteine.

Primerbezeichnung	Gesamtlänge [Basen]	$T_M(\text{Mb-Gen})$ [°C]	Länge der kompl. Sequenz [Basen]	$T_M(\text{kompB})$ [°C]
<b>FW-D60C</b>	40	65	22	54
<b>BW-D60C</b>	37	65		
<b>FW-K63C</b>	43	66	23	56
<b>BW-K63C</b>	37	66		
<b>FW-T67C</b>	41	65	23	58
<b>BW-T67C</b>	30	65		
<b>FW-K96C</b>	34	66	22	57
<b>BW-K96C</b>	38	66		

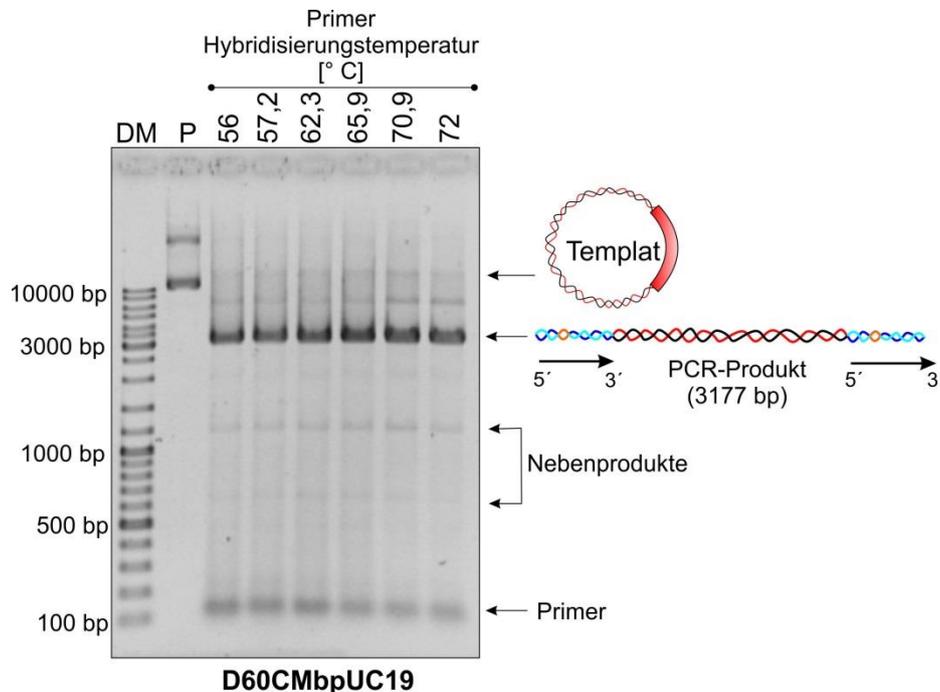
Für das PCR-Protokoll wurde die Amplifizierungsgeschwindigkeit der *iProof™ High-Fidelity DNA Polymerase* von 15-30 s/kbp impliziert. Für den Elongationsschritt wurde ein Zeitintervall von 1,30 min gewählt, um eine vollständige Amplifizierung des **MbpUC19** Templats mit einer Länge von ca. 3180 bp sicherzustellen. Des Weiteren wurden unterschiedliche Primerhybridisierungstemperaturen zwischen 56 °C und 72 °C getestet und miteinander verglichen. Das verwendete PCR Protokoll, welches zur Amplifizierung aller vier PCR Produkte verwendet werden konnte, ist in der folgenden Tabelle 13 dargestellt.

**Tabelle 13:** PCR Programm zur Einführung der Cystein Triplet Kodierungen in das Mb-Gen und der vollständigen Amplifizierung des **MbpUC19** Rückgrats.

	Temperatur [° C]	Zeitintervall	
<i>Initiale Denaturierung</i> →	98	2 min	
<i>Denaturierung</i> →	98	30 s	35 Zyklen
<i>Primerhybridisierung</i> →	56 - 72	30 s	
<i>Elongation</i> →	72	1,30 min	
<i>Abschließende Verlängerung</i> →	72	5 min	
<i>Ende</i> →	4	∞	

Zur Darstellung der PCR Ergebnisse wird im Folgenden als Fallbeispiel die Einführung des Cysteinrestes an der Position 60 des Mb-Gens (**D60CMbpUC19**) näher erläutert. Die restlichen Ergebnisse sind dem Anhang Kapitel 11.4.1 (Seite 253) dargestellt.

Zur Einführung des genetischen Triplets in das Mb-Gen wurden das Primerpaar **FW-D60C/BW-D60C** verwendet und die PCR nach dem Protokoll der Tabelle 13 durchgeführt. Der Erfolg der PCR wurde anschließend mittels analytischer Agarosegelelektrophorese nachgewiesen (Abbildung 70).

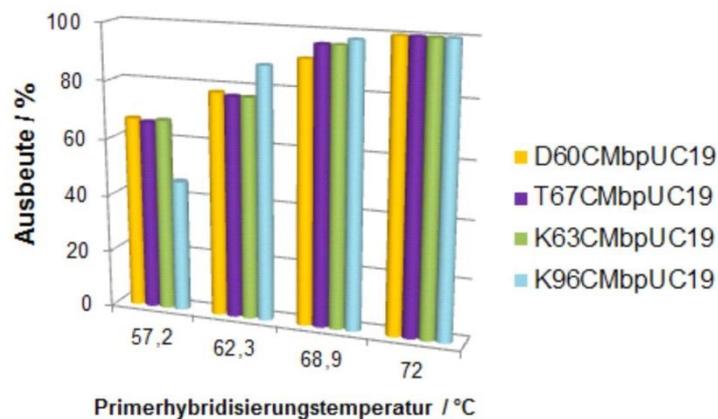


**Abbildung 70:** Ergebnis der analytischen Agarose-Gelelektrophorese zur Charakterisierung der linearen 3177 bp langen PCR-Produkte, welche mittels der beiden Primerpaare **FW-D60C** und **BW-D60C** bei unterschiedlichen Primerhybridisierungstemperaturen amplifiziert wurden. **DM:** 10 kbp Marker, **P:** Plasmid **MbpUC19**; **Konditionen:** 1 % Agarose, 200 V; **Laufpuffer:** 1x TBE-Puffer; **Färbung:** Ethidiumbromid.

Bei der Betrachtung des analytischen Agarosegels ist deutlich zu erkennen, dass bei ca. 3000 bp ein Hauptprodukt detektiert werden kann, welches der ermittelten theoretischen Länge des PCR-Produktes von 3177 bp entspricht und somit eine erfolgreiche Amplifizierung belegt. Der Vergleich der Hauptprodukte mittels Densitometrie zeigt, dass die höchste Ausbeute bei einer Temperatur von 70,9 °C erzielt wird und die Ausbeuten mit sinkender Primerhybridisierungstemperatur abnehmen (Abbildung 71). Die ermittelte Temperatur liegt etwa um 6 °C über der Schmelztemperatur des **FW-D60C/BW-D60C** Primerpaares mit dem Mb-Gen und kann über eine abweichende Wärmeregulierung des Heizblockes (um ca. 8 °C) durch das verwendete PCR-System erklärt werden. Eine Justierung der PCR wurde 2 Monate nach den ermittelten Resultaten von der Firma *BioRad* durchgeführt. Aufgrund der positiven Ergebnisse wurden jedoch die Experimente nicht wiederholt und miteinander verglichen.

Weiterhin kann die Abnahme der Produktausbeuten bei sinkender Primerhybridisierungstemperatur durch die Selbsthybridisierung der Primer über ihre komplementären Sequenzstellen erklärt werden. Diese Hypothese kann durch den Vergleich mit den anderen PCR-Produkten verstärkt werden.

Hierzu sind in Abbildung 71 die Ausbeuten der gewonnenen linearen PCR-Produkte **D60CMbpUC19**, **T67CMbpUC19**, **K63CMbpUC19** und **K96CMbpUC19** bei vier unterschiedlichen Primerhybridisierungstemperaturen dargestellt. Der Vergleich wurde mittels Densitometrie durchgeführt, indem das jeweilige Hauptprodukt mit der höchsten Bandenintensität einer Ausbeute von 100 % zugeordnet wurde. Die höchsten Ausbeuten sind bei einer Temperatur von 72 °C zu beobachten, während bei allen PCR-Produkten eine deutliche Abnahme der Ausbeuten mit sinkender Hybridisierungstemperatur beobachtet werden kann. Die niedrigsten Ausbeuten können bei 57,2 °C erkannt werden, welches nahe an den Schmelztemperaturen der komplementären Bereiche  $T_M(\text{kompB})$  der einzelnen Primerpaare liegt (Abbildung 71).

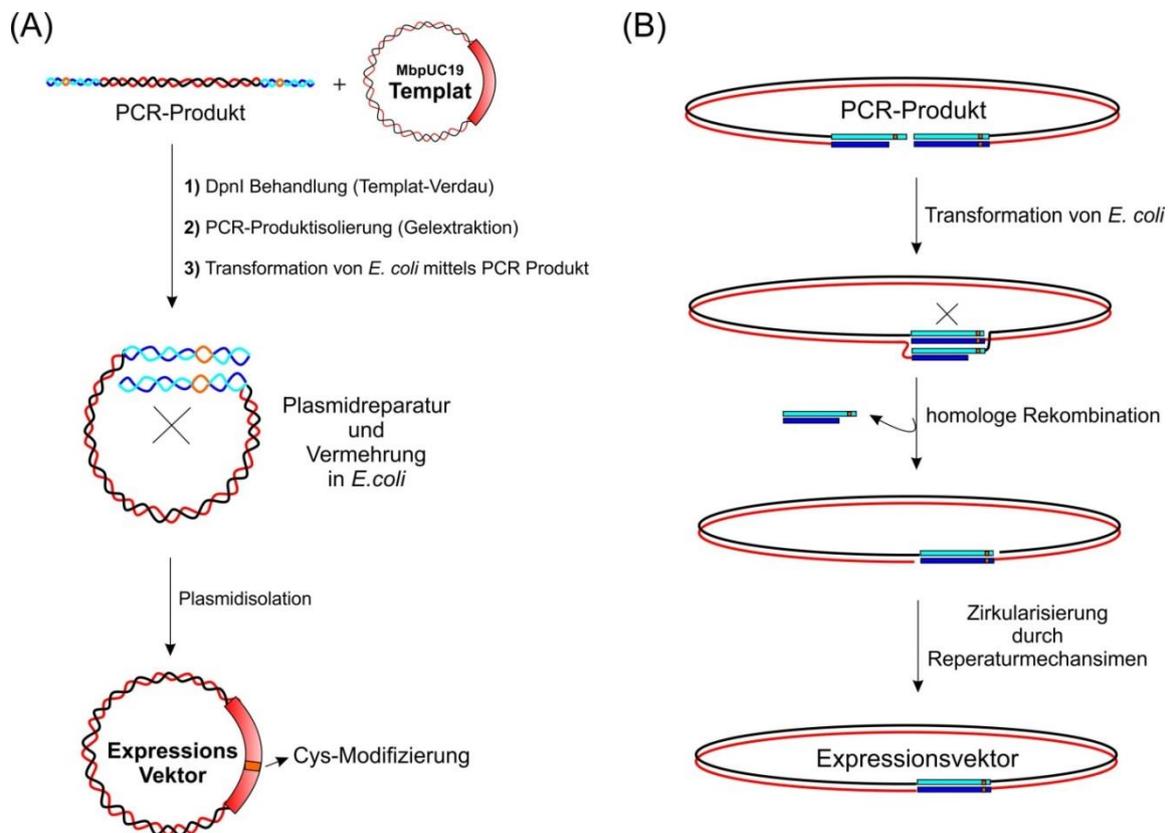


**Abbildung 71:** Vergleich der PCR-Hauptproduktausbeuten bei unterschiedlichen Primerhybridisierungstemperaturen mittels Densitometrie. Zum Vergleich wurden die jeweiligen höchsten gemessenen Bandenintensitäten einer Ausbeute von 100 % zugeordnet.

Die Ergebnisse zeigen, dass alle Produkte erfolgreich mittels PCR hergestellt wurden. Weiterhin ist zu erkennen, dass die Primergestaltungen effektiv zur Amplifizierung genutzt werden kann, da neben dem Hauptprodukten nur ein geringer Anteil an Nebenprodukte (ca. 2%) auf den Analysegelel detektiert werden (Abbildung 70). Durch die verwendeten Primerpaare konnte das Plasmid somit linearisiert und zusätzlich mit homologen 5'-Endsequenzen

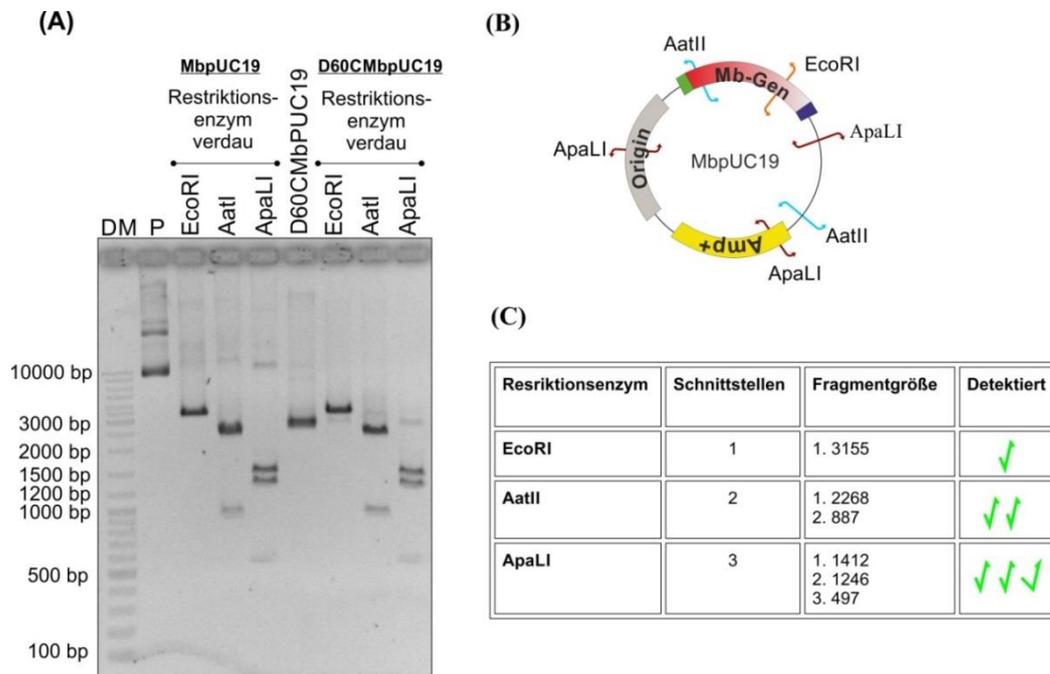
und dem jeweiligen genetischen Triplet Codone für die Cysteinmodifikationen flankiert werden.

In einem nächsten Schritt wurden die PCR-Produkte gereinigt. Hierzu wurde zunächst ein DpnI Verdau des Templats **MbpUC19** durchgeführt und die einzelnen PCR-Produkte mittels präparativer Agarosegelelektrophorese und Gelextraktion AAV 22 isoliert (Abbildung 72A). Anschließend wurden DH5 $\alpha$  *E. coli* Bakterienzellen mittels der PCR-Produkte transformiert und zur Selektion auf Ampicillin Agarplatten ausplattiert. Nach den obigen Überlegungen kann die *E. coli* Zelle nun die homologen Bereiche des Plasmids dazu verwenden, den linearen Einzelstrang mittels homologer Rekombination und Reparaturmechanismen zu zirkularisieren und somit ihr Überleben aufgrund der vorhandenen Ampicillinresistenz sichern. Während der Reparatur wird die genetische Information des Cystein Triplets in den Vektor eingebaut. Ein theoretischer Verlauf der Zirkularisierung ist in der Abbildung 72B als Verständnis dargestellt worden. In diesem Zusammenhang muss erläutert werden, dass ein unvollständiger PCR Ablauf „klebrige Enden“ (engl.: „*Sticky ends*“) verursacht<sup>188</sup>, welche eine Anlagerung der homologen Endsequenzen begünstigen kann.



**Abbildung 72:** (A) Schematische Darstellung der Aufreinigung und der Zirkularisierung des linearen PCR-Produktes nach Transformation von *E. coli*. (B) Theoretischer und schematische Verlauf des Reparaturmechanismus des linearen PCR-Produktes innerhalb einer *E. coli* Bakterienzelle.

Die gewachsenen Kolonien wurden am nächsten Tag geerntet und in LB-Medium vermehrt. Die einzelnen Vektoren wurden mittels Präparations-Kits nach AAV 14 isoliert und zunächst für eine Voruntersuchung ein Restriktionsverdau durchgeführt. Hierzu wurden die Restriktionsenzyme EcoRI, AatI und ApaLI verwendet, welche den Vektor an spezifischen Sequenzstellen verdauen (vgl. Anhang Kapitel 5.3.3, Tabelle 22). Das EcoRI Enzym schneidet das Plasmid einmal und führt somit zur Linearisierung, während die Enzyme AatI bzw. ApaLI insgesamt zwei bzw. drei Schnittstellen besitzen (Abbildung 73). Hierbei muss erwähnt werden, dass die eingeführten Cystein-Triplettsequenzen den Restriktionsverdau der einzelnen Enzyme nicht behindern und somit das verdaute Templat **MbpUC19** das gleiche Bandenmuster aufweisen muss, wie die verdauten Vektorprodukte **D60CMbpUC19**, **T67CMbpUC19**, **K63CMbpUC19** und **K96CMbpUC19**. Die Charakterisierung des Verdau erfolgte über analytische Agarosegel-Elektrophorese. Das analytische Agarosegel des **D60CMbpUC19** Vektorverdau ist in Abbildung 73A dargestellt, während die restlichen Analysen dem Anhang Kapitel 11.4.2 (Seite 254) zu entnehmen sind. Eine schematische Abbildung der Schnittstellenpositionen ist in Abbildung 73B widergegeben, während die erwarteten Fragmentgrößen der Tabelle in Abbildung 73C zu entnehmen sind.

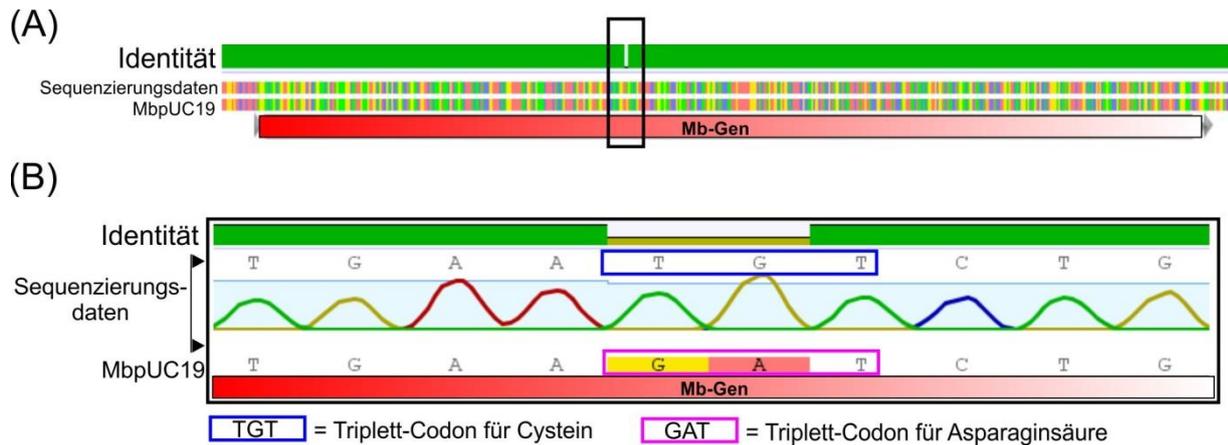


**Abbildung 73:** (A) Analytische Agarosegel zur Charakterisierung des **MbpUC19** Templat- und **D60CMbpUC19** Vektorverdau mittels der Restriktionsenzyme EcoRI, AatI und ApaLI. **DM:** DNA Marker; **P:** **MbpUC19** Plasmide. (B) Schematische Darstellung der Schnittstellenpositionen der verwendeten Restriktionsenzyme auf dem **MbpUC19** Templat. (C) Tabellarische Darstellung der Schnittstellenmengen und Fragmentgrößen.

In Abbildung 73A ist zu erkennen, dass das isolierte **MbpUC19** Plasmid bei ca. 10 kbp eine langsamere elektrophoretische Mobilität aufweist, als der isolierte **D60CMbpUC19** Vektor bei ca. 3 kbp. Des Weiteren zeigt das **MbpUC19** Plasmid eine langsamere Mobilität als die linearisierte Form bei knapp über 3000 bp nach dem EcoRI Verdau, während der **D60CMbpUC19** Vektor eine schnellere Mobilität als die linearisierte Form nach dem EcoRI Verdau aufweist. Aus diesem Grund liegt das isolierte **MbpUC19** Plasmid höchstwahrscheinlich als entspannte Ringform vor, welche durch ein Einzelstrandbruch des doppelsträngigen Plasmids hervorgerufen wurde und aufgrund der sperrigen Konformation die langsamste Mobilität besitzt. Das **D60CMbpUC19** Plasmid kann einer superspiralisierten Form zugeordnet werden. Diese sogenannte „supercoiled“ Form der Plasmid-DNA ist sehr kompakt und nimmt weniger Raum ein, als das durch EcoRI linearisierte Vektorprodukt der gleichen Größe und wandert aus diesem Grund etwas schneller durch das Gel. Durch den Vergleich kann davon ausgegangen werden, dass eine Zirkularisierung des PCR-Produktes stattgefunden hat. Weiterhin weisen alle Restriktionsenzymbehandlung die erwarteten Fragmentgrößen auf, welches eine erfolgreiche Herstellung des **D60CMbpUC19** Vektors unterstreicht.

Um die erfolgreichen Einführungen der jeweiligen Triplet-Codone in das Mb-Gen zu verifizieren, wurde eine Sequenzierung der einzelnen Vektoren durchgeführt. Hierzu wurde als Sequenzierungsprimer ein Standardprimer der Firma *GATC* mit der Bezeichnung **PCR-2** verwendet. Der Primer setzt ca. 150 Basen vor dem Startcodon des Mb-Gens an und gewährleistet somit eine vollständige Sequenzierung des 465 bp langen Mb-Gens. Die Analyse der Sequenzierungsdaten soll im Folgenden am Fallbeispiel des **D60CMbpUC19** Vektors erläutert werden, während die restlichen Daten dem Anhang Kapitel 11.4.3 (Seite 255) dargestellt sind.

Im Fall des **D60CMbpUC19** Vektors wurde die Aminosäure Asparaginsäure (D) gegen Cystein (C) an der Position 60 des exprimierten Proteins ausgetauscht. Zur Einführung mussten insgesamt 2 Basen innerhalb des Mb-Gens ersetzt werden, um das Triplet Codon **GAT** der Asparaginsäure zum Codon des Cysteinrestes **TGT** zu verändert.



**Abbildung 74:** (A) Vergleich der Sequenzierungsdaten mit der Sequenz des **MbpUC19** Templates unter Verwendung des Computerprogramms *Genious*. Eine hundertprozentige Übereinstimmung der Sequenzen ist mit einem grünen Balkenidentitätsdiagramm dargestellt, während eine Lücke innerhalb der Identität eine vorhandene Mutation widerspiegelt (schwarze Markierung). (B) Nähere Betrachtung der sequenzierten Mutationen innerhalb des Mb-Gens. Das eingefügte Triplett-Codon für den Cysteinrest ist blau markiert worden, während der ursprüngliche Triplett-Code der Asparaginsäure rosa gekennzeichnet wurde.

Zur Analyse wurde die Sequenz des **MbpUC19** Templates mit den Sequenzierungsdaten verglichen, indem das Computerprogramm *Genious* verwendet wurde (Abbildung 74). Hierzu wurden die beide Sequenzdaten in das Computerprogramm importiert und ein Abgleich beider Sequenzen durchgeführt (Abbildung 74A). Eine Übereinstimmung der Sequenzen ist mit einem grünen Balkendiagramm (Identität) dargestellt, während eine Mutation durch eine Lücke innerhalb der Identität abgebildet wird (vgl. schwarze Markierung). Eine nähere Betrachtung der auftretenden Mutationen in Abbildung 74B zeigt, dass die Sequenzierungsdaten den gewollten Basenaustausch zur Triplett-Kodierung des Cysteins (**TGT**; blaue Markierung) aufweisen und somit eine erfolgreiche Klonierung des **D60CMbpUC19** Vektors durchgeführt werden konnte. Des Weiteren ist zu erkennen, dass keine zusätzlichen Basen oder nicht gewollte Sequenzen innerhalb des Gens auftreten. Die erfolgreiche Herstellung der **T67CMbpUC19**, **K63CMbpUC19** und **K96CMbpUC19** Vektoren konnte ebenfalls mittels der Sequenzierungsdaten verifiziert werden (vgl. Anhang Kapitel 11.4.3, Seite 255) und belegen, dass das verwendete Protokoll nicht nur sequenz- und somit positionsspezifisch erfolgt, sondern beliebig auf unterschiedliche Positionen des Mb-Gens angewendet werden kann.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine spezifische Primergestaltung dazu verwendet werden kann, ein Plasmid vollständig zu linearisieren und zusätzlich mit homologen Endsequenzen zu flankieren, welche die genetischen Information für einen Aminosäuren-

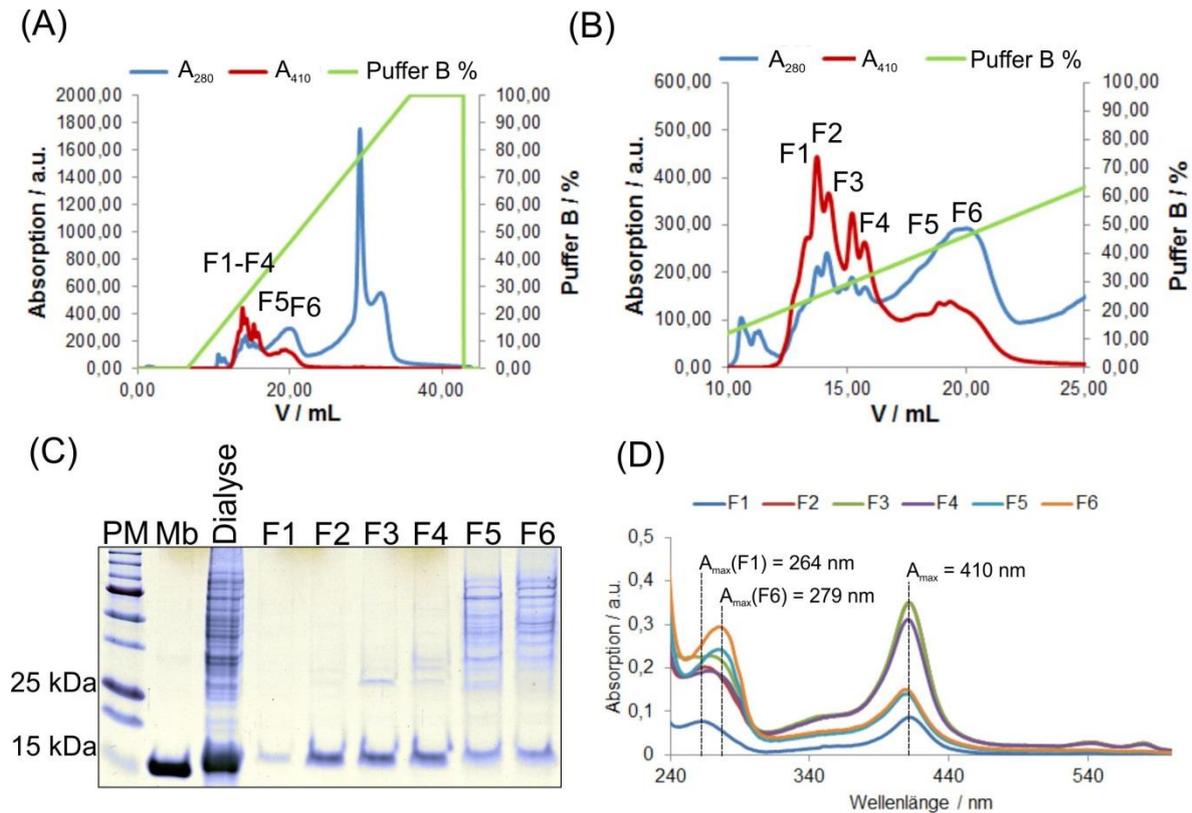
austausch beinhalten. Diese homologen Endsequenzen werden von der Bakterienzelle erkannt und mittels Reparaturmechanismen zirkularisiert<sup>182, 183, 185, 188</sup>, wobei während des Prozesses die gewünschten genetischen Veränderungen in das Plasmid gezielt eingebaut werden. Die komplementären Bereiche können frei positioniert werden und ermöglichen somit eine gezielte Einführung von genetischen Informationen an beliebigen Stellen eines Gens. Somit konnte eine schnelle und kostensparende Methode in den Arbeitskreis integriert werden, welche die Herstellung von Vektoren zur Expression rekombinanter Proteine sicherstellt.

In einem nächsten Schritt wurde ein Protokoll zur Expression und Aufreinigung der rekombinanten Proteine erstellt und soll im folgenden Kapitel kurz erläutert werden.

#### **3.4.4 Expression und Reinigung der Myoglobin-Cystein Mutanten**

Um die einzelnen Protein Mutanten **D60CMbp**, **T67CMb**, **K63CMb** und **K96CMb** zu exprimieren, wurde BL21 *E. coli* Zellen mit den jeweiligen Expressionsvektoren transformiert. Anschließend wurden die einzelnen Myoglobinvarianten überexprimiert, die Zellen enzymatisch und mittels Ultraschallbehandlung aufgeschlossen und die überexprimierten Myoglobinvarianten aus dem Überstand gereinigt. Hierzu wurde zunächst eine fraktionierte Fällung der Myoglobine mittels Ammoniumsulfatfällung durchgeführt und die gewonnenen Myoglobinlösungen anschließend dialysiert, um die Salze zu entfernen. Die frisch dialysierten Lösungen wurden am nächsten Tag für eine Reinigung mittels Anionenaustauschchromatographie verwendet.

Die Abbildung 75A und Abbildung 75B zeigen die Chromatogramme der FPLC Reinigung des exprimierten **K96CMb** Proteins, während die restlichen Analysen der **D60CMbp**, **T67CMb** und **K63CMb** Mutanten im Anhang Kapitel 11.4.4 (Seite 257) dargestellt worden sind. Zur Detektion des rekombinanten Myoglobins wurden die Absorption der Soretbande des Kofaktors Häm bei 410 nm und die Eigenabsorption der aromatischen Aminosäuren bei 280 nm verfolgt. Insgesamt konnten sechs Fraktionen gesammelt werden, welche eine deutliche Absorption bei 410 nm aufwiesen und somit die Anwesenheit des Kofaktors Häm verifizieren (Abbildung 75B). Die Fraktionen wurden anschließend mittels denaturierender SDS-PAGE und UV-Vis Spektroskopie analysiert.



**Abbildung 75:** (A) Anionenaustauschchromatographie zur Reinigung des **K96CMb** Proteins mittels einer Mono Q 5/50 Säule. Die Salzkonzentration wurde innerhalb von 30 min von 0 M auf 1 M graduell erhöht. Detektiert wurden die Absorptionen bei 280 nm (blaues Chromatogramm) und 410 nm (rotes Chromatogramm). **Puffer A:** 20 mM Ethanolamin; **Puffer B:** 20 mM Ethanolamin, 1M NaCl. (B) Gesammelte Fraktionen zwischen einem Elutionsvolumen von 10 mL und 25 mL. (C) SDS-PAGE Charakterisierung der Fraktionen F1 bis F6. Als Vergleichsproben wurden das native Myoglobin (**Mb**) und das Lysat nach der Dialyse (**Dialyse**) aufgetragen. **Konditionen:** 12 %iges SDS-PA-Gel; **Spannung:** 120 V; **Laufpuffer:** 1x SDS Laufpuffer; **Färbung:** Coomassie-Blau. **PM:** Proteinmarker. (D) UV-Vis spektrometrische Analyse der aufgereinigten Fraktionen F1-F6.

Die SDS-PAGE Charakterisierung in Abbildung 75C zeigt, dass die Dialyseprobe (Dialyse) eine überexprimierte Bande bei ca. 15 kDa aufweist, welche die gleiche elektrophoretische Mobilität wie das native Mb (**Mb**) besitzt und somit eine erfolgreiche Expression des Proteins belegt. Die Betrachtungen der Fraktionen F1 bis F6 zeigen jedoch, dass die Abtrennung der Nebenprodukte nur in den ersten beiden Fraktionen F1 und F2 erfolgreich durchgeführt werden konnte, während speziell in den Fraktionen F4 bis F6 ein hoher Anteil an nicht abgetrennten Proteinen erkannt werden kann. Die Banden der Fraktion F2 und F3 knapp über 25 kDa könnten Myoglobin-Dimere widerspiegeln, welche sich aufgrund intermolekularer Cysteinbrücken ausgebildet haben. Die Ausbildung von Cysteinbrücken könnte ebenfalls die erschwerte Aufreinigung begründen, da das exprimierte

**K96CMb** intermolekulare Cysteinbrücken mit Cysteinresten anderer Proteine ausbilden kann und somit eine Reinigung erschwert wird. Hierzu könnte für zukünftige Anwendungen das dialysierte Lysat zunächst mittels Dithiothreitol (DTT) behandelt werden, um eine Reduzierung der Cysteinbrücken zu gewährleisten und somit die Ausbeuten zu erhöhen.

**Tabelle 14:** Ermittelte Absorptionen der isolierten FPLC Fraktionen F1-F6 bei 410 nm bzw. 280 nm und die daraus berechneten  $A_{410}/A_{280}$  Verhältnisse. Für die Reinheitsberechnung wurde ein Vergleich der Verhältnisse mit den  $A_{410}/A_{280}$  von kommerziell erwerblichem Myoglobin durchgeführt.

Fraktion	$A_{410}$	$A_{280}$	$A_{410}/A_{280}$	Reinheit [%]
F1	0,09	0,05	1,8	45
F2	0,35	0,16	2,2	55
F3	0,35	0,27	1,3	33
F4	0,31	0,17	1,8	45
F5	0,14	0,23	0,6	15
F6	0,15	0,28	0,5	12
Kommerzielles natives Mb	0,88	0,22	4,0	

Um den Reinheitsgrad der gewonnenen Myoglobin Mutanten zu bestimmen, wurde das native Myoglobin vom Pottwal kommerziell erworben. Zur Bestimmung wurde das Verhältnis  $A_{410}/A_{280}$  mittels UV-Vis Spektroskopie bestimmt und zur Berechnung der Reinheit verwendet (Tabelle 14). Das Verhältnis konnte als Annäherung verwendet werden, da die ausgetauschten Aminosäuren der nativen Struktur keine aromatischen Aminosäuren waren und somit keine Absorptionsänderung bei 280 nm erwartet wurde. Hierbei weist kommerziell erhältliches Myoglobin vom Pottwal ein Verhältnis von ca. 4,0 auf (Tabelle 14). Betrachtet man als Fallbeispiel die UV-Vis Spektren der einzelnen Fraktionen in Abbildung 75D, so deuten die detektierten  $A_{410}/A_{280}$  Verhältnisse auf eine Verunreinigung der einzelnen Fraktionen hin. Speziell die detektierten Banden der Fraktionen F1-F3 der **K96CMb** Mutante, bei denen bei der analytischen Gelcharakterisierung keine weiteren Verunreinigungen erkannt werden konnten, weisen im UV-Vis Spektrum ein  $A_{410}/A_{280}$  Verhältnis von  $\leq 2,2$  auf (Tabelle 14). Daraus folgt, dass die Reinheit von kommerziell erhältlichem Myoglobin nicht erreicht werden konnte. Es muss jedoch beachtet werden, dass ein weiterer Grund für das geringe  $A_{410}/A_{280}$  Verhältnis ein hoher Anteil an Apo-Myoglobin sein könnte, welcher durch die Destabilisierung des Kofaktors aufgrund des Aminosäureaustausches oder mechanischer Behandlungen durch z.B. Zentrifugationsschritte während die experimentellen Durchführung hervorgerufen worden sein könnte.

Eine weitere Beobachtung, welche Verunreinigungen der einzelnen Proben belegen, sind die detektierten Absorptionsmaxima in den UV-Vis Spektren. Für eine genauere Anschauung sind die Absorptionsmaxima der Fraktionen F1 und F6 bei 264 nm bzw. 279 nm in Abbildung 75D dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Maxima der einzelnen Fraktionen weit von den Absorptionsmaxima der Polypeptidkette von reinen Proteinen bei 280 nm abweichen und zwischen einem Wert von 260 nm bis 280 nm liegen. Dies lässt die Vermutung zu, dass in den einzelnen Proben Verunreinigungen wie z.B. DNA Moleküle vorliegen, welche unter den verwendeten FPLC Bedingungen nicht von dem Protein abgetrennt werden konnten und eine Verschiebung der Maxima zu niedrigeren Wellenlängen  $\leq 280$  nm bewirken. Dieses Phänomen konnte bei allen Mutanten beobachtet werden (vgl. Anhang Kapitel 11.4.4). Um z.B. die DNA bzw. RNA Moleküle für zukünftige Anwendung zu entfernen, könnten das Lysat zusätzlich mit einer DNase/RNase Enzym Mixtur versetzt werden um die einzelnen DNA bzw. RNA Moleküle zu verdauen und somit eine Reinigung zu erleichtern. Des Weiteren könnte vor der Anionenaustauschchromatographie eine Größenausschlusschromatographie durchgeführt werden, um mittels eines weiteren Reinigungsschritts die Reinheit der Proben zu erhöhen. Ebenfalls könnten unterschiedliche FPLC Bedingungen getestet werden, wie z.B. eine langsamere Gradientenerhöhung der Salzkonzentration, um eine bessere Separation der einzelnen Fraktionen zu erreichen. Eine Optimierung der hier angewandten experimentellen Durchführung wurde jedoch nicht ausgeführt und die Gründe sollen im Folgenden kurz erläutert werden.

Ein Hauptfaktor, welcher zukünftige Anwendungen der isolierten Myoglobinvarianten limitiert sind die erreichten Ausbeuten. Für die Ermittlungen der Ausbeuten wurden die einzelnen Hauptfraktionen genutzt, bei denen das höchste  $A_{410}/A_{280}$  Verhältnis beobachtet werden konnte. Die Konzentration des Myoglobinanteils wurde anschließend über die Soret-Bande bei 410 nm bestimmt und zur Berechnung der Proteinstoffmenge eingesetzt. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 15 dargestellt. Es ist zu erkennen, dass zum Beispiel bei der **K96CMb** Variante aus einem FPLC Lauf (bzw. 1 mL Lysat) eine Ausbeute von 2,1 nmol (36  $\mu$ g) gewonnen werden konnte mit einer Reinheit von gerade einmal 43 %. Ähnliche Ergebnisse konnten bei allen anderen Cystein Myoglobinvarianten beobachtet werden (Tabelle 15 und Anhang Kapitel 11.4.4, Seite 257). Speziell die Optimierung dieser Durchführung hätte zu weiteren Reinigungs- und Behandlungsschritten geführt, welche wiederum mit einem Ausbeutenverlust und hohen Zeitaufwand in Verbindung gestanden hätten.

**Tabelle 15:** Berechnete Ausbeuten der **mMb** Hauptfraktionen nach einem durchgeführten FPLC Lauf. Zur Berechnung wurden die Fraktionen mit dem höchsten  $A_{410}/A_{280}$  Verhältnis verwendet.

Mutante	$A_{410}/A_{280}$	Ausbeute [nmol]	Ausbeute [ $\mu$ g]	Reinheit [%]*
<b>K96CMb</b>	1,7	2,1	36	43
<b>K63CMb</b>	2,8	3,9	67	71
<b>T67CMb</b>	1,6	3,1	53	41
<b>D60CMb</b>	2,2	4,5	77	56

\* Die Reinheit wurde über das ermittelte  $A_{410}/A_{280}$  Verhältnis von nativen Mb (3,9) berechnet.

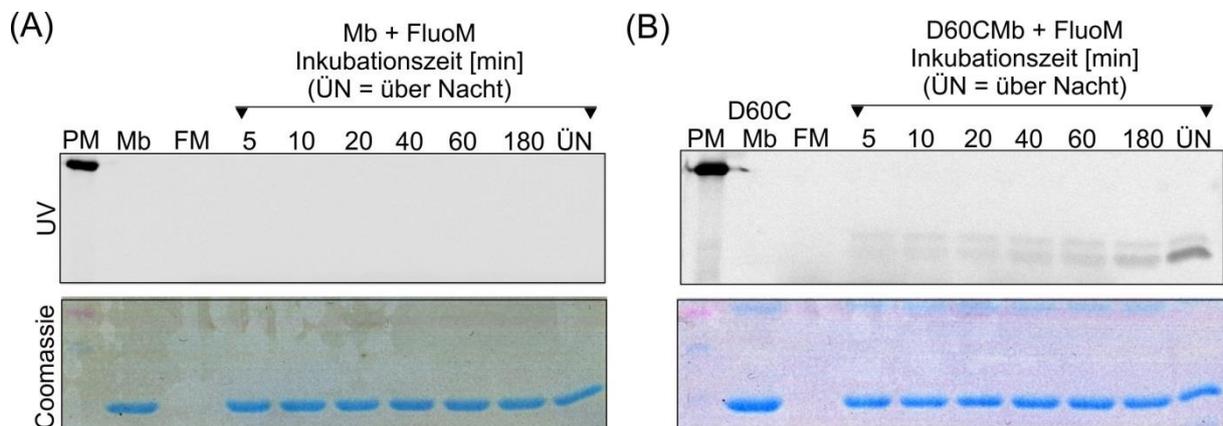
Aus diesem Grund wurde überlegt, die angewandte Klonierungsmethode zur Einführung eines Reinigungstags einzusetzen<sup>189</sup>. Die Markierung der rekombinanten Proteine mit einem spezifischen Tag würde die Abtrennung der Verunreinigungen mittels Affinitätschromatographie erleichtern und den zeitlichen Aufwand der Durchführung verkürzen. Eine molekularbiologische Methode zur Einführung eines Tags wird ab Kapitel 3.4.7 näher erläutert.

Bevor jedoch die Affinitätstags in das Protein eingefügt wurden, wurde einige Voruntersuchungen der gewonnenen Mutanten durchgeführt. Für eine zukünftige Anwendung ist es wichtig, dass die klonierten Cysteinreste zur chemischen Modifizierung verwendet werden können und dass die Aktivitäten der gewonnenen Myoglobinvarianten aufgrund der Cystein Klonierung nicht vollständig ausgelöscht werden. Aus diesem Grund wurde in einem ersten Experiment überprüft, ob die Oberfläche der Cystein-**Mb** Mutanten mittels eines Fluorophors modifiziert werden können. In einem zweiten Test wurde anschließend ein vorläufiger Aktivitätstest der Proben durchgeführt. Zur Anwendung wurden hierzu die Fraktionen mit den höchsten  $A_{410}/A_{280}$  Verhältnissen (Tabelle 15) verwendet und die Ergebnisse der Voruntersuchungen sollen in den nächsten beiden Kapiteln kurz erläutert werden.

### 3.4.5 Fluorophor-Modifizierung der Myoglobin-Cystein Mutanten

Zur Fluorophor-Modifizierung der exprimierten Myoglobin Cystein Mutanten **D60CMb**, **T67CMb**, **K96CMb** und **K63CMb** wurden die Hauptfraktionen der FPLC Aufreinigung aus Kapitel 3.4.4 verwendet. Als Fallbeispiel soll im Folgenden die Kupplung an die Mutante **D60CMb** näher erläutert werden, während die restlichen Ergebnisse im Anhang Kapitel 11.4.5 dargestellt sind. Für die Reaktion wurde die Konzentration der Proteinlösungen über die Soretbande bei 410 nm und unter Anwendung des Lambert Beerschen Gesetzes bestimmt.

Die Fluorophorkupplung an die Mutante **D60CMb** wurde mittels des kommerziell erhältlichen Fluorophors **Fluoresceinmaleimid (FluoM)** durchgeführt. Hierzu wurden zunächst ca. 5 nmol **D60CMb** für ca. 1 h bei Raumtemperatur mittels *tris*-2-carboxyethylphosphin (TCEP) behandelt, um die Disulfidbrücken zu reduzieren. Anschließend wurden 500 pmol des reduzierten Proteins mit jeweils einem 10 fachen Überschuss **FluoM** versetzt und für unterschiedliche Zeitperioden inkubiert. Die Reaktion wurde mittels Schockgefrierung gestoppt, indem die inkubierten Lösungen nach jeweils x min in Aceton mit Trockeneis getaucht und bei -20 °C gelagert wurden. Die Charakterisierung erfolgte mittels SDS-PAGE (Abbildung 76). Die Proteine wurden zunächst im Gel mit UV-Vis Licht detektiert und anschließend mit Coomassie Blau angefärbt. Als Negativkontrolle wurde natives **Mb** unter gleichen Bedingungen behandelt (Abbildung 76A).



**Abbildung 76:** SDS-PAGE Charakterisierung der Kupplung des Fluorophors Fluoresceinmaleimid (**FluoM**) auf die Oberfläche des (A) nativen Myoglobins (**Mb**; Negativkontrolle) und (B) der **D60CMb** Mutante nach unterschiedlichen Zeitperioden (ÜN = über Nacht). **PM**: Protein Marker; **FM**: FluoM.

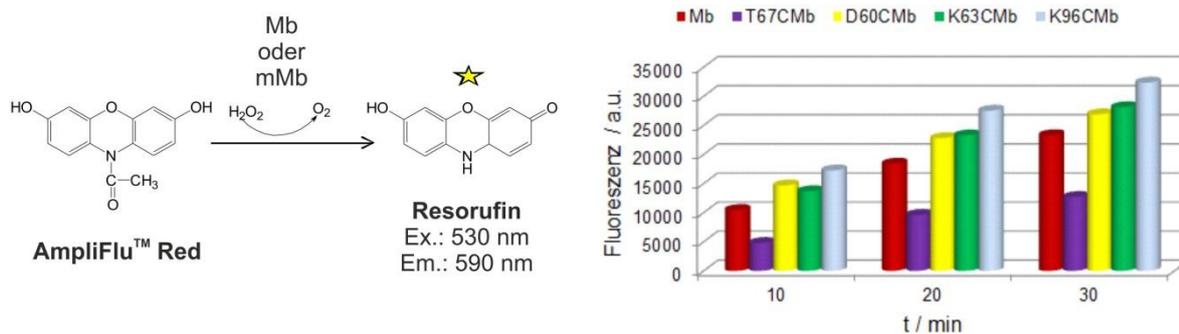
Die SDS-PAGE Charakterisierung der **FluoM** Kupplung an **D60CMb** in Abbildung 76B zeigt, dass die Modifizierung der Proteinoberfläche erfolgreich durchgeführt werden konnte. Nach der UV Bestrahlung kann bei allen Mutanten eine Bande detektiert werden, welche mit steigender Inkubationszeit an Intensität zunimmt, ebenfalls mittels Coomassie Blau angefärbt werden kann und somit die Existenz eines Protein-Fluorophor Konjugats belegt. Die höchste Kupplungseffizienz kann nach einer Inkubation über Nacht (ÜN) beobachtet werden. Die selektive Kupplung des Fluorophors über die Cysteinreste wird bei der Betrachtung der Negativkontrolle mit nativen **Mb** verstärkt, da in diesem Fall keine UV Detektion des Fluorophors auf der Proteinoberfläche festgestellt werden kann (Abbildung 76A). Die

restlichen Mutanten konnten ebenfalls erfolgreich mit dem Farbstoff **FluoM** umgesetzt werden und die Ergebnisse sind in dem Anhang Kapitel 11.4.5 (Seite 260) dargestellt

Um zu testen, ob die Klonierungen die Aktivitäten der Mutanten beeinflussen, wurde ein vorläufiger Aktivitätstest durchgeführt. Die Ergebnisse sollen im nächsten Kapitel kurz erläutert werden.

### 3.4.6 Aktivitätstests der Myoglobin-Cystein Mutanten

Nach Reinigung der Mutanten wurde ein Aktivitätstest durchgeführt, indem der AmpliFlu<sup>TM</sup> Assay verwendet wurde. Hierzu wurde die Konzentration der einzelnen Hauptfraktionen aus Kapitel 3.4.4 über die Soretbande bei 410 nm bestimmt und 1 pmol Protein für den Test eingesetzt. Die Umsetzung des AmpliFlu<sup>TM</sup> Red in das fluoreszierende Produkt Resorufin wurde in einem Zeitraum von 30 min (Messung pro Minute) detektiert. Die Ergebnisse sind in der folgenden Abbildung 77 dargestellt.



**Abbildung 77:** Aktivitätstest der mMb Mutanten durch Umsetzung des Substrates AmpliFu<sup>TM</sup> Red zu dem fluoreszierenden Produkt Resorufin in Anwesenheit von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und den mMb Mutanten bzw. von nativen Myoglobin Mb. Nach einer Anregung bei einer Wellenlänge von 530 nm kann die Fluoreszenz des gebildeten Farbstoffs Resorufin bei 590 nm verfolgt werden. **Endkonzentration der Substanzen in Lösung:** 50 µM Amplex® Red, 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und 10 nM mMb bzw. Mb.

Die detektierten Fluoreszenzsignale zeigen, dass die Mutanten **D60CMb**, **K63CMb** und **K96CMb** bis zu ca. 60 % höhere Fluoreszenzsignale aufweisen, als das native **Mb**. Eine Ausnahme stellt hier die Mutante **T67CMb**, welche eine etwa 50 % niedrigere Fluoreszenzentwicklung gegenüber nativen **Mb** zeigt. Der Verlust der Aktivität der **T67CMb** Mutante könnte über die räumliche Position der Aminosäure in der Struktur des Myoglobins begründet liegen (vgl. Kapitel 3.4, Abbildung 67). Ein Austausch der polaren Aminosäure Threonin (T) könnte eine Veränderung der Umgebung des aktiven Zentrums hervorrufen und die

Koordination des Substrat-Enzym Komplexes beeinflussen. Es muss jedoch erläutert werden, dass es sich bei der Betrachtung der Aktivitäten nur um eine vorläufige Analyse handelt, da die einzelnen Fraktionen nicht absolut rein vorliegen, wie in Kapitel 3.4.4 ausführlich erläutert wurde. Dennoch bestätigen die Voruntersuchungen, dass die eingefügten Cysteinreste nicht zu einem absoluten Aktivitätsverlust der modifizierten Cystein **Mb** Mutanten führen, sondern vorwiegend eine Steigerung beobachtet werden konnte und die Mutanten für ein zukünftiges Kupplungskonzept verwendet werden können.

### 3.4.7 Einführung einer Polyhistidin-Markierungen in natives Myoglobin

Bereits in Kapitel 3.4.4 wurden die Herausforderungen zur Reinigung der exprimierten Myoglobin Cystein Mutanten ausführlich geschildert. Um die Reinigungsprozesse zu verbessern wurde die Überlegung durchgeführt, das **Mb** mit Affinitätsmarkierungen (Affinitätstags) zu versehen. Bei den sogenannten Tags handelt es sich um kurze Polypeptidketten, welche zur Aufreinigung rekombinanter Proteine über z.B. Affinitätschromatographie eingesetzt werden können.<sup>190</sup> Hierdurch könnte die Abtrennung der Verunreinigungen erleichtert werden, welches mit einer erhöhten Ausbeute verbunden ist und eine Verkürzung des praktischen Zeitaufwandes der Reinigung in sich birgt.

Aus diesem Grund wurde in einem ersten Experiment versucht, einen Polyhistidin Tag (kurz: „His Tag“) an das N-terminale Ende des Myoglobins einzuführen. Das Polyhistidintag bildet einen Chelatkomplex mit zweiwertigen Nickelionen und kann somit an einem Feststoff gebundenen Ni-Chelator immobilisiert werden, wobei zur Reinigung der markierten Proteine meist Affinitätssäulen (Metall-Chelat-Affinitätschromatographie) verwendet werden.<sup>191, 192</sup>

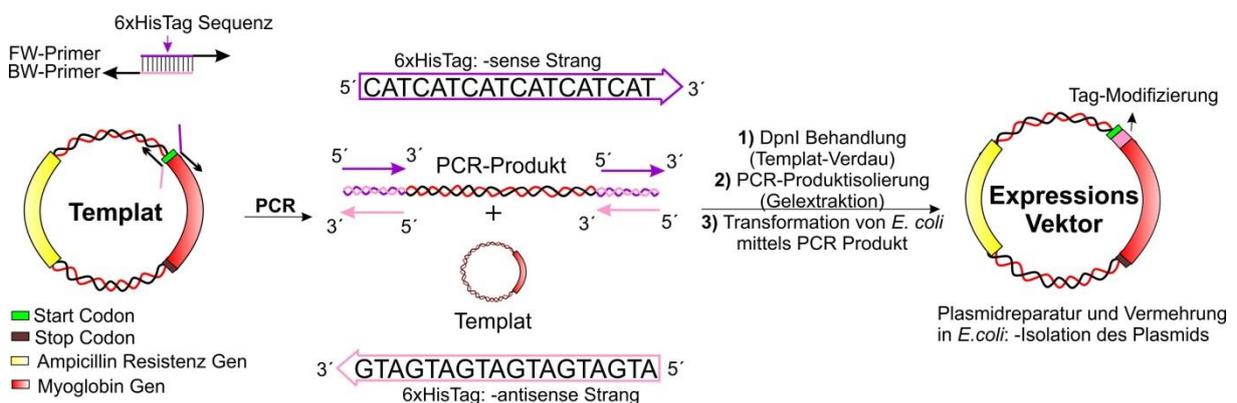
Zur Einführung eines 6x His Tags wurde ein ähnliches Verfahren angewandt, welches im Jahre 2013 von Erkelenz *et al.*<sup>169</sup> verwendet wurde. Es konnte gezeigt werden, dass Überhangsmarkierungen von speziell gestalteten Primerpaaren dazu verwendet werden können, zusätzliche genetische Information in ein Plasmid einzubauen, indem ebenfalls homolog rekombinatorische Klonierungsverfahren verwendet wurden.

Zur Einführung eines Reinigungstags müssen die homologen Endsequenzen die genetischen Informationen des His Tags beinhalten, damit nach dem Reparatursystem des Plasmids innerhalb der Zelle die genetischen Informationen in das Leseraster des **Mb** Gens integriert werden können.

Als Testplasmid wurde das Plasmid **MbpUC19** verwendet und die Primer zur Einführung eines N-terminalen 6x His Tag gezielt auf dem Plasmid lokalisiert und gestaltet (Abbildung

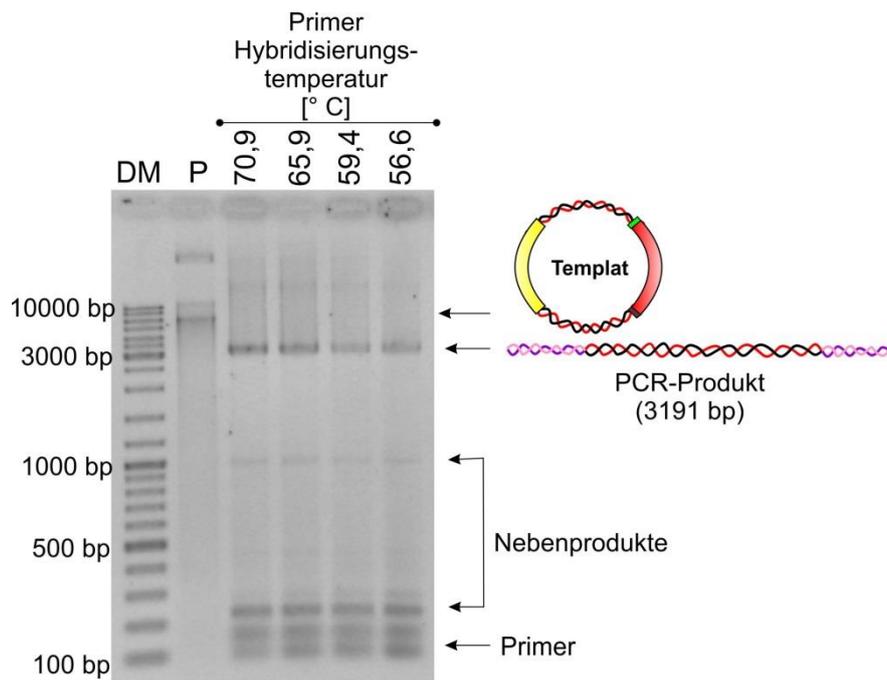
78). Die Gestaltung der Primer erfolgte nach spezifischen Regeln und sollen im Folgenden kurz erläutert werden. Der FW-Primer (**FW-His6x**) wurde mit einer 25 Basen langen Sequenz ausgestattet, welche komplementär zum nicht kodierenden Strang des Mb-Gens ist und während des Primerhybridisierungsprozesses direkt nach dem Startcodon hybridisiert. Hierbei wurde die Schmelztemperatur  $T_M$ (Mb-Gen) auf ca. 66 °C angepasst. Der komplementäre Bereich des Primers mit dem Mb-Gen repräsentiert somit die ersten 22 Basen des Myoglobin Leserasters, welche nach dem Methionin-Start-Codon (ATG) folgen. Anschließend wurde dem Primer am 5'-Ende eine 18 Basen lange Sequenz als Überhang eingefügt, welche das 6x His Tag kodieren.

Zur Gestaltung des BW-Primers (**BW-His6x**), wurde zunächst eine komplementäre Sequenz zum sense Strang des Mb-Gens gewählt, welche mittels der Sequenzlänge von insgesamt 37 Basen einer Schmelztemperatur  $T_M$ (Mb-Gen) von 66 °C angepasst wurde. Die ersten drei Basen des komplementären Sequenzbereichs repräsentieren die antisense Kodierung des Start-Triplett-Codons. Um eine Einführung des His Tags nach dem Start-Codon zu gewährleisten, wurde der **BW-His6x** Primer ebenfalls mit einem Überhang verlängert, welcher die genetischen Informationen des nicht kodierenden Stranges für das 6xHis Tag enthält. Durch die Gestaltung des Primerpaares wurde gewährleistet, dass die genetische Informationen des 6x His Tags in den ersten PCR Zyklen nach dem Startcodon in den sense Strang eingebaut werden und das PCR-Produkt mit homologen Endsequenzen flankiert wurde, welche den 6xHis Tag beinhaltet. Die Endsequenzen des PCR-Produktes sind in Abbildung 78 dargestellt und mit farblichen Pfeilen markiert worden.



**Abbildung 78:** Schematische Darstellung der Gestaltung eines Primerpaares zur N-terminalen Gensequenz Einführung eines 6x His-Tags (CATCATCATCATCATCAT) in das offene Leseraster des Mb-Gens und die anschließende Zirkularisierung des PCR-Produktes über die homologen Endsequenzen in *E. coli*. Die Primer sind als Pfeile dargestellt, indem die Pfeilspitze das 3'-Ende und der Pfeilursprung das 5'-Ende darstellt.

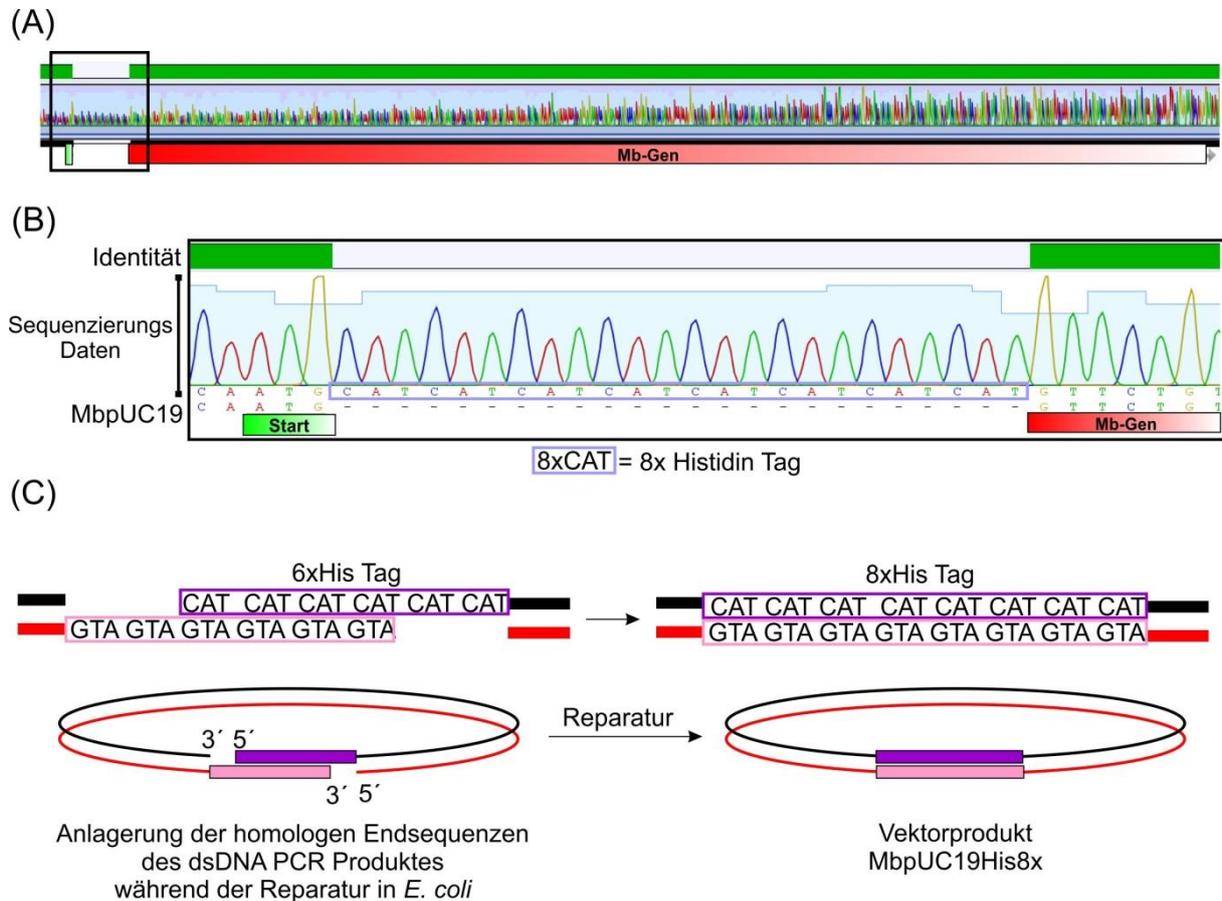
Zur Durchführung der PCR wurde das Protokoll aus Kapitel 3.4.3 verwendet (vgl. Tabelle 13, Seite 134) und eine Gradienten PCR-durchgeführt, indem vier unterschiedliche Primerhybridisierungstemperaturen zwischen 56,6 und 70,9 °C getestet wurden. Die PCR-Produkte wurden anschließend mittels analytischer Agarosegelelektrophorese nachgewiesen. In Abbildung 79 ist zu erkennen, dass bei allen PCR-Konditionen das gewünschte lineare PCR-Produkt mit einer Länge von 3191 bp nachgewiesen werden kann und die Amplifizierung somit erfolgreich durchgeführt werden konnte.



**Abbildung 79:** Ergebnis der analytischen Agarose-Gelelektrophorese zur Charakterisierung des linearen 3391 bp langen PCR-Produktes, welches mittels der beiden Primer **FW-6xHis** und **BW-6xHis** amplifiziert wurde. **DM:** 10 kbp Marker, **P:** Plasmid **MbpUC19**; **Konditionen:** 1 % Agarose, 200 V; **Laufpuffer:** 1x TBE-Puffer; **Färbung:** Ethidiumbromid.

Die PCR-Produkte wurden in einem nächsten Schritt gereinigt, indem zunächst das Templat mittels des Restriktionsenzym DpnI verdaut und anschließend eine präparative Agarosegelelektrophorese zur Gelextraktion des Produktes durchgeführt wurde. Das gereinigte PCR-Produkt wurde dazu verwendet DH5α *E. coli* Bakterienzellen mittels Hitzeschock zu transformieren und die Zellen zur Selektion auf Ampicillin Agarplatten ausgestrichen. Am nächsten Tag wurden zwei unterschiedliche Kolonien verwendet, um eine Plasmidaufreinigung nach AAV 14 durchzuführen. Die gewonnen Plasmide wurden über die Firma GATC, wie bereits in Kapitel 3.4.3 beschrieben, sequenziert. Zur Analyse der Sequenzdaten wurde die **MbpUC19** Sequenz mit den Sequenzierungsdaten verglichen. Bei

beiden isolierten Plasmiden konnten dasselbe Ergebnis beobachtet werden und ist in der folgenden Abbildung 80 dargestellt.



**Abbildung 80:** (A) Vergleich der Sequenzierungsdaten des isolierten **MbpUC16HisTag** Vektors mit den Daten des **MbpUC19** Templates unter Verwendung des Computerprogramms *Genious*. Eine hundertprozentige Übereinstimmung der Sequenzen ist mit einem grünen Balkenidentitätsdiagramm dargestellt, während eine Lücke innerhalb der Identität eine vorhandene Mutation widerspiegelt (schwarze Markierung). (B) Nähere Betrachtung der sequenzierten Mutationen innerhalb des Mb-Gens. Direkt nach dem Start-Codon kann die Gensequenz eines 8xHis Tags erkannt werden (lila Markierung). (C) Schematische Darstellung der Anlagerung der homologen Endsequenzen des doppelsträngigen (ds) PCR-Produktes während des Reparaturmechanismus in *E. coli*.

Der Vergleich der Sequenzierungsdaten mit dem **MbpUC19** Sequenzen zeigt, dass eine größere Abweichung von der Referenzsequenz nach dem Startcodon auftritt (Abbildung 80A). Bei der näheren Betrachtung der detektierten Mutationen kann eine CAT Wiederholungssequenz erkannt werden, welche die Aminosäure Histidin kodiert und direkt nach dem Methionin-Start-Codon ATG lokalisiert ist (Abbildung 80B). In diesem Fall kann

verifiziert werden, dass die Primergestaltung zur Zirkularisierung des Plasmids und zur gezielten Einklonierung einer N-terminalen His Tags Sequenz verwendet werden kann.

Bei der Auszählung der CAT Wiederholungssequenz wird jedoch offenbart, dass die sequenzierten Daten keinen 6x His Tag aufweisen, sondern ein 8x His Tag innerhalb des Mb-Gens vorliegt. Dieses Phänomen könnte dadurch erklärt werden, dass während des Reparaturmechanismus innerhalb der *E. Coli* Zelle Tripletts Verschiebungen stattgefunden haben, welche aufgrund der Wiederholungssequenzen begünstigt sein könnten und zu insgesamt zwei zusätzlichen Tripletts Codone führte (Abbildung 80C). Die Verschiebung könnten für zukünftige Anwendung vermieden werden, indem z.B. zur Histidin Kodierung nicht nur das Codon CAT verwendet wird, sondern unsystematisch ebenfalls der Tripletts-Code CAC für Histidin in die Primer-Überhänge integriert werden. Eine unsystematische Sequenzkodierung des 6x His Tags, wie z.B. CAT CAT CAC CAT CAC CAC, könnte eine vollständige Hybridisierung der komplementären Enden vor der Reparatur begünstigen und eine kontrollierte Einführung des *Tags* hervorrufen.

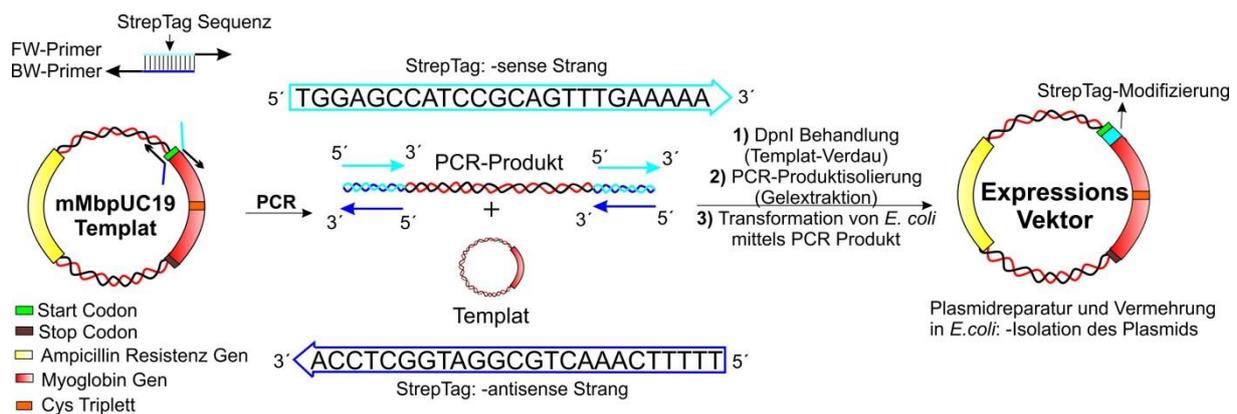
Eine genauere Analyse dieses Phänomens wurde in dieser Arbeit jedoch nicht durchgeführt. Der Grund lag darin, dass die Expression und Reinigung des rekombinanten N-terminalen His Tag markierten **Mb** nicht erfolgreich durchgeführt werden konnte. Eine Begründung könnte darin liegen, dass der eingeführte His Tag die Rekonstitution des Kofaktors Häm während der Expression verhindert und das Protein somit seine globuläre und stabile Struktur verliert. Denn wie bereits in der Einleitung Kapitel 2.5 erwähnt, wird der Kofaktor Häm über den Histidin Rest (His93) innerhalb des Proteins koordiniert. Der Vorhandene His *Tag* könnte das Häm ebenfalls koordinieren und den Einbau während der Expression stören oder sogar verhindern. Aus diesem Grund wurden die Ergebnisse nicht weiter analysiert und aus zeitlichen Gründen in einem nächsten Schritt der Reinigungstag geändert. Die Ergebnisse sind im folgenden Kapitel dargestellt.

### 3.4.8 Einführung eines Strep *Tag II*-Affinitäts-*Tags* in Cystein-Myoglobin Mutanten

Das Strep *Tag II* (**STII**) ist eine acht Aminosäuren lange Peptidsequenz (NH<sub>2</sub>-WSHPQFEK-COOH)<sup>193-197</sup>, welche eine hohe Affinität zum Protein Streptavidin (**STV**) und zur Reinigung rekombinanter Proteine über STV-Affinitätschromatographie eingesetzt wird. Das Reinigungsverfahren wurde im Laufe der Zeit optimiert, indem unterschiedlichste Streptavidin Mutanten bezüglich ihrer molekularen Erkennung gegenüber dem Peptidliganden analysiert wurden. Hierbei konnte eine Streptavidinmutante ermittelt werden, welche

hinsichtlich des **STII** Peptids eine erhöhte Bindungsaffinität aufwies, wobei diese sogenannte Streptavidinmutante `1` heutzutage auch als Strep-Tactin bezeichnet wird<sup>198</sup>. Somit können **STII** flankierten Proteine schnell und in hohen Ausbeuten mittels Strep-Tactin Chromatographiesäulen aus Zelllysate gewonnen werden<sup>194</sup>.

Die Einführung des **STII** erfolgte wie die bereits in Kapitel 3.4.7 beschriebene Einführung des 6x His Tags. Zur Primergestaltung des FW- und BW-Primers (**FW-STII** / **BW-STII**) wurden lediglich die Überhänge mit der His Tag Kodierung durch die genetischen Informationen des Strep Tags ausgetauscht (Abbildung 81). Hierzu wurde die 24 Basen lange Sequenz TGG AGC CAT CCG CAG TTT GAA AAA mit einer Schmelztemperatur  $T_M(\text{Komp})$  von 60 °C verwendet, um die acht Aminosäuren zu kodieren. Das spezifisch gestaltete Primerpaar konnte dazu verwendet werden, den **STII** Tag in jeden hergestellten **mMbpUC19** Vektor einzuführen, womit letztendlich Kosten und Zeit für die Modifizierungen gespart wurde.

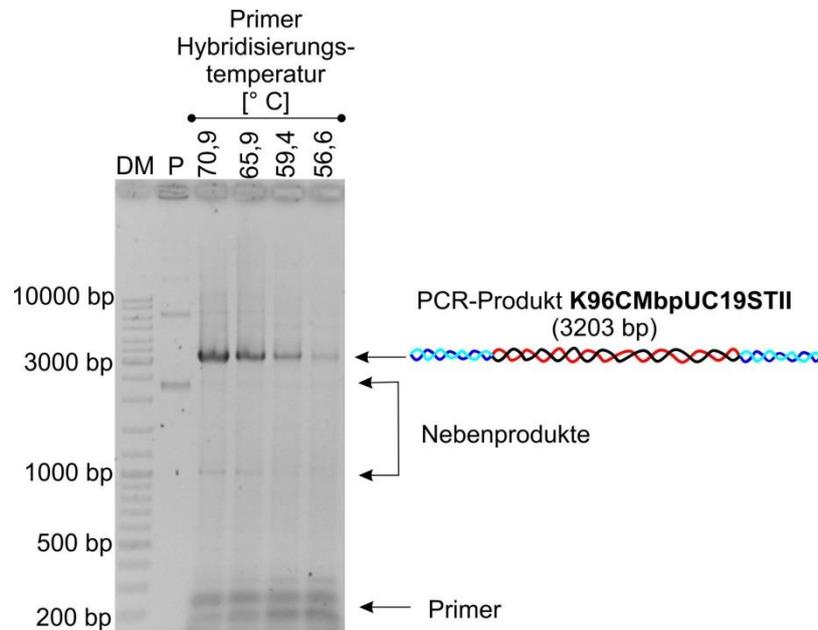


**Abbildung 81:** Schematische Darstellung der Primergestaltung zur N-terminalen Einführung eines Strep Tags II in die **mMbpUC19** Vektoren mittels PCR und die anschließende Zirkularisierung über die homologen Endsequenzen in *E. coli* Bakterienzellen.

Die PCR wurde nach dem Protokoll Tabelle 13 (Kapitel 3.4.3, Seite 134) durchgeführt, indem vier unterschiedliche Primerhybridisierungstemperaturen getestet wurden. Die Charakterisierung der PCR Produkte erfolgte mittels analytischer Agarosegelelektrophorese. Als Fallbeispiel ist die Gelcharakterisierung des linearen PCR-Produktes **K96CMbpUC19STII** in Abbildung 82 gezeigt, während die restlichen Analysen in dem Anhang Kapitel 11.4.6 (Seite 260) dargestellt worden sind.

Bei der Betrachtung des Gels ist deutlich zu erkennen, dass bei allen verwendeten Primerhybridisierungstemperaturen das gewünschte PCR-Produkt mit einer Länge von 3203

bp detektiert werden kann und die Ausbeute des Produktes mit steigender Temperatur zunimmt. Dieses Phänomen konnte bereits in Kapitel 3.4.3 erkannt werden und kann auf die Selbsthybridisierung der komplementären **STII** Bereiche des FW- und BW-Primers bei niedrigeren Temperaturen zurückgeführt werden.

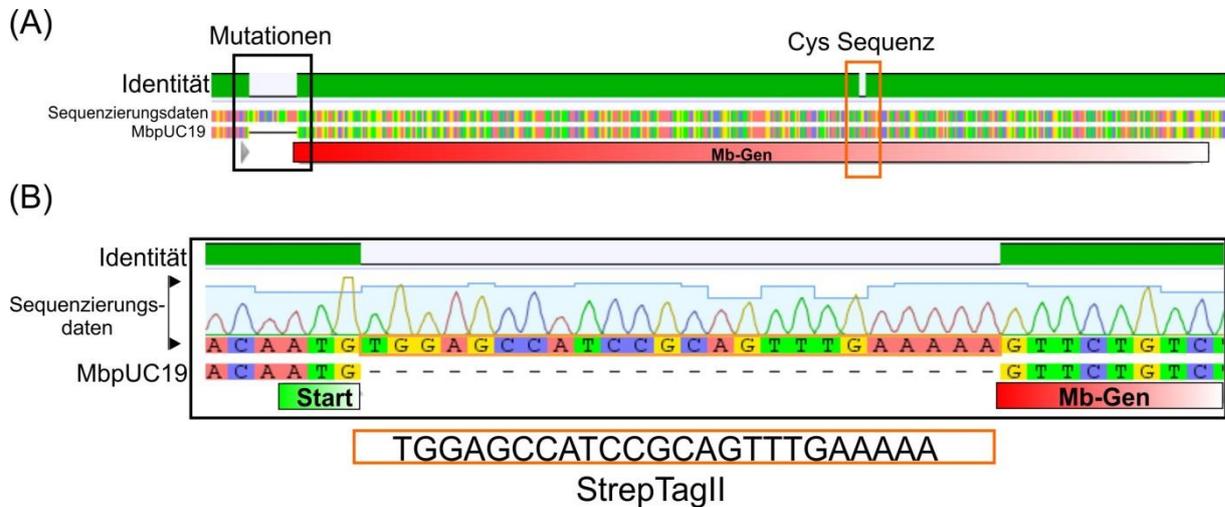


**Abbildung 82:** Ergebnis der analytischen Agarose-Gelelektrophorese zur Charakterisierung der linearen und 3203 bp langen PCR-Produkte **K96CMbpUC19STII**, welche mittels der Primerpaare **FW-STII** und **BW-STII** bei unterschiedlichen Primerhybridisierungstemperaturen amplifiziert wurde. **DM:** 10 kbp Marker, **P:** Plasmid **MbpUC19**; **Konditionen:** 1 % Agarose, 200 V; **Laufpuffer:** 1x TBE-Puffer; **Färbung:** Ethidiumbromid.

Das PCR Produkt wurde bereits wie in Kapitel 3.4.3 beschrieben gereinigt und DH5 $\alpha$  *E. coli* Zellen mittels des PCR Produktes transformiert. Die Plasmide wurden isoliert und durch die Firma *GATC* sequenziert. Zur Analyse wurde die Sequenz des **MbpUC19** Plasmid mit den ermittelten Sequenzierungsdaten unter Zuhilfenahme der Computerprogramms *Genious* verglichen. Das Ergebnis des isolierten **K96CMbpUC19STII** Vektors ist in der folgenden Abbildung 83 dargestellt, während die restlichen Analysen dem Anhang Kapitel 11.4.7 (Seite 262) zu entnehmen sind.

Der Vergleich der Sequenzierungsdaten mit dem **MbpUC19** Plasmid zeigt, dass neben der detektierten Deletion des Cysteinrestes (Abbildung 83A, orangene Markierung) eine größere Insertionslücke nach dem Startcodon des sequenzierten **K96CMbpUC19STII** Vektors auftritt (Abbildung 83A, schwarze Markierung). Bei näherer Betrachtung der Insertionssequenz kann erkannt werden (Abbildung 83B), dass eine erfolgreiche Klonierung des N-terminalen **STII** durchgeführt werden konnte. Weiterhin können keine Verschiebungen oder zusätzliche Basen

erkannt werden, welches eine kontrollierte Klonierung mittels der angewandten Methode belegt.



**Abbildung 83:** (A) Vergleich der Sequenzierungsdaten des isolierten **K96CMbpUC19STII** Vektors mit den Daten des **MbpUC19** Templats unter Verwendung des Computerprogramms *Genious*. Die orange markierte Mutationsposition stellt das erfolgreich eingeführte Cystein Triplet Codon dar. Eine hundertprozentige Übereinstimmung der Sequenzen ist mit einem grünen Balkenidentitätsdiagramm dargestellt, während eine Lücke innerhalb der Identität eine vorhandene Mutation widerspiegelt (schwarze Markierung). (B) Nähere Betrachtung der sequenzierten Mutationen (schwarze Markierung von Abbildung A). Direkt nach dem Start-Codon kann die Gensequenz eines **STII Tags** erkannt werden.

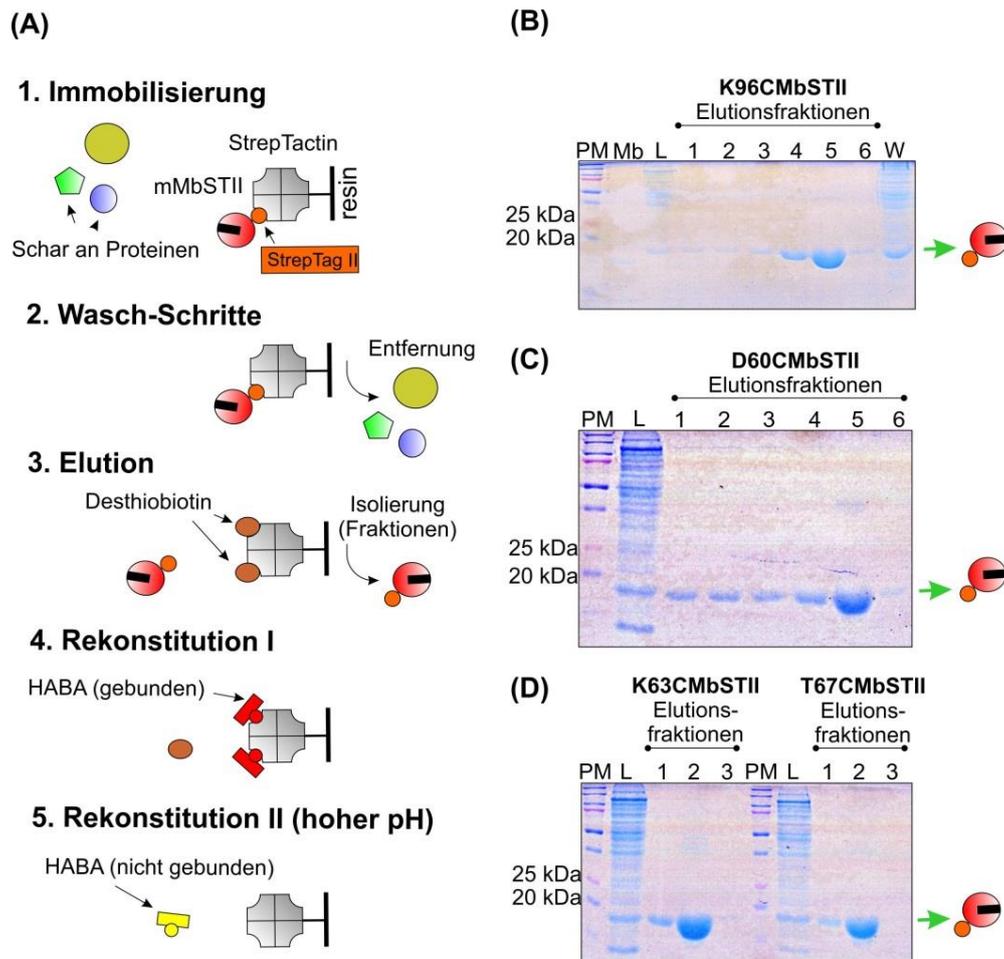
Das Primerpaar konnten erfolgreich zur Klonierung aller **mMbpUC19STII** Vektoren verwendet werden, welches die Effizienz der verwendeten Klonierungsstrategie unterstreicht (vgl. Anhang Kapitel 11.4.7). In allen Fällen konnte eine kontrollierte Klonierung des **STII** Tags nach dem Startcodon ermittelt werden.

In einem nächsten Schritt wurden die isolierten Vektoren zur Expression der **mMbSTII** Mutanten verwendet. Die Ergebnisse der Expression und Aufreinigung sollen im folgenden Kapitel dargestellt und erläutert werden.

### 3.4.9 Expression und Aufreinigung der StrepTagII markierten Myoglobin-Cystein Mutanten

Zur Expression der **mMbSTII** Mutanten wurde BL21(DE3) *E. coli* Bakterienzellen mittels der isolierten **mMbpUC19STII** Vektoren transformiert und über Nacht überexprimiert. Der Zellaufschluss (Endkonzentration der Zellen ca. 0,5 g/mL) erfolgte mittels Ultraschallbehandlung und das gewonnene Lysat wurde über Nacht dialysiert, um Biotinmoleküle aus

dem Lysat zu entfernen, welche die StrepTactin Säulen blockieren könnten. Die anschließende Reinigung der **STII** markierten Myoglobin Mutanten erfolgte mittels StrepTactin Gravitationsssäulen nach Herstellerangaben (Abbildung 84A), indem die Säule mit jeweils 10 mL des frisch dialysierten Lysat beladen wurde. Die gesammelten Fraktionen wurden zunächst mittels SDS-PAGE charakterisiert und die Ergebnisse sind in Abbildung 84 dargestellt.



**Abbildung 84:** (A) Schematische Darstellung der Aufreinigung von **mMbSTII** Mutanten mittels StrepTactin Gravitationsssäulen. (B) – (D) Charakterisierung der aufgereinigten Elutionsfraktionen von (B) **K96CMbSTII**, (C) **D60CMbSTII** bzw. (D) **K63CMbSTII** und **T67CMbSTII** mittels SDS-PAGE. **Konditionen:** 12%iges SDS Gel; 100 V; 1xSDS Laufpuffer. **PM:** Proteinmarker, **Mb:** natives Myoglobin, **L:** Lysat; **W:** Waschschriftfraktion, **HABA:** 4'-hydroxyazobenzol-2-carboxylsäure.

Die Abbildung 84B bis C zeigen die analytischen SDS-PA Gele der **mMbSTII** Fraktionen nach der Reinigung mittels StrepTactin Affinitätschromatographie. In allen Fraktionen kann bei ca. 15 kDa eine Bande erkannt werden, welche eine etwas langsamere Mobilität als das native **Mb** aufweist. Das langsamere Laufverhalten lässt über die erhöhte molekulare Masse

der gereinigten **mMbSTII** Proteine erklären, welche sich aus den integrierten Aminosäuren des **STII** Tags zusammensetzt ( $M_w(\text{STII}) = 1058,1 \text{ g/mol}$ ). Weiterhin konnten in allen gesammelten Fraktionen keine weiteren Banden detektiert werden, welches auf eine hohe Reinheit der gewonnenen Mutanten hindeutet.

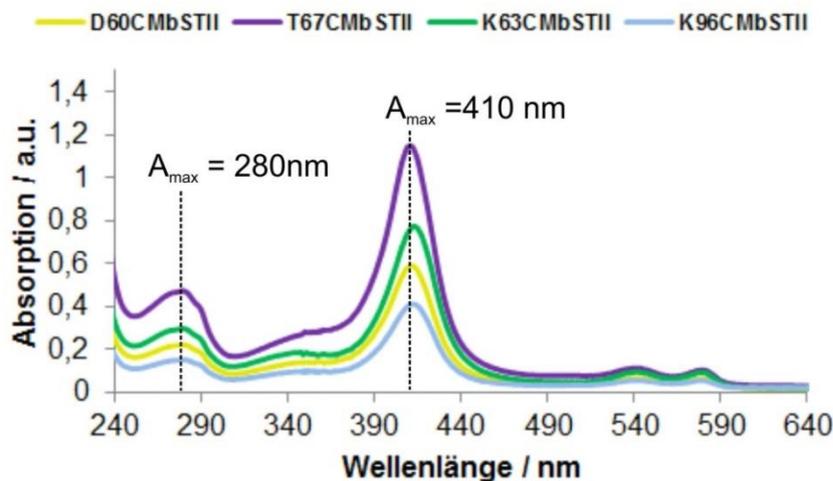
Für eine genauere Analyse wurden die einzelnen Fraktionen mittels UV-Vis Spektroskopie analysiert. Um die Daten etwas genauer zu interpretieren, wurde zunächst das  $A_{410}/A_{280}$  Verhältnisse der einzelnen gesammelten **mMbSTII** Fraktionen genauer betrachtet. Die ermittelten Werte und berechneten Ausbeuten der einzelnen Fraktionen sind in der Tabelle 16 dargestellt. Zur Berechnung der Ausbeuten wurden zunächst die Konzentrationen der **mMbSTII** Fraktion über die Sorebande bei 410 nm ( $\epsilon(A_{410}) = 1 \text{ 71000 M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) und unter Anwendung des Lambert Beer'schen Gesetzes bestimmt. Die Ausbeuten konnten anschließend über das Fraktionsvolumen ermittelt werden.

**Tabelle 16:** Berechneten Ausbeuten und ermittelte  $A_{410}/A_{280}$  Verhältnisse der gesammelten **mMbSTII** Fraktionen nach der Reinigung mittels StrepTactin Affinitätschromatographie. Die Ausbeuten beziehen sich auf insgesamt 10 mL Lysat, welches aus ca. 0,5 g/ mL überexprimierte Bakterienzellen gewonnen wurde.

Mutante	Fraktion	$A_{410}$	$A_{280}$	$A_{410}/A_{280}$	Ausbeute [nmol]	Ausbeute [mg]
<b>K96CMbSTII</b>	1	0,48	0,28	1,7	7	0,13
<b>K96CMbSTII</b>	2	0,46	0,25	1,8	6,7	0,12
<b>K96CMbSTII</b>	3	0,42	0,24	1,7	6	0,11
<b>K96CMbSTII</b>	4	0,56	0,27	2,1	32,9	0,60
<b>K96CMbSTII</b>	5	0,49	0,23	2,1	72,1	1,32
<b>K96CMbSTII</b>	6	0,48	0,23	2,1	7,2	0,13
<b>D60CMbSTII</b>	1	0,56	0,35	1,6	8,1	0,15
<b>D60CMbSTII</b>	2	0,52	0,33	1,6	7,5	0,14
<b>D60CMbSTII</b>	3	0,47	0,29	1,6	6,9	0,13
<b>D60CMbSTII</b>	4	1,09	0,56	1,9	15,9	0,29
<b>D60CMbSTII</b>	5	0,44	0,22	2	51,5	0,94
<b>D60CMbSTII</b>	6	0,13	0,06	2,3	1,9	0,03
<b>K63CMbSTII</b>	1	0,83	0,33	2,5	19,4	0,35
<b>K63CMbSTII</b>	2	0,77	0,35	2,2	315,2	3,93
<b>K63CMbSTII</b>	3	/	/	/	/	/
<b>T67CMbSTII</b>	1	0,32	0,16	2	7,4	0,14
<b>T67CMbSTII</b>	2	0,41	0,20	2,1	167,8	3,06
<b>T67CMbSTII</b>	3	/	/	/	/	/

Es ist zu erkennen, dass die ermittelten  $A_{410}/A_{280}$  Verhältnisse der einzelnen **mMbSTII** Fraktionen stark schwanken und zwischen einem Wert von 1,6 und 2,5 liegen. Die unterschiedlichen Werte könnten auf Verunreinigungen der Proben hindeuten bzw. auf die Existenz von **ApoMb**. Es ist jedoch zu beachten, dass die Einführung eines N-terminalen **STII** Tags zur Folge haben könnte, dass ebenfalls **STII** markierte Abbruchfragmente während der Proteinbiosynthese in *E. coli* entstanden sein könnten. Diese kleineren Polypeptidketten könnten ebenfalls an die Säule binden und evtl. nicht während des Waschprozesses von dem **mMbSTII** Mutanten abgetrennt werden und eine Abnahme des  $A_{410}/A_{280}$  Verhältnisses zur Folge haben.

Um die Myoglobinvarianten weiter zu reinigen, wurden die **mMbSTII** Lösungen mit einem Ultrafiltrationsröhrchen (Vivaspin 6, *GE Healthcare*) zentrifugiert, indem die einzelnen Proben mehrmals eingengt und ein Pufferwechsel zu PBS durchgeführt wurde. Die verwendeten Röhrchen besaßen ein Filtersystem mit einer bis zu 10 kDa durchlässigen Filtermembran. Durch diesen Prozess konnte gewährleistet werden, dass Moleküle mit einem Molekulargewicht von weniger als 10 kDa während der Zentrifugation aus den Probelösungen entfernt werden konnten. Anschließend wurden die Proben wiederum mittels UV-Vis Spektroskopie analysiert und die Ergebnisse sind in der Abbildung 85 dargestellt. Betrachtet man die UV-Vis Spektren der zentrifugierten **mMbSTII** Proben, so ist zu erkennen, dass die Myoglobinvarianten alle charakteristischen Absorptionsmaxima des Proteins bei 410 nm (Soretbande) bzw. bei 280 nm (Eigenabsorption der Polypeptide) aufweisen, welches auf eine hohe Reinheit der isolierten Proteine hindeutet.



**Abbildung 85:** UV-Vis Spektren der gereinigten **mMbSTII** Mutanten nach Behandlung mittels Ultrafiltrationsröhrchen.

**Tabelle 17:** Die ermittelten  $A_{410}/A_{280}$  Verhältnisse der gereinigten **mMbSTII** Mutanten nach der Behandlung mittels Ultrafiltrationsröhrchen.

Mutante	$A_{410}$	$A_{280}$	$A_{410}/A_{280}$
<b>K96CMbSTII</b>	0,41	0,15	2,7
<b>D60CMbSTII</b>	0,59	0,22	2,7
<b>K63CMbSTII</b>	0,75	0,28	2,7
<b>T67CMbSTII</b>	1,16	0,43	2,7

Eine weitere wichtige Beobachtung konnte bei den ermittelten  $A_{410}/A_{280}$  Verhältnissen erkannt werden (Tabelle 17). Nach der Zentrifugation mittels des Filtersystems wiesen alle behandelten Proben ein konstantes  $A_{410}/A_{280}$  Verhältnis von 2,7 auf. Die ermittelten Werte lassen die Hypothese zu, dass durch die Filtrationsbehandlung die meisten Verunreinigungen bzw. Abbruchfragmente entfernt werden konnten und die rekombinanten Proteine in einem hohen Reinheitsgrad vorliegen. Um die hohe Reinheit weiter zu belegen, kann ein theoretischer Vergleich des  $A_{410}/A_{280}$  Verhältnisses zu nativen **Mb** hergestellt werden. Vergleicht man den ermittelten Wert von 2,7 mit dem  $A_{410}/A_{280}$  Verhältnis von nativen **Mb** (4,0), so wird eine Abweichung von 32 % erkannt. Die hohe Abweichung kann hauptsächlich durch eine Erhöhung des Absorptionskoeffizient der **mMbSTII** Mutanten ( $\epsilon_{(280\text{ nm})} = 20970\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ ) gegenüber dem nativen **Mb** ( $\epsilon_{(280\text{ nm})} = 15470\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ ) um 26 % erklärt werden, wobei der erhöhte Absorptionskoeffizient vor allem durch die integrierten aromatischen Aminosäuren Trp, His und Phe des **STII** Tags hervorgerufen wird. Der erhöhte Absorptionskoeffizient der **mMbSTII** Mutanten hat unter Berücksichtigung des Lambert Beer'schen Gesetzes theoretisch eine proportionale Erhöhung der Absorption bei 280 nm gegenüber des nativen **Mb** zur Folge, welche bei gleicher Konzentration und Schichtdicke des durchstrahlten Körpers gemessen werden würde. Da die Absorption bei 410 nm durch die eingeführten Cysteine und des zusätzlichen **STII** Tags nicht beeinflusst wird, wurde eine Erniedrigung des  $A_{410}/A_{280}$  Verhältnisses zwischen der gereinigten **mMbSTII** Mutanten und nativen **Mb** um ebenfalls 26 % erwartet. Durch diese Überlegung weichen die gemessenen  $A_{410}/A_{280}$  Verhältnisse gerade einmal um 6 % von der theoretischen Betrachtung ab und belegen eine Reinheit der Mutanten von ca. 94 %. Beachtet man in diesem Zusammenhang ebenfalls, dass die mechanische Belastung der Zentrifugation eine Destabilisierung des Kofaktors hervorrufen kann und etwas **ApoMb** in der Probe vorhanden sein könnte, kann die geringe Abweichung vernachlässigt werden. Aus diesem Grund wurden die gereinigten Proben direkt für weitere Versuche eingesetzt und nicht weiter behandelt. Um für zukünftige

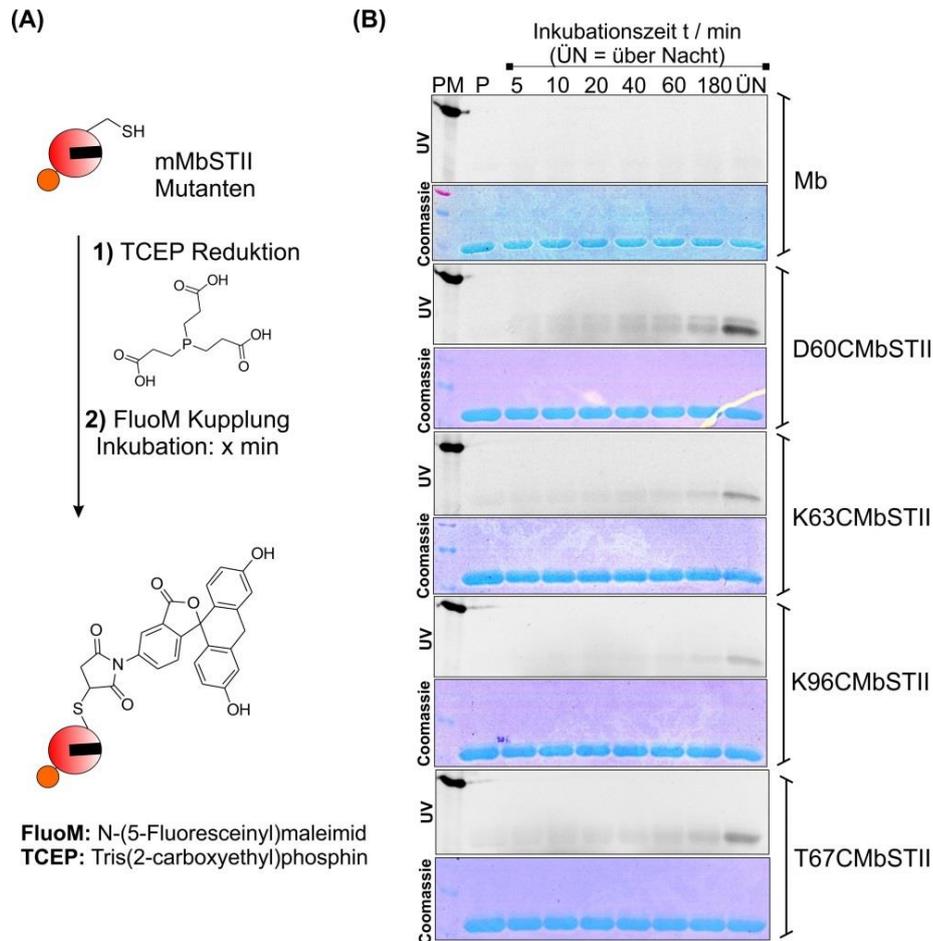
Experimente den Reinheitsgrad weiterhin zu erhöhen, könnten zur Abtrennung mildere Techniken wie z.B. Größenausschlusschromatographie verwendet werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine erfolgreiche Klonierung des **STII** Tags durchgeführt werden konnte und der Tag für eine effiziente Reinigung der **mMbSTII** Mutanten verwendet werden kann. Neben einer hohen Reinheit von ca. 95 % konnte ebenfalls Ausbeuten erzielt werden, welche sich für zukünftige Anwendungen zur Azobenzol-modifizierung verwenden lassen.

In einem nächsten Experiment musste getestet werden, ob durch die Einführung des **STII** Tags die Oberflächenmodifizierung der **mMbSTII** über die Cysteinreste beeinflusst wird. Aus diesem Grund wurde in einem ersten Schritt überprüft, ob sich die **mMbSTII** Oberflächen mittels eines Farbstoffes markieren lassen. Die Ergebnisse sollen im folgenden Kapitel kurz erläutert werden.

#### **3.4.10 Fluorophormodifizierung der StrepTag markierten Myoglobin-Cystein Mutanten**

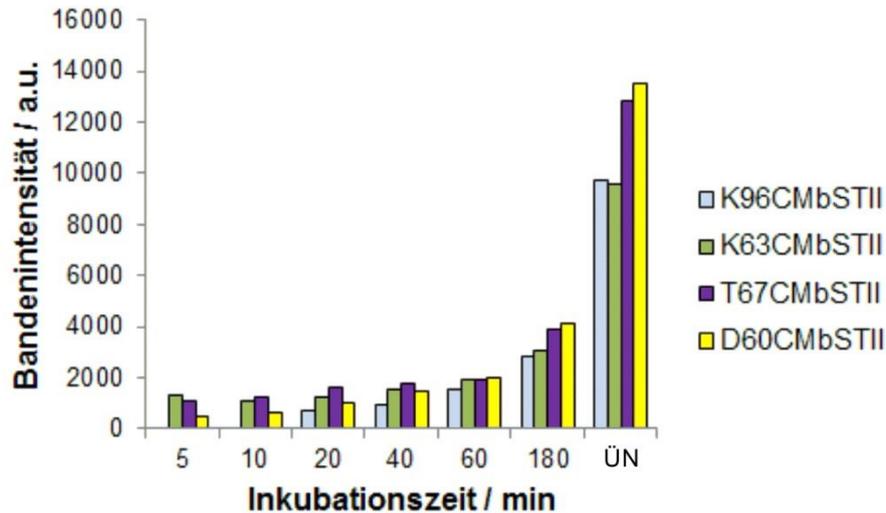
Die Modifizierung der Protein Oberflächen mit einem Fluorophor erfolgte wie bereits im Kapitel 3.4.5 dargestellt. Hierzu wurde wiederum der kommerziell erwerbliche Farbstoff **FluoM** verwendet (Abbildung 86A), um die erfolgreiche Kupplung nach unterschiedlichen Inkubationszeiten mittels analytischer SDS-PAGE zu belegen (Abbildung 86B). Die Gele wurden zunächst mittels UV Bestrahlung und anschließend mittels Coomassie-Blau Färbung detektiert. Als Negativkontrolle wurde natives **Mb** unter gleichen Bedingungen behandelt.



**Abbildung 86:** (A) Schematische Darstellung der **FluoM** Kupplung auf die Proteinoberfläche der gereinigten **mMbSTII** Mutanten. (B) Analytische SDS-PA Gele zur Charakterisierung der erfolgreichen Fluorophorkupplung auf die Oberfläche der **mMbSTII** Mutanten. Die Gele wurden zunächst mittels UV Bestrahlung und anschließend durch Coomassie Blau Färbung visualisiert.

Die SDS-PAGE Charakterisierungen zeigen, dass eine erfolgreiche Kupplung der Farbstoffes **FluoM** auf die **mMbSTII** Oberflächen durchgeführt werden konnte. Bei allen Mutanten kann nach der UV-Bestrahlung eine Bande detektiert werden, welche sich ebenfalls mit Coomassie Blau visualisieren lässt und somit die Existenz eines Protein-Farbstoff-Konjugats belegt. Die selektive Kupplung über die Cysteinreste wird bei der Betrachtung der Negativkontrolle des **Mb** dargelegt, da in diesem Fall keine Banden nach der UV Bestrahlung detektiert werden können.

Da alle Proben unter gleichen Bedingungen behandelt wurden, konnte die Kupplungseffizienz der einzelnen **mMbSTII** Mutanten mittels Densitometrie verglichen werden. Hierzu wurden die gemessenen Bandenintensitäten nach der UV Bestrahlung mittels des Computerprogramms ImageJ durch Graustufenanalyse ausgewertet und miteinander verglichen. Die berechneten Werte sind in Abbildung 87 als Säulendiagramme dargestellt.



**Abbildung 87:** Graustufenanalyse (Densitometrie) der mittels UV-Licht detektierten Bandenintensitäten nach der FluoM Kupplung auf die Oberfläche der **mMbSTII** Mutanten nach unterschiedlichen Inkubationszeiten. ÜN: über Nacht.

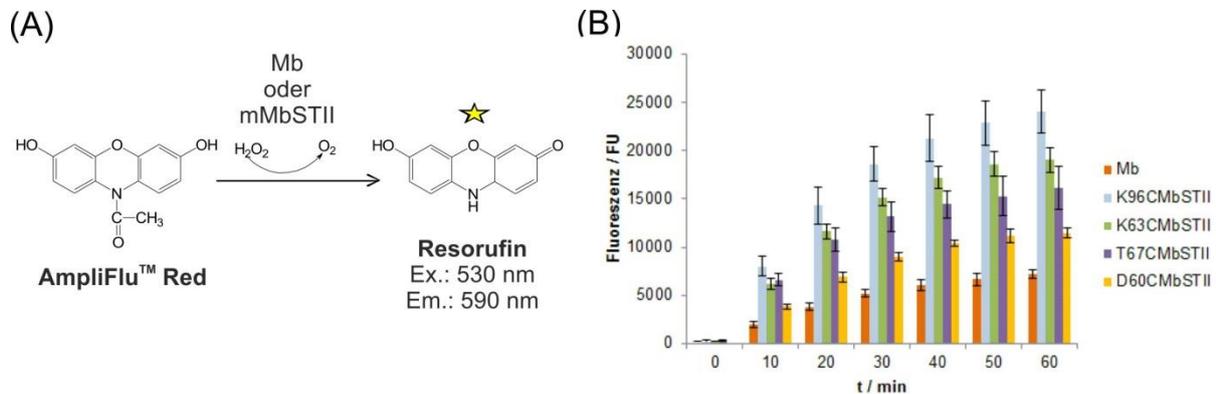
In den Analysen ist zu erkennen, dass bei allen Mutanten die beste Kupplungseffizienz nach einer Inkubation über Nacht erreicht wird, wobei eine Kupplung des Farbstoffs **FluoM** auf die Oberfläche der **D60CMbSTII** Mutante am erfolgreichsten durchgeführt werden kann. Die unterschiedlichen Kupplungseffizienzen **D60CMbSTII** > **T67CMbSTII** > **K96CMbSTII** ≥ **K63CMbSTII** können durch die unterschiedlichen Zugänglichkeiten der Cysteinpositionen auf der Oberfläche begründet werden. Dessen ungeachtet zeigen die Ergebnisse, dass alle **mMbSTII** Mutanten für eine erfolgreiche Oberflächenmodifizierung verwendet werden können. Um eine maximale Ausbeute der Oberflächenkupplung sicherzustellen, sollte für zukünftige Anwendungen eine Inkubationszeit über Nacht gewählt werden.

Neben einer erfolgreichen Modifizierung der Proteinoberflächen sollte getestet werden, ob die **STII** und Cystein Klonierung die Aktivitäten der **mMbSTII** beeinflussen oder sogar auslöschen. Die Aktivitätstests sind im folgenden Kapitel dargestellt.

### 3.4.11 Aktivitätstest der StrepTag markierten Myoglobin-Cystein Mutanten

Für den Aktivitätstest der **mMbSTII** Mutanten wurde das Substrat *AmpliFlu<sup>TM</sup> Red* verwendet. Es wurde eine Endpunktbestimmung durchgeführt, indem die Fluoreszenz über einen Zeitraum von 60 min und in einem Intervall von 1 min pro Messung detektiert wurde. Die Konzentrationsbestimmung der einzelnen **mMbSTII** Varianten erfolgte über die Soret-

Bande bei 410 nm ( $\epsilon(A_{410}) = 171000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) und unter Anwendung des Lambert Beer'schen Gesetzes. Insgesamt wurde für den Aktivitätstest 1 pmol Protein in einem Endvolumen von 100  $\mu\text{L}$  eingesetzt und eine 4fache Bestimmung durchgeführt. Die Ergebnisse sind in der folgenden Abbildung 88 dargestellt.



**Abbildung 88:** Aktivitätstests der **mMbSTII** Mutanten im Vergleich zu nativen Myoglobin (**Mb**). **(A)** Ergebnisse des AmpliFlu™ Assays: Die Umsetzung des Substrates AmpliFlu™ Red zu dem fluoreszierenden Produkt Resorufin kann in Anwesenheit von  $\text{H}_2\text{O}_2$  und den Mutanten **mMbSTII** bzw. von **Mb** bei einer Emissionswellenlänge von 590 nm verfolgt werden, nachdem eine Anregung bei einer Wellenlänge von 530 nm erfolgte. **Endkonzentration der Substanzen in Lösung:** 50  $\mu\text{M}$  Amplex® Red, 1 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  und 10 nM **mMbSTII** bzw. **Mb**.

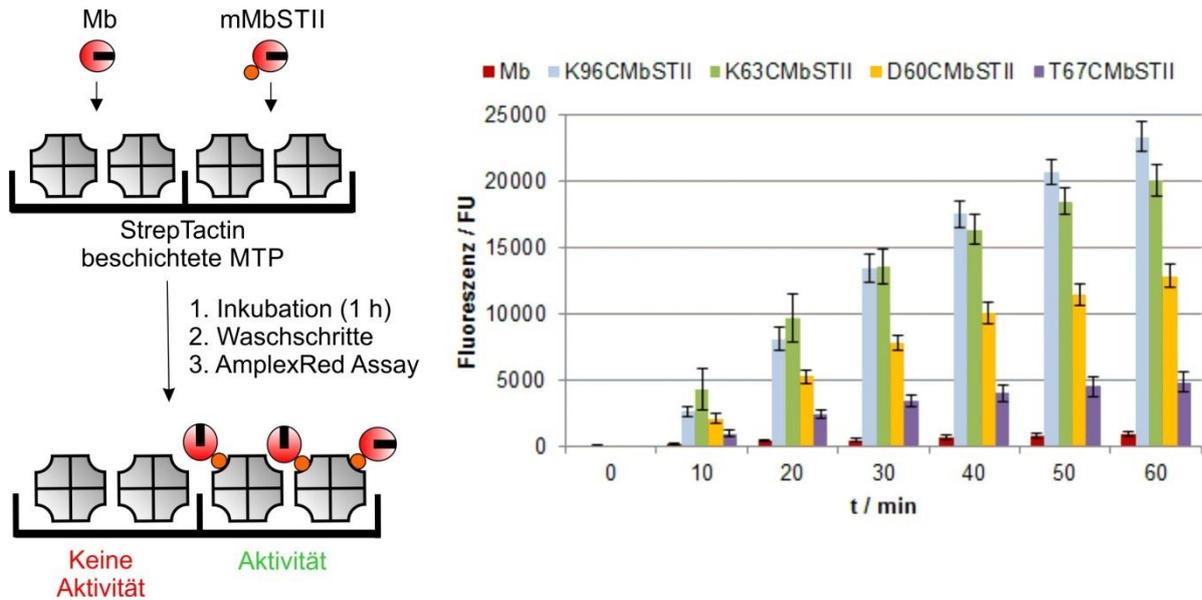
Es ist zu erkennen, dass alle **mMbSTII** Mutanten x-fach höhere Fluoreszenzwerte aufweisen, als das native **Mb**. Nach 60 Minuten kann eine Reihenfolge der gemessenen Signalstärken von **K96CMbSTII** (ca. 3,3fach)  $\geq$  **K63CMbSTII** (ca. 2,6fach)  $>$  **T67CMbSTII** (ca. 2,2fach)  $>$  **D60CMbSTII** (ca. 1,6fach) ermittelt werden. Vergleicht man die gemessenen Fluoreszenzwerte mit den Voruntersuchungen aus Kapitel 3.4.6, so kann beobachtet werden, dass speziell im Fall von **T67CMbSTII** die Messungen stark voneinander abweichen. Während in den Voruntersuchung ein geringerer Aktivität gegenüber nativen **Mb** erkannt werden konnte, zeigt die **T67CMbSTII** Mutante nach der erfolgreichen Reinigung mittels StrepTactin Säulen einen um 2,2fach höheren Fluoreszenzintensität als natives **Mb**. Dies verstärkt die Aussage aus Kapitel 3.4.6, dass die ermittelten Aktivitäten der Voruntersuchungen stark durch die vorhandenen Verunreinigungen beeinflusst wurden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die **mMbSTII** Mutanten eine erhöhte Aktivität gegenüber nativen **Mb** aufweisen und die Mutanten somit für zukünftige Konzeptanwendungen einer Azobenzolkupplung eingesetzt werden können.

Neben einer erfolgreichen Reinigung der **mMbSTII** Mutanten könnte der **STII** Tag weitere Vorteile für bionanotechnologische Anwendung bieten. Wie bereits im Einleitungskapitel 2.5 erläutert, sollten für ein zukünftiges Anwendungskonzept die Azobenzol modifizierten Mutanten zusätzlich mit ssDNA gekuppelt werden, um eine DNA vermittelte Immobilisierung (DDI) zu sichern. Mehrere Modifikationsschritte hätten jedoch zahlreiche Herausforderung mit sich gebracht, speziell beim Erreichen von hohen Ausbeuten der modifizierten Elemente bzw. zur Optimierung der praktischen Durchführungen. Da der **STII** Tag selektiv an Strep Tactin bindet wurde überlegt, den **STII** Tag direkt zur Immobilisierung auf Strep Tactin modifizierten Oberflächen zu verwenden. Eine erfolgreiche Immobilisierung der **mMbSTII** Mutanten würde eine zusätzliche ssDNA Modifikation für zukünftige Anwendung vernachlässigbar machen und unterschiedlichste Konzepte sicherstellen. Speziell im Bereich der Origami Nanostrukturen könnten spezifisch gestaltete DNA Plattformen mit Strep Tactin versehen werden, welches eine Immobilisierung der **mMbSTII** Mutanten in Nanometermaßstab sichern würde<sup>108</sup>. Die Ergebnisse eines Immobilisierungstest sind in dem folgenden Kapitel dargestellt.

#### **3.4.12 Immobilisierung der StrepTag modifizierten Myoglobinmutanten auf StrepTactin modifizierten Oberflächen**

Um zu überprüfen, ob der inklonierte **STII** Tag zur Immobilisierung der **mMbSTII** Mutanten auf Oberflächen nutzen lässt, wurde zunächst die Kavitäten einer Mikrotiterplatte (MTP) mit StrepTactin beschichtet. Das StrepTactin wurde von der Firma *iba-lifescience* erworben und die Modifizierung der MTP erfolgte wie die in Kapitel 3.1.8 beschriebene STV Modifizierung nach AAV 5. Nach der Beschichtung wurden die Kavitäten mit 50 pmol der jeweiligen **mMbSTII** Mutanten für 1 h bei RT inkubiert. Um eine selektive Bindung der Mutanten über den **STII** Tag zu belegen, wurden einzelnen Kavitäten ebenfalls mit dem nativen **Mb** als Negativkontrolle unter gleichen Bedingungen behandelt (Abbildung 89A). Nach der Inkubation wurden die einzelnen Kavitäten mehrmals gewaschen und anschließend ein *AmpliFlu<sup>TM</sup> Red* Aktivitätstest verwendet. Für alle Proben wurde eine vierfache Bestimmung durchgeführt und die Mittelwerte der gemessenen Fluoreszenz gebildet



**Abbildung 89:** (A) Graphische Darstellung der **mMbSTII** Immobilisierung auf StrepTactin beschichteten Mikrotiterplatten (MTP). (B) AmpliFlu™ Assay der immobilisierten **mMbSTII** Mutanten. Der Test erfolgte durch eine 4fach Bestimmung, indem die Aktivität über die Emissionswellenlänge bei 590 nm des gebildeten Resorufins verfolgt wurde.

In Abbildung 89B sind die gemessenen Fluoreszenzwerte in Abhängigkeit der Zeit dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die gemessenen Fluoreszenzwerte der **mMbSTII** Mutanten stark ansteigen, während die Negativkontrolle eine sehr geringe und vernachlässigbare Steigerung aufweist und das native **Mb** somit weitestgehend von den Oberflächen durch Waschprozesse entfernt werden konnte. Die geringen Fluoreszenzwerte der Negativkontrolle lassen sich durch elektrostatische bzw. hydrophobe Wechselwirkung der MTP Oberfläche mit dem nativen **Mb** erklären, welche durch eine nicht vollständig blockierte Oberfläche hervorgerufen worden sein könnte.

Vergleicht man die gemessene Fluoreszenzintensität mit dem Versuch in Lösung aus Kapitel 3.4.11, so ist zu erkennen, dass die ermittelte Reihenfolge von den Werten der Lösungsexperimente abweichen. Ein Grund könnte hier die experimentelle Behandlung der Proben bieten. Die **mMbSTII** Varianten wurden mit einem Desthiobiotin Elutionspuffer von den StepTactin Säulen eluiert (Abbildung 84A). Anschließend wurde die gewonnen Proben mit Ultrafiltrationsröhrchen behandelt und direkt für weitere Experimente verwendet. Die Durchführung könnte eine vollständige Entfernung der Desthiobiotin Moleküle erschwert haben und die Moleküle könnten somit die StrepTactin beschichteten Oberfläche blockieren. Die blockierten Oberflächen können anschließend eine Immobilisierung der Myoglobinvarianten beeinflussen. Für zukünftige Experimente könnten die Proben vorher

dialysiert werden, um eine vollständige Entfernung zu gewährleisten. Nichts desto trotz zeigt dieses Experiment, dass die **mMbSTII** Enzyme aufgrund der detektierten hohen Fluoreszenz gegenüber nativen **Mb** selektiv über den **STII** Tag auf die Strep Tactin beschichtete Oberfläche binden und das Immobilisierungsprinzip für zukünftige Anwendungskonzepte verwendet werden kann.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine erfolgreiche Klonierungsstrategie zur Einführung der Aminosäure Cystein und eines StrepTactin Reinigungstags in den Arbeitskreis etabliert werden konnte. Die **mMbSTII** Varianten konnten in akzeptablen Ausbeuten gereinigt werden und wiesen einen hohen Reinheitsgrad auf. Die Cysteine können gezielt über eine Michael Reaktion mit einem Fluorophor markiert werden und alle Varianten zeigten Aktivität, welches eine zukünftige Modifizierung mit Azobenzolderivaten gewährleistet. Der N-terminale eingefügte **STII** Tag kann zu einer Immobilisierung auf StrepTactin beschichteten Oberflächen verwendet werden und ermöglicht somit neue Strategien, um die späteren Endprodukte auf zum Beispiel StrepTactin modifizierte Origamiplattformen zu immobilisieren<sup>108, 109</sup>, ohne das zusätzliche DNA Konjugationen benötigt werden.

In einem letzten Kapitel soll dargestellt werden, wie die eingeführte Klonierungsstrategie ebenfalls dazu verwendet werden kann, Fusionsproteine herzustellen.

### **3.4.13 Klonierung eines Fusionsproteins mittels rekombinationsvermittelter Strategie**

Metallothioneine (**MT**) sind kleine Proteine mit einer Größe zwischen 6 und 8 kDa, welche je nach Klasse aus bis zu 33 % Cysteinresten bestehen<sup>199</sup>. Aufgrund des hohen Cysteinanteils eignen sie sich hervorragend dazu mit unterschiedlichsten Metallen zu assoziieren und können somit zur Immobilisierung von MT-Fusionsproteinen auf Nanopartikeloberflächen verwendet werden, ohne das chemische Modifizierung an einem Zielprotein durchgeführt werden müssten.<sup>200</sup>

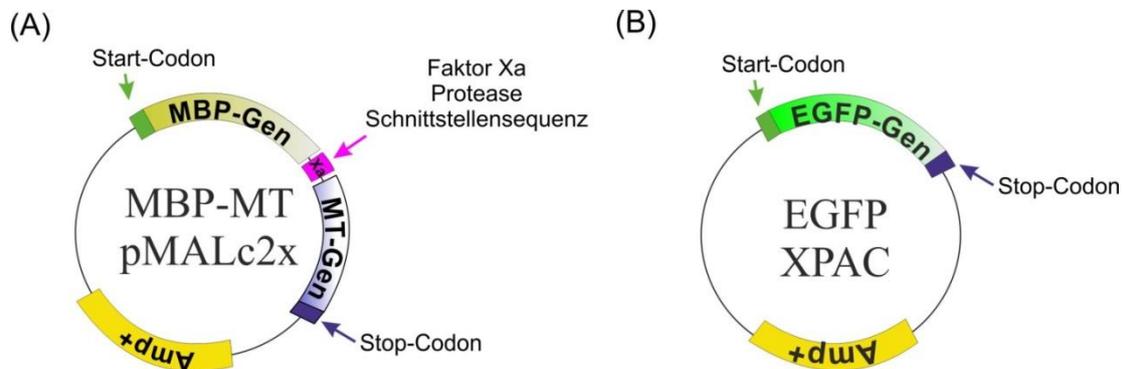
Für zukünftige Anwendung sollte für die Arbeitsgruppe Fruk die Grundlage gelegt werden, Fusionsproteine bestehend aus **MT** und einem Protein von Interesse (POI) schnell und kostensparend zu klonieren. Als Modell sollte das **MT** mit einem EGFP (engl.: „*Enhanced Green Fluorescence Protein*“) fusioniert werden.

In diesem Kapitel wird nun erläutert, wie ein Expressionsvektor ohne zeitaufwendige Ligationsprozesse hergestellt werden kann, indem einzelne DNA Fragmente mittels PCR gezielt mit homologen Endsequenzen flankiert werden. Die Endsequenzen der einzelnen

Fragmente werden von *E. coli* erkannt, gezielt zusammengebaut und zu einem Expressionsvektor zirkularisiert.

Zur Klonierung eines **MT-EGFP** Fusionsproteins standen dem Arbeitskreis zwei unterschiedliche Plasmide zur Verfügung. Das erste Plasmid bestand aus einem **pMALc2x** Rückgrat mit einem Ampicillin Resistenzgen und wurden zur Expression eines Fusionsproteins bestehend aus einem Maltose bindenden Protein (**MBP**) und einem **MT** verwendet (Abbildung 90A). Das **MBP** wurde bereits in der Arbeitsgruppe zur selektiven Reinigung des **MBP-MT** Fusionsproteins mit Hilfe von Amylose-Säulenchromatographie genutzt.<sup>200</sup> Die beiden genetischen Sequenzen des Fusionsproteins sind durch eine kurze genetische Sequenz (engl.: „*Spacer*“) miteinander verbunden, welche die genetischen Informationen des sogenannten Protease Xa Spaltungsfaktors trägt. Der Xa Faktor enthält eine spezifische Aminosäureerkennungssequenz (Ile-Glu-Gly-Arg) für die Faktor Xa Protease und kann nach der Reinigung des Proteins zur Abspaltung des **MBP** vom **MT** verwendet werden. Das Plasmid wurde in diesem Kapitel als **MBP/MT-pMALc2x** bezeichnet.

Das zweite Plasmid wurde zur Expression des EGFP verwendet und bestand aus einem **XPAC** Rückgrat mit einem integrierten Ampicillin Resistenzgen und ist in Abbildung 90B graphisch dargestellt. Das Plasmid wurde im vorliegenden Kapitel als **EGFP-XPAC** benannt.



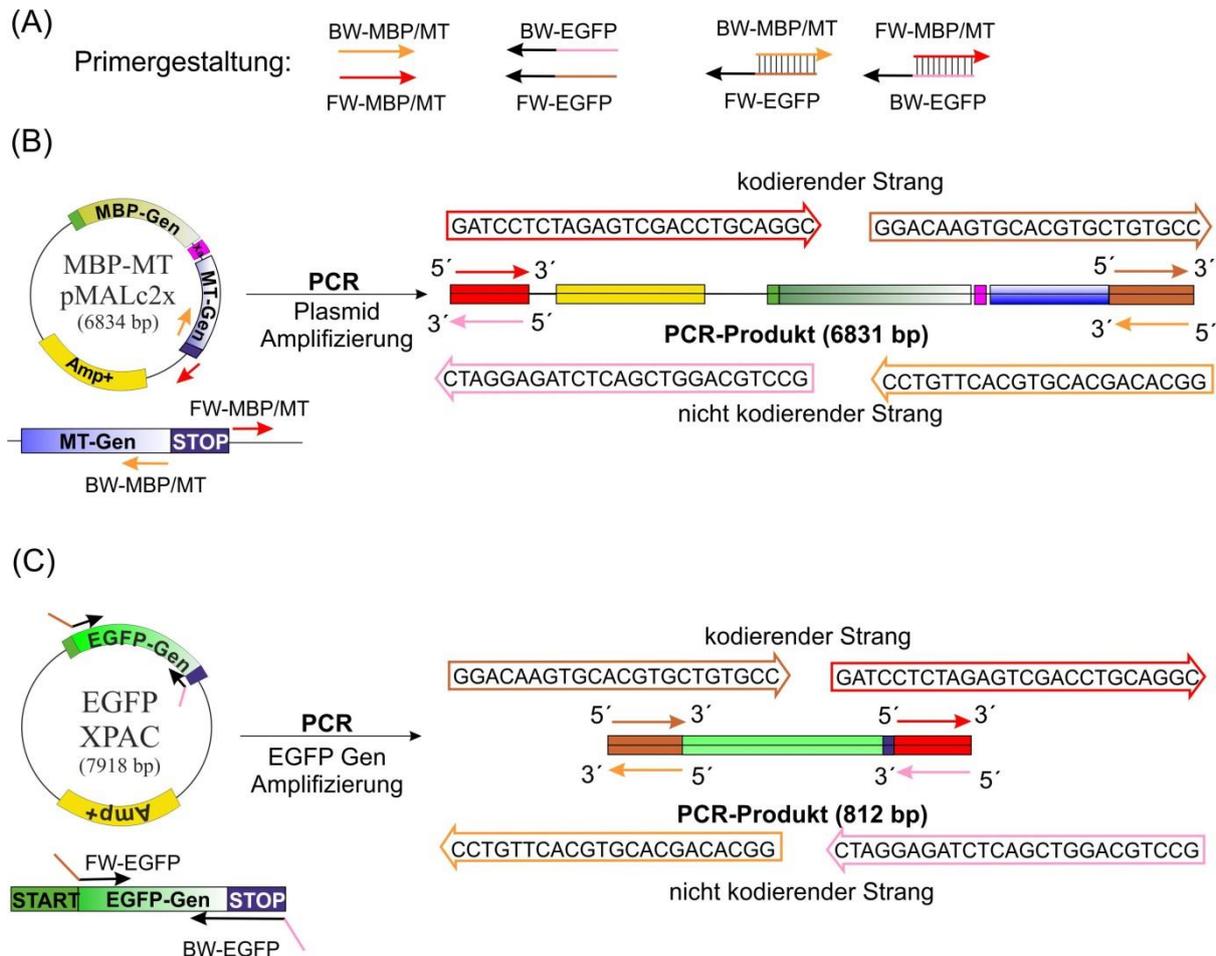
**Abbildung 90:** Schematische Darstellung der Plasmidkarten, welche als Templat zur Herstellung eines Fusionsproteins verwendet wurden. (A) Das Plasmid **MBP/MT-pMALc2x** und (B) das Plasmid **EGFP-XPAC**. Die wichtigsten Bereiche der Plasmide sind farblich hervorgehoben. **MBP:** Maltose bindendes Protein Gen; **Xa:** Faktor Xa Protease Schnittstellensequenz; **MT:** Methallothionein Gen; **EGFP:** Grün fluoreszierendes Protein Gen; **Amp<sup>+</sup>:** Ampicillin Resistenzgen. Die Startsequenz ist grün dargestellt worden, während die Stopsequenz lila markiert worden ist.

Beide Plasmide wurden zur Amplifizierung zweier PCR Fragmente verwendet. Zunächst wurde das Plasmid **MBP-MT-pMALc2x** mittels des Primerpaares **FW-MBP/MT** und **BW-**

**MBP/MT** linearisiert. Die Hybridisierungsbereiche der Primer wurden so gewählt, dass während der PCR das Triplet Stop Codon des MT-Gens entfernt wurde (vgl. Abbildung 91A und Abbildung 91B). Die Schmelztemperatur der Primer wurde über ihre Sequenzlänge von 25 Basen (**FW-MBP/MT**) bzw. 22 Basen (**BW-MBP/MT**) bestimmt und einer Schmelztemperatur von 64 °C angepasst. Das Primerpaar kann zur vollständigen Amplifizierung des Plasmids verwendet und zusätzlich das Stop Codon des MT-Gens entfernt werden.

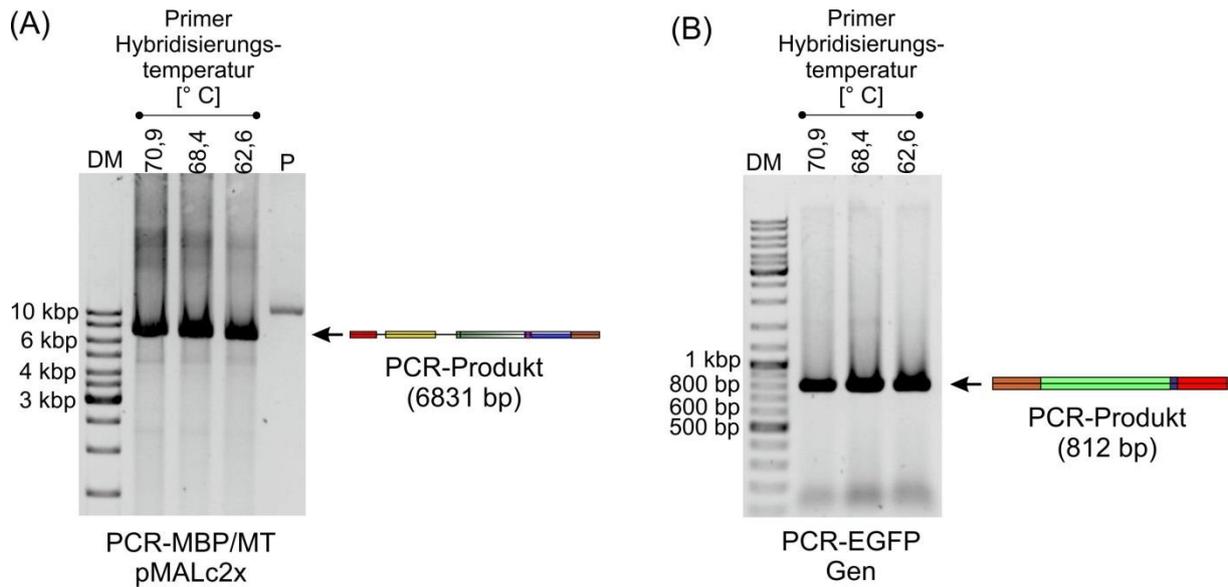
Um das genetische Leseraster des EGFP-Gens aus dem **EGFP-XPAC** Plasmid zu amplifizieren, wurden die zwei spezifisch Primer **FW-EGFP** und **BW-EGFP** gestaltet (vgl. Abbildung 91A und Abbildung 91C). Die Primer bestanden aus einem komplementären Bereich zum EGFP Gen und einem 5' angefügten Überhang. Der komplementäre Bereich des **FW-EGFP** Primers wurde direkt nach dem Startcodon des EGFP Leserasters lokalisiert und in 3'-Richtung soweit verlängert, bis die Schmelztemperatur mit dem EGFP Gen ( $T_M(\text{EGFP})$ ) 64 °C betrug. Anschließend wurde das 5'-Ende verlängert und die komplementäre Sequenz des **BW-MBP/MT** Primers als Überhang in die Primergestaltung integriert.

Der komplementäre Bereich des **BW-EGFP** Primers wurde ausgehend vom Stopcodon des EGFP Gens in 3'-Richtung soweit verlängert, bis die  $T_M(\text{EGFP})$  ebenfalls 64 °C betrug, um einen kontrollierten Ablauf der PCR zu gewährleisten. Anschließend wurde als Überhang die komplementäre Sequenz des **FW-MBP/MT** Primers integriert. Durch die spezifische Primerpaargestaltung wurde gewährleistet, dass das EGFP Leseraster ohne Startcodon amplifiziert werden konnte und die Endsequenzen des EGFP Gens zusätzlich mit homologen 3' bzw. 5' -Endsequenzbereichen zum amplifizierten **MBP-MT-pMALc2x** PCR Produkt modifiziert wurden. Die homologen Sequenzbereiche des EGFP PCR Produkts zum **MBP-MT-pMALc2x** PCR Produkt sind in Abbildung 91 als kolorierte Pfeile dargestellt und deren homologen Sequenzen angegeben.



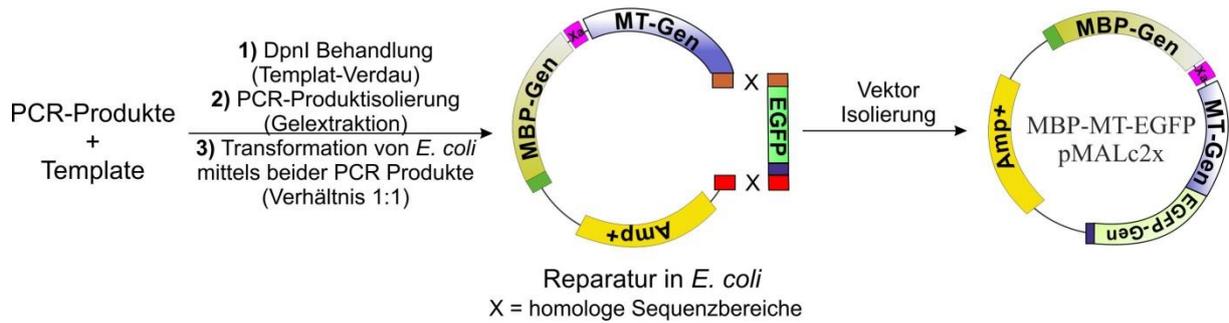
**Abbildung 91:** (A) Schematische Darstellung der Primergestaltung zur PCR Amplifizierung des (B) **MBP-MT-pMALc2x** Plasmids mittels der Primerpaare **FW-MBP/MT** und **BW-MBP/MT** bzw. (C) des Leserasters des EGFP Gens mittels der Primerpaare **FW-EGFP** und **BW-EGFP**. Die Primer sind als Pfeile dargestellt, wobei der Pfeilursprung das 5'- bzw. die Pfeilspitze das 3'-Ende repräsentiert.

Zur Amplifizierung des **MB-MT-pMALc2x** PCR Produktes wurde das PCR Protokoll aus Kapitel 3.4.3 (Tabelle 13, Seite 134) verwendet und insgesamt wurden drei unterschiedliche Primerhybridisierungstemperaturen getestet. Zur Amplifizierung des modifizierten EGFP Leserasters wurde das PCR-Protokoll leicht angepasst, indem lediglich eine kürzere Elongationszeit von 15 s gewählt wurde. Die PCR Produkte wurden mittels analytischer Agarosegelelektrophorese charakterisiert und die Ergebnisse sind in Abbildung 92 dargestellt. Die Ergebnisse zeigen, dass die Durchführung erfolgreich verlief, da sowohl das 6831 bp lange **MBT-MT-pMALc2x** (Abbildung 92A) als auch das 812 bp lange modifizierte EGFP PCR-Produkt nach der Ethidiumbromidfärbung detektiert werden konnte (Abbildung 92B).



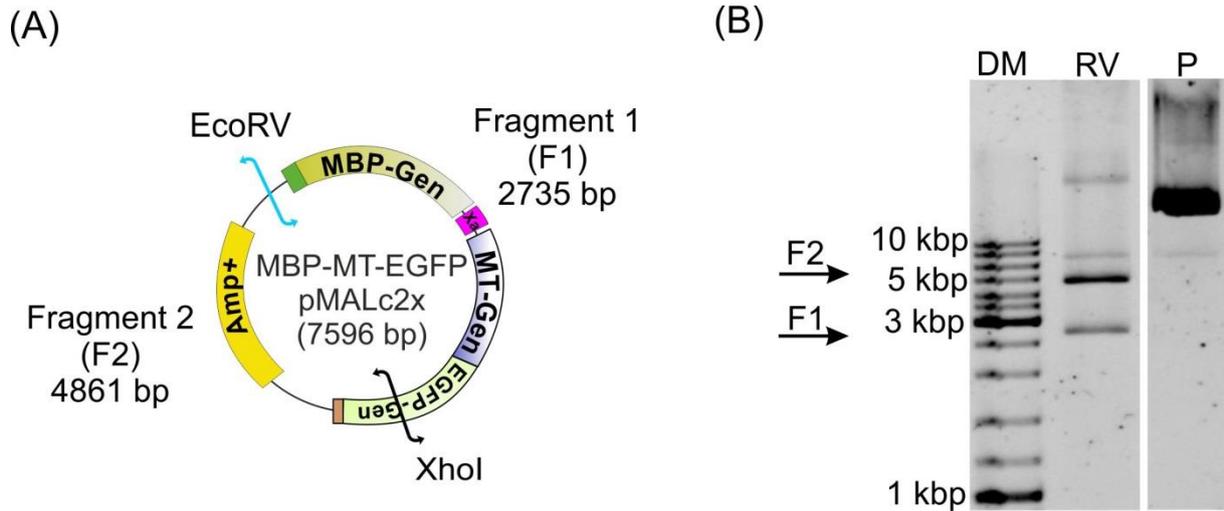
**Abbildung 92:** Analytische Agarosegele zur Charakterisierung des (A) linearisierten **MBP-MT-pMALc2x** bzw. (B) EGFP PCR Produktes. **Konditionen:** 1 % Agarose, 200 V; **Laufpuffer:** 1x TBE-Puffer; **Färbung:** Ethidiumbromid.

In einem nächsten Schritt wurden die PCR-Produkte isoliert, indem die Plasmidtemplate mittels DpnI verdaut und anschließend eine Gelextraktion durchgeführt wurde. Die Konzentration der PCR-Produkte wurde spektrometrisch bestimmt und eine Mixtur aus beiden PCR Produkten zusammen pipettiert (Verhältnis 1:1, DNA Menge 100 ng). Die Mixtur wurde dazu verwendet *E. coli* DH5 $\alpha$  Bakterienzellen mittels Hitzeschock zu transformieren. Zur Selektion wurden die transformierten Bakterienzellen auf Ampicillin Agar-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Mit diesem Schritt wurde überprüft, ob die Bakterienzellen aufgrund der vorhandenen homologen Sequenzbereiche der PCR Produkte das modifizierte EGFP PCR-Produkt in den **MBP-MT-pMALc2x** Vektor durch Reparaturmechanismen einbauen und zu einem Vektor zirkularisieren können (braune und rote Markierung in Abbildung 93). Somit könnte ein Expressionsvektor gewonnen werden, welcher die genetischen Informationen des **MT-EGFP** Fusionsproteins trägt. Der Vektor wurde im Folgenden als **MBP/MT/EGFP-pMALc2x** bezeichnet.



**Abbildung 93:** Schematische Darstellung der Zirkularisierung des **MBP-MT pMALc2x** und modifizierten EGFP PCR-Produktes in *E. coli* Bakterienzellen. Die homologen Bereiche sind jeweils rot bzw. braun markiert und zusätzlich mit einem Kreuz markiert worden.

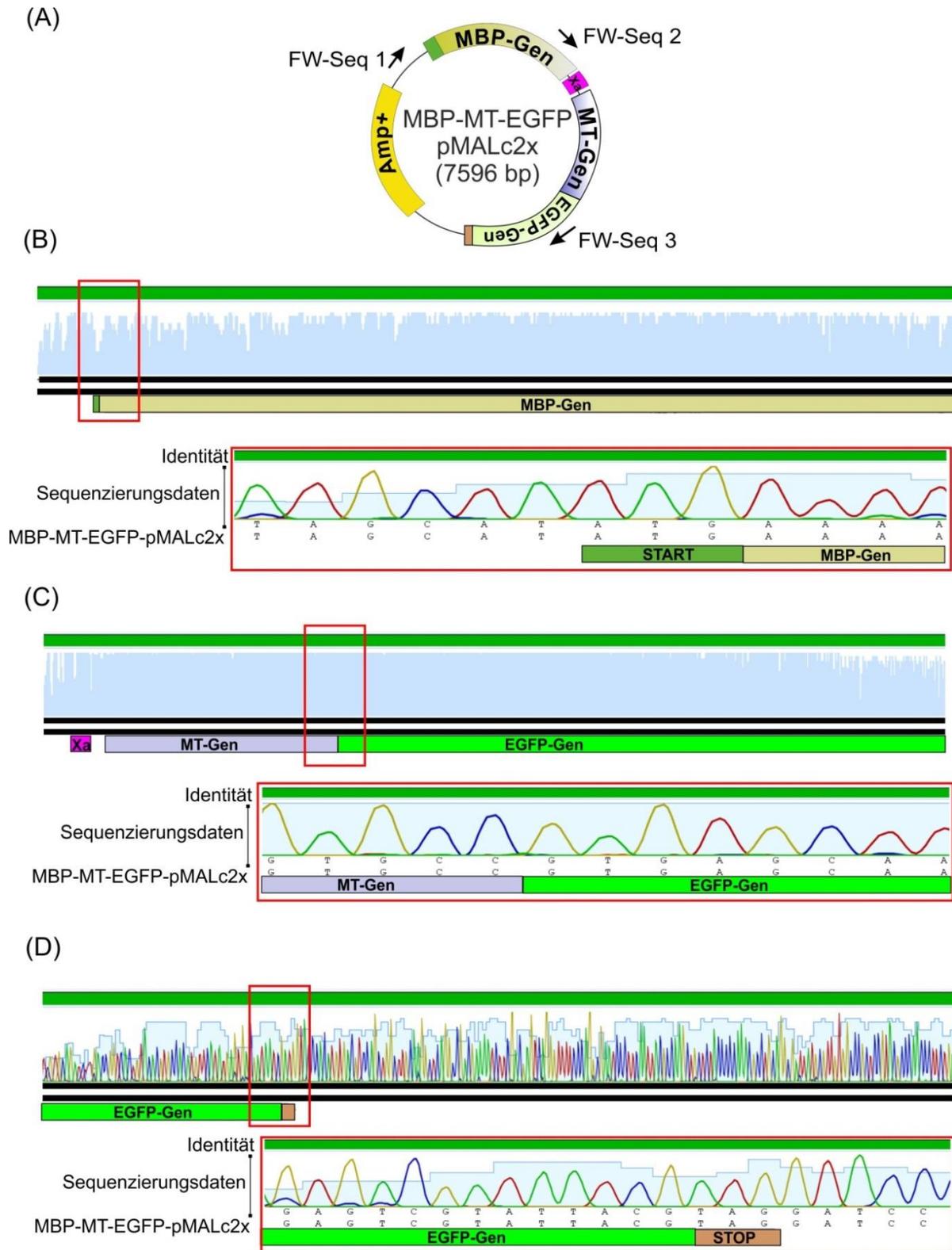
Nach der Inkubation wurden einzelne Kolonien auf den Agarplatten erkannt und die Plasmide der einzelnen Kolonien isoliert. Anschließend wurde in einem ersten Experiment ein Kontrollverdau der isolierten Plasmide mittels der Restriktionsenzyme *EcoRV* und *XhoI* durchgeführt. Beide Restriktionsenzyme schneiden das **MBP-MT-EGFP-pMALc2x** Plasmid an einer spezifischen Erkennungssequenz, wobei die Schnittstellen-positionen in Abbildung 94A graphisch dargestellt worden sind. Während das Restriktions-enzym *EcoRV* kurz vor dem **MBP** Gen schneidet, verdaut das *XhoI* Enzym das Plasmid spezifisch innerhalb des eingeführten **EGFP** Gens. Ein Verdau des Plasmids mit beiden Enzymen würde somit das **MBP-MT-EGFP-pMALc2x** Plasmid in zwei Fragmente teilen, welche eine Größe von 2735 bzw. 4861 bp. aufweisen würden. Zur Durchführung wurden 100 ng des isolierten Plasmids mit beiden Restriktionsenzymen versetzt und der Verdau mittels analytischer Agarosegelelektrophorese charakterisiert (Abbildung 94B).



**Abbildung 94:** (A) Schematische Darstellung der Schnittstellenpositionen der EcoRV bzw. XhoI Restriktionsenzyme innerhalb des **MBP-MT-EGFPpMALc2x** Plasmids. (B) Analytisches Agarosegel des verdauten **MBP-MT-EGFPpMALc2x** Plasmids mittels der Restriktionsenzyme EcoRV und XhoI. **DM:** 10 kbp DNA Marker; **RV:** Restriktionsverdau nach Inkubation mit EcoRV und XhoI; **P:** Isoliertes **MBP-MT-EGFP-pMALc2x** Plasmid. **Konditionen:** 1 % Agarose, 200 V; **Laufpuffer:** 1x TBE-Puffer; **Färbung:** Ethidiumbromid.

Bei der Betrachtung des Agarosegels kann erkannt werden, dass insgesamt vier Banden nach dem Restriktionsverdau (RV) auftreten. Die Bande weit über 10 kbp kann dem nicht verdauten **MBP-MT-EGFP-pMALc2x** Plasmid (P) zugeordnet werden, während die zweite Bande bei knapp 8 kbp das einfach geschnittene **MBP-MT-EGFP-pMALc2x** Plasmid (7596 bp) widerspiegelt. Die letzten beiden Banden bei knapp unter 3 kbp bzw. 5 kbp repräsentieren die erwarteten Fragmente F1 (2735 bp) und F2 (4861 bp) und belegen somit, dass der Verdau erfolgreich durchgeführt werden konnte. Die Ergebnisse lassen Aussage zu, dass die beiden PCR Produkte erfolgreich über ihre homologen Endsequenzen zusammengeführt, zirkularisiert und das EGFP Gen erfolgreich eingebaut wurde.

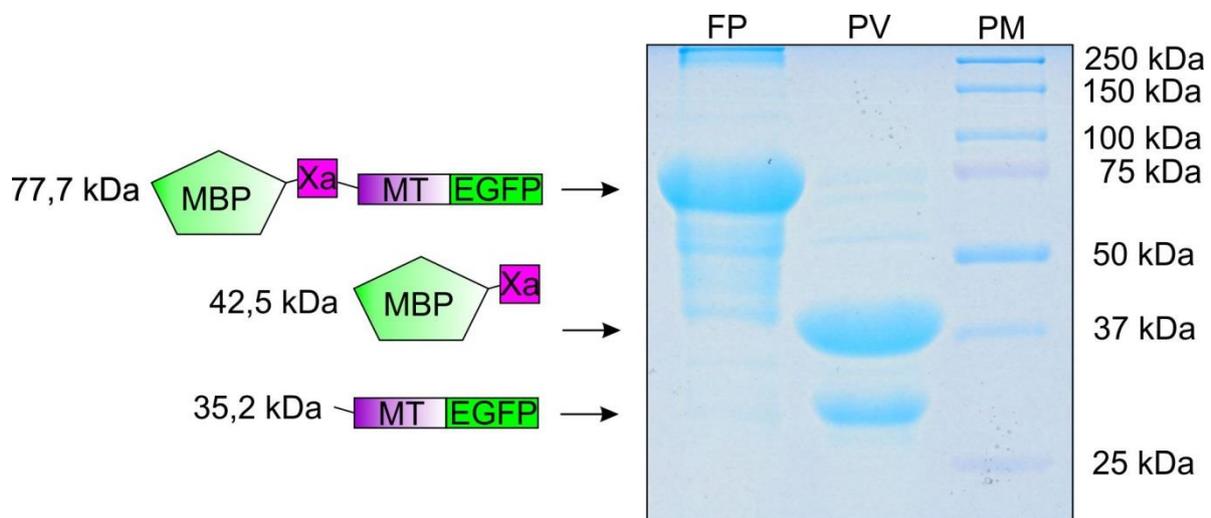
Für eine genauere Analyse wurde eine Sequenzierung des isolierten Plasmids mittels der Firma *GATC* durchgeführt. Zur Sequenzierung wurden insgesamt drei Sequenzierungsprimer verwendet, welche als **FW-Seq1**, **FW-Seq2** und **FW-Seq3** bezeichnet wurden und deren Hybridisierungspositionen auf dem **MBP-MT-EGFP-pMALc2x** Plasmid in Abbildung 95A graphisch dargestellt worden ist. Zum Vergleich der Sequenzierungsdaten wurde eine theoretische Vektorkarte des **MBP-MT-EGFP-pMALc2x** mittels der Computerprogramms *pE-A Plasmid Editor v2.0.47* erstellt und unter Zuhilfenahme der Software *Genious* ein Abgleich der Daten durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 95B - C dargestellt. Für eine genauere Betrachtung wurden die rot markierten Bereiche der jeweiligen Abgleiche nochmals in den einzelnen Abbildungen vergrößert dargestellt.



**Abbildung 95:** (A) Graphische Darstellung der Hybridisierungspositionen der **FW-Seq1**, **FW-Seq2** und **FW-Seq3** Sequenzierungsprimer auf dem **MBP-MT-EGFP-pMALc2x** Plasmid und der Abgleich der Sequenzierungsdaten des **FW-Seq1** (B), **FW-Seq2** (C) und **FW-Seq3** (D) Primers mit der theoretisch ermittelten Sequenz des **MBP-MT-EGFP-pMALc2x**. Der Abgleich erfolgte unter Zuhilfenahme des Computerprogramms *Genious*. Eine hundertprozentige Übereinstimmung der Sequenzen ist durch ein grünes Balkenidentitätsdiagramm (Identität) dargestellt.

Der Abgleich Sequenzierungsdaten zeigt, dass eine hundertprozentige Übereinstimmung mit der theoretisch ermittelten Sequenz vorliegt und die Klonierung somit erfolgreich verlief. Die Übereinstimmung ist an dem grünen Balkenidentitätsdiagramm (Identität) zu erkennen. Mutationen oder nicht übereinstimmende Sequenzen wären durch Lücken innerhalb der Identität dargestellt, können jedoch nicht wahrgenommen werden. Speziell die Sequenzierungsdaten des **Seq2** Primers (Abbildung 95C) belegen, dass sowohl das EGFP Gen vorliegt als auch das Stopcodon des MT Gens bzw. das Startcodon des EGFP Gens mittels der angewandten Klonierungsmethode erfolgreich entfernt werden konnte. Die Sequenzierungsdaten des **Seq3** Primers (Abbildung 95C) belegen ebenfalls die Anwesenheit der genetischen Informationen des EGFP Gens und zeigen, dass das 3'-Ende erfolgreich in das Plasmid eingeführt wurde. Sowohl das Stop Codon als auch die theoretisch richtige Sequenzabfolge können in diesem Rekombinationsbereich erkannt werden.

Das Plasmid wurde anschließend von Frau Dr. Kendziora (Centrum für funktionelle Nanostrukturen, KIT) zur Expression des **MBP-MT-EGFP** Fusionsproteins verwendet und das Protein konnte erfolgreich mittels Amylose-Säulenchromatographie gereinigt werden (Daten nicht gezeigt). Zur genaueren Charakterisierung wurde das **MBP-MT-EGFP** ebenfalls mittels der Xa Faktor Protease verdaut, um das **MBP** von den **MT-EGFP** abzuspalten. Die Abspaltung wurde mittels SDS-PAGE charakterisiert und ist in Abbildung 96 dargestellt.



**Abbildung 96:** Analytische SDS-PAGE zur Charakterisierung des gereinigten **MBP-MT-EGFP** Fusionsproteinverdaus mittels der Faktor Xa Protease. **FP:** **MBP-MT-EGFP** Fusionsprotein, **PV:** Proteaseverdau des **MBP-MT-EGFP** Fusionsproteins mittels der Faktor Xa Protease, **PM:** Proteinmarker.

Die Ergebnisse der SDS-PAGE Charakterisierung zeigt, dass die Abspaltung des **MBP** von dem **MT-EGFP** Fusionsprotein erfolgreich durchgeführt werden konnte (Abbildung 96, PV). Es können alle erwarteten Proteinfragmentgrößen nach der Coomassie Blau Färbung erkannt werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die angewandte Klonierungsmethode erfolgreich zur Herstellung von Fusionsproteinen eingesetzt werden kann und somit eine vielversprechende Technik zur Herstellung von Fusionsproteinen in den Arbeitskreis etabliert werden konnte. Im Gegensatz zu herkömmlichen ligationsabhängigen Methoden können hierbei Kosten und Zeit gespart werden, welches eine schnelle und effektive Herstellung von Fusionsproteinen sicherstellt.

## **4 Zusammenfassung und Ausblick**

Die Bionanotechnologie hat sich in den letzten Jahrzehnten rasant entwickelt und ist innerhalb wissenschaftlicher Disziplinen zu einem eigenständigen Forschungsgebiet herangewachsen. Das Hauptmerkmal, die natürlichen Eigenschaften der Biomoleküle zu kombinieren bzw. zu manipulieren, erschloss den Weg zu vollständig neuen Konzeptionen, welche interessante und völlig neue Anwendungen erzeugten.<sup>5-7, 27, 31, 41, 96, 101, 103, 121, 136</sup> Die Kombinationen unterschiedlichster Biomoleküle erlaubt eine Vielfalt an Vereinigungen unterschiedlichster Eigenschaften, deren theoretische Funktionen weitestgehend unendlichen zu sein scheinen.

Die Konstruktion von Protein-DNA Konjugaten zum Beispiel brachten neue semisynthetische Spezies hervor, welche neue Eigenschaften trugen und die Grundlagen zu völlig neuen Anwendungsgebieten ermöglichten, wie zum Beispiel der DNA Microarraytechnologie.<sup>70</sup> Der Aufbau von hoch sensitiven Detektionschips<sup>70, 201</sup>, wie zum Beispiel der iPCR<sup>17, 53</sup>, fanden im Laufe der Zeit nicht nur Anwendungen in der Grundlagenforschung, sondern ebenfalls in der Industrie. (Bio-)Molekül-DNA Konjugate bilden meistens den Grundbaustein solcher Systeme und ihre Bereitstellung ist vom hohen Interesse. Neue Konjugationsstrategien können somit die Herstellung unterschiedlichster semisynthetischer Spezies gewährleisten und die Erforschung neuer Strategien zur Kupplung von Enzymen mit DNA war einer der Schwerpunkte dieser Arbeit.

So wurde in einem ersten Projekt erstmals ein kurzer DNA Einzelstrang erfolgreich mit einem Photoenolderivat modifiziert (vgl. Kapitel 3.1).<sup>151</sup> Der modifizierte DNA Strang konnte erfolgreich dazu eingesetzt werden, ein mit Maleimid funktionalisiertes Myoglobin über eine lichtgesteuerte Cycloaddition selektiv und kovalent zu binden. Das Konjugat konnte weiterhin erfolgreich über eine DNA vermittelte Immobilisierung (DDI) auf Oberflächen gebunden werden und zeigte eine höhere Aktivität, als das native Myoglobin.

Eine lichtgesteuerte Bindungsstrategie erweitert das Repertoire beachtlich. Lichtgesteuerte Reaktionen sind meist mild, da sie keine chemischen Katalysatoren benötigen und können zeitlich und räumlich exakt gesteuert werden.<sup>120, 121</sup> Speziell zur Dekoration von Oberflächen<sup>154</sup> in der Microarraytechnologie bzw. DNA Nanostrukturen<sup>7</sup> könnten derartige Strategien eine breite Anwendung finden.

Ein zweites Projekt konzentrierte sich auf die Modifizierung der natürlichen Aminosäure Tyrosin. Hierzu konnten drei bifunktionelle Crosslinker hergestellt werden, welche eine Konjugation unterschiedlichster DNA Stränge über Tyrosine an die Proteinoberfläche von

Myoglobin bzw. Streptavidin ermöglichten (vgl. Kapitel 3.2).<sup>202</sup> Die Crosslinker waren mit der Azodicarbonylverbindung 4-Phenyl-1,2,4-triazolin-3,5-dion (**PTAD**) als hoch reaktives Elektrophil versehen, welches ermöglicht verschiedene Peptide und Proteine innerhalb von Minuten über Tyrosine zu modifizieren.<sup>165, 166</sup> Weiterhin wurden die jeweiligen Crosslinker mit einer zweiten funktionellen Gruppen ausgestattet. Eine Maleimid Gruppe konnte erfolgreich zur Kupplung von Thiol-DNA über eine Michael-Reaktion verwendet werden. Weiterhin konnten die funktionellen Gruppen Azid bzw. Cyclooctin zur Kupplung einer Alkin-DNA bzw. Azid-DNA über einer Kupfer katalysierte- bzw. Kupfer freie spannungsvermittelte Cycloaddition eingesetzt werden. Somit konnten insgesamt 6 Streptavidin- bzw. 4 Myoglobin-DNA Konjugate erfolgreich isoliert und charakterisiert werden, wobei eine Kupfer katalysierte Cycloaddition bei dem Modellprotein Myoglobin nicht erfolgreich durchgeführt werden konnte. Speziell im Fall des Myoglobins konnte eine höhere Regioselektivität erreicht werden, da das Protein Myoglobin nur zwei Tyrosine in der Nähe des aktiven Zentrum aufweist. Eine Konjugation in der Nähe des aktiven Zentrums hatte eine erhebliche Aktivitätssteigerung gegenüber nativen Myoglobin zur Folge, welche bereits in älteren Publikationen nachgewiesen werden konnte.<sup>42, 46</sup> Zusätzlich konnten die Myoglobin-DNA Konjugate erfolgreich mittels einer DNA vermittelten Immobilisierung auf Oberflächen fixiert werden.

Ein drittes großes Projekt konzentrierte sich auf die Herstellung einiger Grundbausteine zum Aufbau eines lichtschtbaren Myoglobin-Bioreaktors (vgl. Kapitel 2.5). Hierzu wurde zunächst die DNA Origamitechnik in den Arbeitskreis etabliert und es konnte eine rechteckige planare Origamistruktur gestaltet und charakterisiert werden (vgl. Kapitel 3.3).<sup>103</sup> Die Nanostruktur wurde mit Fängeroligonukleotide beschichtet und es konnten erste Ergebnisse für eine erfolgreiche Immobilisierung von Myoglobin-DNA Konjugaten erreicht werden. Die Origamitechnik erlaubt eine Immobilisierung von Protein-DNA Konjugaten in Nanometer-Präzision und kann somit einen kontrollierten Aufbau des lichtschtbaren Bioreaktors für zukünftige Anwendungen sicherstellen.

Für eine zukünftige Kupplung fotoaktiverbarer Gruppen an das Protein Myoglobin wurde eine rekombinationsvermittelte Klonierungsstrategie in den Arbeitskreis etabliert (vgl. Kapitel 3.4). Die Strategie beruhte auf ein weiterentwickeltes Konzept, welches bereits in der Vergangenheit erfolgreich zur Klonierung von Expressionsvektoren und zur Herstellung von langen DNA Einzelsträngen eingesetzt werden konnte.<sup>169</sup> Es konnten vier unterschiedliche Cystein-Myoglobin Mutanten erfolgreich kloniert werden und die Cysteinreste in gezielten

Abständen zum aktiven Zentrum positioniert werden (vgl. Kapitel 3.4.3). Um eine erhöhte Ausbeute der Myoglobinvarianten zu erhalten und um die Reinheit der exprimierten Proteine zu erhöhen, konnte das Klonierungskonzept ebenfalls zur Einführung von Reinigungstags verwendet werden (vgl. Kapitel 3.4.8). Durch den Einsatz dieser Methode konnten somit eine schnelle und kostengünstige Methoden etabliert werden, welche eine Klonierung rekombinanter Proteine im Gegensatz zu herkömmliche Ligationsmethoden<sup>171-173</sup> vereinfachte.

Als Zusatz wurde die Klonierungsstrategie ebenfalls zur Herstellung von Fusionsproteinen verwendet (vgl. Kapitel 3.4.13). Auch in diesem Fall konnte die Klonierung eines EGFP-Metallothionin Fusionsproteins erfolgreich durchgeführt werden und somit eine ligationsunabhängige Strategie etabliert werden. Der Einsatz dieses Konzeptes sollte somit den Zugang zu Fusionsproteinen für zukünftige Anwendungen erleichtern.

## **5 Experimenteller Teil**

### **5.1 Chemikalien und Lösungsmittel**

Alle verwendeten Chemikalien und Lösungsmittel wurden (soweit nicht anders vermerkt) von der Firma *Sigma-Aldrich*, *Merck* oder *Carl Roth* bezogen und ohne weitere Reinigungsschritte verwendet.

### **5.2 Verwendete Methoden und Messgeräte**

#### 5.2.1 Massenspektrometrie

Die Massenanalysen organischer Verbindungen und modifizierter Oligonukleotide wurden mittels Matrix-unterstützte Laser-Desorption Ionisation (MALDI, engl.: „*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization*“) durchgeführt. Die Proben wurden durch Co-Kristallisation auf einer Bruker Standard Probenplatte aus geschliffenem Stahl mit insgesamt 384 Pipettierflächen vorbereitet, indem für kleinere organische Verbindungen eine 2,5-Dihydroxybenzoesäuren Matrix oder für (modifizierte) Oligonukleotide eine 3-Hydroxypicolin (3-HPA) Matrix verwendet wurde. Als Detektor wurde ein Flugzeitanalysator (TOF, engl.: „*Time of Flight*“) eingesetzt und die Spektren mit einem Bruker Autoflex III aufgenommen, indem die Proben mehrmals mit einer Wiederholungsrate von 200 Hz ionisiert wurden. Die Angabe der Molekülfragmente erfolgte als Masse/Ladungsverhältnis, wobei die Intensitäten der Signale in Prozent relativ zur Intensität des Basissignals (100 %) angegeben wurden. Die *Fast Atom Bombardment* (FAB) Messungen hingegen wurden mit dem Gerät *Finnigan MAT 95* in der organischen Fakultät vom Karlsruher Institut für Technologie durchgeführt.

#### 5.2.2 UV-Vis Spektroskopie

Für die UV-Vis spektrometrischen Messungen wurde ein VARY 300 Scan Spektrometer der Firma *Varian Inc.* verwendet, indem die Proben in einer Quarzküvette vorbereitet und in einem Absorptionsspektrum (soweit nicht anders vermerkt) von 800 - 200 nm analysiert wurden. Die Verdünnungen der Proben wurde zwischen 0,3 und 1,0 a.u. eingestellt. Zur Justierung der Spektren wurde als Referenzprobe das jeweilig verwendete Lösungsmittel verwendet. Die anschließenden Konzentrationsbestimmungen der Proteine, Oligonukleotide und Protein-DNA Konjugaten erfolgte mittels der Lambert Beerschen Gesetzes und unter

Berücksichtigung der jeweiligen Verdünnungsfaktoren und Extinktionskoeffizienten bei 260, 410 bzw. 280 nm.

### 5.2.3 Schnelle Flüssigkeitschromatographie

Zur Aufreinigung der Protein-DNA Konjugaten und rekombinanten Proteine wurde die schnelle Flüssigkeitschromatographie (FPLC, engl.: „*Fast Protein Liquid Chromatography*“) verwendet. Hierbei handelte es sich um ein Äkta Explorer-System der Firma *GE-Healthcare*, welches aus einer P-900 Pumpe, einem Detektor UV-900, einem Monitor pH/C-900 und einem Fraktionssammler Frac-950 zusammengestellt war. Für die Anionenaustauschchromatographie wurden Mono Q 5/50 Säule der Firma *GE-Healthcare* verwendet.

### 5.2.4 Hochdruckflüssigkeitschromatographie

Die Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC, engl.: „*High Pressure Liquid Chromatography*“) wurde zur Aufreinigung der modifizierten Oligonukleotide verwendet. Hierzu wurde eine Instrument der Firma *Agilent* mit der Typbeschreibung 1200series eingesetzt, welches aus einer quartären Pumpe, dem Säulenofen TCC, dem Autosampler ALS G1329A, dem Diode-Array Detektor G1315D, dem Fluoreszenzdetektor G1321A und dem Fraktionssammler Analyt FC G1364C zusammengestellt war. Zur Reinigung der modifizierten DNA Stränge wurde eine Zorbax Eclipse XDB-C18 Säule mit der Größe 4,6\*150 mm von der Firma *Agilent* verwendet.

### 5.2.5 Elektrophorese

#### 5.2.5.1 Polyacrylamidgelelektrophorese

Zur Durchführung der Polyacrylamidgelelektrophorese wurden in dieser Arbeit Vertikalkammern der Firma *Biorad* verwendet (Mini PROTEAN Tatra cell). Die Kammern wurden nach Herstellerangaben zusammengebaut und zur Durchführung der Elektrophorese verwendet.

#### 5.2.5.2 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese erfolgte in Horizontalkammern der Firma *ThermoFischer*. Die Apparatur wurde nach Hersteller Angaben zusammengebaut.

### 5.2.6 Bestimmung der Protein- und Konjugataktivitäten

Die Bestimmungen der Protein- bzw. Konjugataktivitäten erfolgte in dem Mikrotiterplatten-Lesegerät „Synergy H1 Hybrid Reader“ der Firma Biotek. Die Fluoreszenzassays wurden unter Verwendung von schwarzen Mikrotiterplatten mit 96 Kavitäten der Firma *NUNC* durchgeführt. Soweit nicht anders vermerkt wurde, wurde eine Sensitivität von 100 verwendet.

### 5.2.7 Dialyse

Die Dialyse der exprimierten Proteine erfolgte mittels Spectra/Por Dialyse Membranen (MWCO: 6-8000) der Firma *Spectrum Laboratories, Inc.*.

### 5.2.8 Polymerase-Kettenreaktion

Die Vervielfältigung des genetischen Materials zur Klonierung der einzelnen Expressionsvektoren erfolgte über die Polymerase-Kettenreaktion (PCR, engl.: „*Polymerase-Chain-Reaction*“) in einem Gradienten „MJ Mini Personal Thermal Zyklus“ der Firma *BioRad*. Als Heizblock wurde ein Standard Block mit insgesamt 8x8 (48) Kavitäten verwendet.

### 5.2.9 Schüttler, Inkubatoren, Zentrifugen und Hilfsgerätschaften

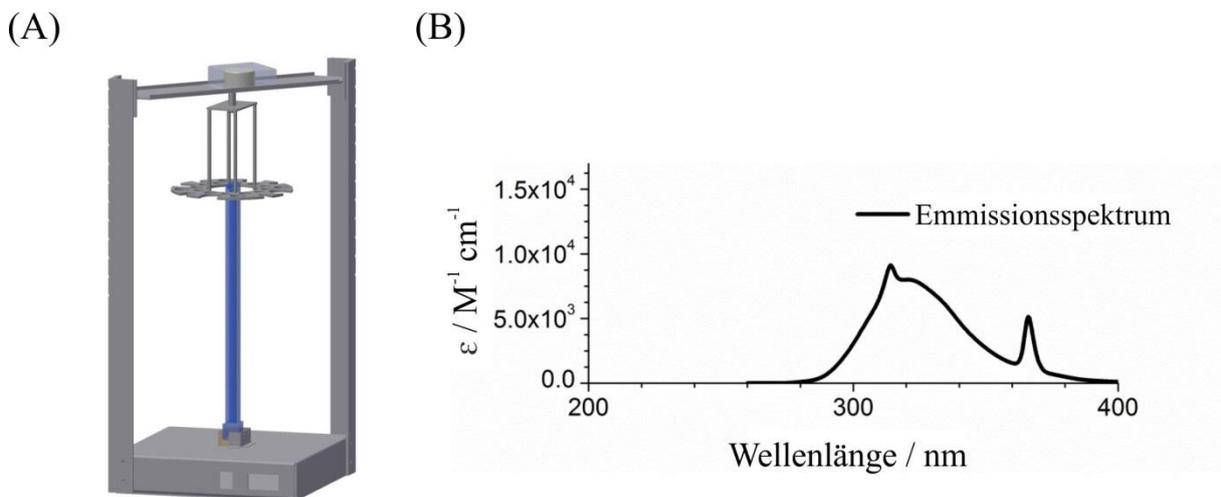
In der folgenden Tabelle 18 sind die verwendeten Schüttler, Inkubatoren, Zentrifugen und weitere Hilfsgerätschaften gelistet und ihr Verwendungszweck angegeben.

**Tabelle 18:** Verwendete Gerätschaften und ihre Anwendung.

Gerätschaft	Firma	Verwendungszweck
Zentrifuge 3-30K	<i>Sigma</i>	Zentrifugation von Zellmedium bis 500 mL
Zentrifuge 4-16K	<i>Sigma</i>	Zentrifugation von Zellmedium bis 50 mL
Zentrifuge 5804R	<i>Eppendorf</i>	Zentrifugation von Eppendorfgefäßen bis 2 mL
Zentrifuge 5415R	<i>Eppendorf</i>	Zentrifugation von Eppendorfgefäßen bis 1,5 mL
Konzentrator Plus System	<i>Eppendorf</i>	Konzentrationserhöhung von Proben im Vakuum
Thermomixer Compact	<i>Eppendorf</i>	Schütteln von Eppendorfgefäßen bis 1,5 mL
Thermomixer Comfort	<i>Eppendorf</i>	Schütteln von Eppendorfgefäßen bis 2 mL
Ultraschallstab TypUW 2070	<i>BANDELIN</i>	Aufschluss von Zellen mittels Ultraschallbehandlung
Brutschrank Ecotron	<i>INFORS HT</i>	Zellenwachstum
Brutschrank Multitron Standard	<i>INFORS HT</i>	Zellenwachstum
GelDoc™ XR Imaging System	<i>BioRad</i>	Dokumentation von Gelen
Scanner CanoScan 9000F	<i>Canon</i>	Dokumentation von Gelen

### 5.2.10 Lichtreaktionen

Die Lichtreaktionen wurden in einem selbstgebauten Photoreaktor durchgeführt (Abbildung 97A). Der Reaktor bestand aus einer Metallscheibe, welche sich in einem Abstand von 40-50 mm um eine Breitband-UVB-Niederdrucklampe (Arimed B6, 36 W, Cosmedico GmbH Stuttgart) drehte und als Halterung der Probengläschen diente. Als Reagenz-Gefäße dienten luftdichte Schnappdeckelgläschen der Firma VWR (sogenannte „Headspace vials“ von Pyrex mit einem Durchmesser von 20 mm), welche mittels SBR Dichtungsdeckel inkl. PTFE Inneneinsatz der Firma VWR luftdicht verschlossen wurden. Das Emissionsspektrum der Lampe betrug  $\lambda_{\max} = 320 \text{ nm} \pm 30 \text{ nm}$  (Abbildung 97B).



**Abbildung 97:** (A) Graphische Darstellung des selbstgebauten Photoreaktors. (B) Emissionsspektrum der verwendeten Breitband-UVB-Niederdrucklampe.

## 5.3 Reagenzien und Puffer

### 5.3.1 Bakterienstämme

In der folgenden Tabelle sind die verwendeten Bakterienstämme und ihr Verwendungszweck angegeben. Während die BL21 *E. coli* im Institut zur Verfügung standen, wurden die NEB 5-alpha *Escherichia coli* Zellen von der Firma *New England BioLabs (NEB)* erworben.

**Tabelle 19:** Liste der verwendeten Bakterienstämme und ihre Anwendungen.

Bakterienstamm	Verwendungszweck
BL21 <i>Escherichia coli</i>	Expression der Proteine
NEB 5-alpha <i>Escherichia coli</i>	Klonierung der Expressionsvektoren

### 5.3.2 Medien

**Tabelle 20:** Verwendete Medien zur Kultivierung von Bakterienzellen.

Medium	Zusammensetzung
TFB-1 Lösung	30 mM C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> KO <sub>2</sub> , 10 mM CaCl <sub>2</sub> , 50 mM MnCl <sub>2</sub> , 100 mM RbCl, 15% Glycerol, pH: 5,8, steril filtriert und bei RT gelagert (nicht autoklaviert)
TFB-2 Lösung	10 mM MOPS, 75 mM CaCl <sub>2</sub> , 10 mM RbCl, 15 % Glycerol, pH: 6,8 (mit KOH einstellen), steril filtriert und bei RT gelagert (nicht autoklaviert)
1x LB-Medium	2,5 g Trypton, 1,25 g Hefeextrakt, 2,5 g NaCl auf 250 mL mit ddH <sub>2</sub> O auffüllen (autoklaviert)
LB-Agarplatten	1 L LB-Medium, 15 g Agar (autoklaviert)
SsOB-Medium	20 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 0,5 g NaCl mit 980 mL ddH <sub>2</sub> O aufgefüllt und autoklaviert, anschließend Zugabe von steril gefilterten 10 ml 1 M MgCl <sub>2</sub> und 10 mL 1 M MgSO <sub>4</sub>
SOC-Medium	50 mL SOB-Medium, 1 mL 20% Glucose, steril filtriert und bei -20°C gelagert

Aufgrund von Selektionszwecken wurden die LB-Medien und LB-Agarplatten mit Ampicillin versetzt. Hierzu wurde darauf geachtet, dass bei der Zugabe des Ampicillins das LB-Agarplattenmedium auf ca. 50°C abgekühlt war, bevor das Ampicillin hinzugegeben wurde. Die Endkonzentration von Ampicillin betrug in allen verwendeten Medien 100 µg/mL.

### 5.3.3 Verwendete Enzyme

**Tabelle 21:** Verwendete Enzyme (ohne Angabe der Restriktionsenzyme).

Enzym	Herkunft
Rinderserumalbumin (BSA)	<i>Sigma-Aldrich</i>
Lysozym	<i>Roche</i>
Myoglobin vom Pferdeherz	<i>Sigma-Aldrich</i>
Sperm whale Myoglobin	<i>Sigma-Aldrich</i>
Streptavidin	Geschenk vom Arbeitskreis Prof. C. M. Niemeyer*
I Proof <sup>TM</sup> High-Fidelity Polymerase	<i>Bio-Rad</i>
SrepTactin®	<i>IBA-Lifescience</i>
SuperStrepTactin®	Geschenk der Firma <i>IBA-Lifescience</i>
Meerrettichperoxidase (HRP)	<i>Sigma-Aldrich</i>

\* Karlsruher Institut für Technologie (KIT), Institut für Biologische Grenzflächen (IBG 1).

In/ der folgenden Tabelle 22 sind die verwendeten Restriktionsenzyme zur Charakterisierung der klonierten Expressionsvektoren dargestellt. Fast alle Restriktionsenzyme wurden von\* der Firma *New England BioLabs (NEB)* erworben. Eine Ausnahme stellen hierbei die

Restriktionsenzyme XhoI und EcoRV dar, welche von der Firma *Thermo Scientific* erworben wurden.

**Tabelle 22:** Liste der verwendeten Restriktionsenzyme und ihre Erkennungssequenzen.

Restriktions- enzym	BSA benötigt	Verwendete Puffer	Inkubations- temperatur	Erkennungssequenz
EcoRI	Nein	1x NEB EcoRI	37°C	5'...G <sup>↓</sup> AATTC...3' 3'...CTTAA <sub>↑</sub> G...5'
AatII	Nein	1x NEB 4	37°C	5'...GACGT <sup>↓</sup> C...3' 3'...C <sub>↑</sub> TGCAG...5'
ApaLI	ja	1x NEB 4	37°C	5'...G <sup>↓</sup> TGCAC...3' 3'...CACGT <sub>↑</sub> G...5'
EcoRV	Nein	1x Puffer R	37°C	5'...GAT <sup>↓</sup> ATC...3' 3'...CTA <sub>↑</sub> TAG...5'
XhoI	Nein	1x Puffer R	37°C	5'...C <sup>↓</sup> TCGAG...3' 3'...GAGCT <sub>↑</sub> C...5'
DpnI	Nein	1xNEB 4	37°C	5'...GA(CH <sub>3</sub> ) <sup>↓</sup> TC...3' 3'...CT <sub>↑</sub> A(CH <sub>3</sub> )G...5'

### 5.3.4 Verwendete DNA Stränge

In der folgenden Tabelle sind die verwendeten DNA Stränge zur Herstellung und Charakterisierung der Protein-DNA Konjugate dargestellt.

**Tabelle 23:** Verwendete DNA Stränge zur Analyse und Herstellung der Protein-DNA Konjugate.

Bezeichnung	Sequenzen und 5'-Modifikationen	$\epsilon$ [ $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ]
NH <sub>2</sub> D1	5'-[AminoC6]GGCGTATAACAA-3'	127200
SHD1	5'-[ThioC6]GGCGTATAACAA-3'	127200
cD1	5'-TTGTTATACGCC-3'	110200
cD1T <sub>AMRA</sub>	5'[TAMRA]TTTTTTTGTATACGCC-3'	150700
bcD1	5'[Biotin]TTTTTTTGTATACGCC-3'	150700
SHD2	5'-[thioC6]GGACGAATACAAAGGCTACACG-3'	238400
SHD3	5'-[thioC6]GTGGAAAGTGGCAATCGTGAAG-3'	237400
AzD2	5'-[AzidC6]GGACGAATACAAAGGCTACACG-3'	238400
AzD3	5'-[AzidC6]GTGGAAAGTGGCAATCGTGAAG-3'	237400
AlkD2	5'-[AlkinC6]GGACGAATACAAAGGCTACACG-3'	238400
AlkD3	5'-[AlkinC6]GTGGAAAGTGGCAATCGTGAAG-3'	237400
cD2 <sub>Cy5</sub>	5'-[Cy5]CGTGTAGCCTTTGTATTCGTCC-3'	197200
cD3 <sub>Cy5</sub>	5'-[Cy5]CTTCACGATTGCCACTTCCAC-3'	191700
bcD2	5'-[biotin]TTTTTTTTCGTGTAGCCTTTGTATTCGTCC-3'	262700
bcD3	5'-[biotin]TTTTTTTCTTCACGATTGCCACTTCCAC-3'	257200

### 5.3.5 Verwendete Sequenzierungsprimer

In der folgenden Tabelle sind die verwendeten Sequenzierungsprimer dargestellt.

**Tabelle 24:** Verwendete Primer zur Sequenzierung der klonierten Expressionsvektoren.

Bezeichnung	Sequenzen und 5'-Modifikationen	Sequenzierungsvektor	Herkunft
PCR-1	CGGGCCTCTTCGCTATT	mMbpUC19 mMbpUC19STII	<i>GATC</i>
FW-Seq1	AAATATTCTGAAATGAGCTG	MBP/MT/EGFP-pMALc2x	<i>Sigma</i>
FW-Seq1	GATCACATGGTCCTGCTG	MBP/MT/EGFP-pMALc2x	<i>GATC</i>
FW-Seq1	TCAGACTGTCGATGAAGC	MBP/MT/EGFP-pMALc2x	<i>GATC</i>

### 5.3.6 Pufferverzeichnis und Lösungen

**Tabelle 25:** Verwendete Puffer für den Restriktionsverdau.

Puffer	Zusammensetzung
1x NEB 4	50 mM Kaliumacetat, 20 mM Tris-acetat, 10 mM Magnesiumacetat, 1 mM DTT, pH: 7,9
1x NEB EcoRI	50 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl <sub>2</sub> , 0,025% Triton X-100, pH: 7,5
1x Puffer R	10 mM Tris-HCl (pH: 8,5), 10 mM MgCl <sub>2</sub> , 100 mM KCl, 0,1 mg/ml BSA

**Tabelle 26:** Puffer und Lösungen für die Streptavidin bzw. StrepTactin® Modifizierung von Mikrotiterplatten.

Bezeichnung	Zusammensetzung
MESTBS	20 mM Tris, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 4,5 % Milchpulver, 0,2 % Natriumazid, 1 mg/mL Lachsperma-DNA, pH: 7,35
Biotin-RDB	20 mM Tris, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 800 µM D-Bioin, 0,45 % Milchpulver, 0,02 % Natriumazid, 0,1 mg/mL Lachssperma-DNA
TETBS-Biotin	20 mM Tris, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0,05 % Tween-20, 800 µM D-Biotin, pH: 7,5
TETBS	20 mM Tris, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0,05 % Tween-20, pH: 7,5

**Tabelle 27:** Puffer zur Aufreinigung rekombinater Strep-Tag® Proteine mittels Strep-Tactin® Gravitationsssäulen.

Bezeichnung	Zusammensetzung
Puffer W (10x)	1 M Tris-Cl, 1,5 M NaCl, 10 mM EDTA, pH: 8,0
Puffer E (10x)	1 M Tris-Cl, 1,5 M NaCl, 10 mM EDTA, 25 mM Deshiobiotin, pH: 8,0
Puffer R (10x)	1 M Tris-Cl, 1,5 M NaCl, 10 mM EDTA, 10 mM HABA (Hydroxyazophenylbenzoesäure), pH: 8,0

- Experimenteller Teil -

**Tabelle 28:** Puffer zur Aufreinigung der rekombinanten Proteine und Protein-DNA Konjugate mittels Anionenaustauschchromatographie.

Bezeichnung	Zusammensetzung
Anionenaustauschpuffer A	20 mM Tris, pH:8.3
Anionenaustauschpuffer B	20 mM Tris, 1M NaCl, pH: 8.3
Anionenaustauschpuffer C	20 mM Ethanolamin; pH:10
Anionenaustauschpuffer D	20 mM Ethanolamin, 1 M NaCl; pH:10

**Tabelle 29:** Sonstige verwendete Puffer und Lösungen.

Pufferbezeichnung	Zusammensetzung
TBE 5x	450 mM Tris/HCl, 450 mM Borsäure, 10 mM EDTA, pH: 8
Biotin-RDB	20 mM Tris, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 800 µM D-Bioin, 0,45 % Milchpulver, 0,02 % Natriumazid, 0,1 mg/mL Lachssperma-DNA
TETBS-Biotin	20 mM Tris, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0,05 % Tween-20, 800 µM D-Biotin, pH: 7,5
Coomassie-Färbelösung	40 % (v/v) Ethanol, 10 % (v/v) Essigsäure, 500 mg/L Coomassie Brilliant Blau G 250
Ladepuffer 6x	10 mM Tris, 60 mM EDTA, 0,03 % Bromphenolblau, 0,03 % Xylen Cyanol, 60 % Glycerin, pH: 7,6.
MESTBS	20 mM Tris, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 4,5 % Milchpulver, 0,2 % Natriumazid, 1 mg/mL Lachsperma-DNA, pH: 7,35
Kalium Phosphatpuffer	<b>Lösung A:</b> 0.1 M $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 50 mM NaCl; <b>Lösung B:</b> 0,1M $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 50 mM NaCl - Beide Puffer wurden soweit vermischt, dass der entsprechenden pH-Wert erreicht wurde (pH: 6 - 7,5)
HEPES	20 mM HEPES, pH: 7,4
Sammelpuffer	1,5 M Tris, pH: 8,8
SDS-Ladepuffer 4x	50 mM Tris, 8 % SDS, 40 % Glycin, 20 % Mercaptoethanol, 5 mg/mL Bromphenol Blau
SDS-PAGE Laufpuffer	25 mM Tris, 250 mM Glycin, 0,1 % SDS
TBE	90 mM Tris/HCl, 90 mM Borsäure, 2 mM EDTA
TBS	20 mM Tris, 150 mM NaCl, pH: 7,35
TETBS	20 mM Tris, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0,05 % Tween-20, pH: 7,5
Trenngelpuffer	0,5 M Tris, pH: 6,8
Lysis-Puffer	100 mM Tris, 100 mM KCl, 1 mM EDTA, pH: 8,0
Ethanolamin [20 mM]	0,595 mL Ethanolamin mit ddH <sub>2</sub> O auf 500 mL aufgefüllt
PBS	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 1,5 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4$
Tris Glycin-Laufpuffer	25 mM Tris, 192 mM Glycin

## **5.4 Allgemeine Arbeitsvorschriften (AAV)**

### **5.4.1 Analysen und Darstellungen der Protein-DNA Konjugate**

#### **AAV 1. Reinigung der Protein DNA-Konjugate mittels Anionenaustauschchromatographie**

Die Reinigung der Protein-DNA Konjugate erfolgte mittels Anionenaustauschchromatographie unter Verwendung eines ÄktaExplorerSystems und einer Mono Q 5/50 Säule der Firma *GE-Healthcare*. Hierzu wurden zunächst die einzelnen Analyselösungen der Protein-DNA Konjugate mittels eines Vivaspins der Firma *GE-Healthcare* (10 kDa für Myoglobin-DNA Konjugate und 30 kDa für Streptavidin-DNA Konjugate) behandelt, indem ein Pufferwechsel zum Anionenaustauschpuffer A (20 mM Tris) durchgeführt wurde. Die einzelnen Proben wurden auf ein Endvolumen von ca. 900 µL aufkonzentriert und in das Äkta System mittels einer Spritze injiziert. Die anschließende Anionenaustauschchromatographie erfolgte mit einer Flussrate von 1 mL/min, indem der Elutionspuffer B (20 mM Tris, 1 M NaCl) linear innerhalb von 35 min auf 100 % erhöht wurde.

#### **AAV 2. Nicht denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese (nPAGE)**

Die Charakterisierung der Protein-DNA Konjugate erfolgte mittels nicht denaturierender 12 %iger Polyacrylamidgelelektrophorese (nPAGE). Die Zusammensetzung der nicht denaturierenden Gele ist in der Tabelle 30 aufgelistet. Zur Herstellung der Trenngelösung wurden 561 µL 30%-iges Bisacrylamid, 3 mL 1,5 M Tris, 4 mL ddH<sub>2</sub>O und 6 µL TEMED zusammen pipettiert. Anschließend wurde 60 µL TEMED hinzupipettiert und die Lösung mittels eines Vortexer kurz und gut durchmischt. TEMED startet die Polymerisation des Gels und sollte aus diesem Grund zuletzt hinzugegeben werden. Die Glasplatten der *BioRad* Elektrophoreseapparatur wurden anschließend mittels des Trenngels nach Hertsellerangaben zu  $\frac{3}{4}$  befüllt und das Gel wurde für ca. 30 min ausgehärtet. Anschließend wurde das polymerisierte Sammelgel analog hergestellt, zur Überschichtung des Trenngels verwendet und mit einem Probenkamm versehen. Nach weiteren 30 min wurde die Elektrophoresekammer mit Tris-Glycin Laufpuffer befüllt, der Probenkamm aus dem polymerisierten Gel entfernt und die Probenaschen mittels einer Pipette von Bläschen befreit. Die Elektrophorese der einzelnen Analyseproben erfolgte zunächst bei 80 V für ca. 15 min bis die Proben das Trenngel erreichten. Anschließend wurde die Spannung auf 100 V erhöht und

die Elektrophorese für ca. eine weitere Stunde durchgeführt, bis die gut ersichtliche 6x Ladungspufferfront das Ende des Gels erreichte.

**Tabelle 30:** Zusammensetzung eines nicht denaturierenden 5%-igen Sammlgels und eines 12%-igen Trenngels zur Charakterisierung der Protein-DNA Konjugate.

Lösung	Sammlgel (5 %)	Trenngel (12 %)
<b>30%-ige Bisacrylamidlösung</b>	561 µL	5 mL
<b>1,5 M Tris</b>	428 µL	3 mL
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	2,4 mL	4 mL
<b>10%-ige APS Lösung</b>	34 µL	60 µL
<b>TEMED</b>	3,4 µL	6 µL

### AAV 3. Berechnung des stöchiometrischen Verhältnisses der STV-DNA Konjugate

Die gemessenen Absorptionen der STV-DNA Konjugate bei 260 nm ( $A_{260}(\text{Konjugat})$ ) bzw. bei 280 nm ( $A_{280}(\text{Konjugat})$ ) setzen sich wie folgt zusammen:

$$(I) \quad A_{260}(\text{Konjugat}) = A_{260}(\text{DNA}) + A_{260}(\text{STV})$$

$$(II) \quad A_{280}(\text{Konjugat}) = A_{280}(\text{STV}) + A_{280}(\text{DNA})$$

Um nun den Absorptionsanteil des STV innerhalb des Konjugats bei 280 nm zu ermitteln, können die beiden Konstanten  $\alpha$  und  $\beta$  berücksichtigt werden, welche sich aus den Absorptionsspektren des Edukte STV, D2 und D3 ermitteln lassen (vgl. Tabelle 31):

$$(III) \quad \alpha = A_{260}(\text{DNA}) / A_{280}(\text{DNA})$$

$$(IV) \quad \beta = A_{260}(\text{STV}) / A_{280}(\text{STV})$$

Durch Einsetzen der Gleichungen (III) und (IV) in die Gleichung (II) und (I) folgt für die Absorption des Proteins STV ( $A_{280}(\text{STV})$ ) innerhalb des Konjugates:

$$(V) \quad A_{280}(\text{STV}) = [(A_{280}(\text{Konjugat}) - (A_{260}(\text{Konjugat}) * 1/\alpha))] / [(1 - \beta / \alpha)]$$

Nachdem der Absorptionsanteil des STV innerhalb des Konjugats bei 280 nm nach Formel (V) berechnet wurde, konnte der DNA Absorptionsanteil bei 260 nm über Formel (II), (III)

und (I) berechnet werden und somit die einzelnen Konzentrationen über das Lambert Beer'sche Gesetz bestimmt werden (für die Extinktionskoeffizienten vgl. Tabelle 23).

**Tabelle 31:** Ermittelte  $\alpha$  und  $\beta$  Konstanten (vgl. Formel (III) und (IV)) der verwendeten Edukte Streptavidin (STV) und ssDNA Stränge **D1** und **D2** zur Berechnung des stöchiometrischen Verhältnisses.

Biomolekül	Extinktionskoeffizient [M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> ]	$\alpha$	$\beta$
Streptavidin	165304	/	0,55
Einzelstrangsequenz D2	238400	2,0	/
Einzelstrangsequenz D3	237400	1,9	/

#### AAV 4. Bestimmung der Peroxidaseaktivität der Myoglobin-DNA Konjugate

Die Peroxidaseaktivitäten der Myoglobin-DNA Konjugate bzw. von nativen Myoglobin erfolgte in schwarzen Mikrotiterplatten der Firma *NUNC* mit 96 Kavitäten unter Verwendung des Mikrotiterplatten-Lesegeräts „Synergy H1 Hybrid Reader“ der Firma *BioTek*. Die Konzentrationsbestimmung der Myoglobin-DNA Konjugate erfolgte spektrometrisch über die Soretbande bei 410 nm ( $\epsilon(\text{Mb})_{410\text{nm}} = 171000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) und unter Verwendung der Lambert Beer'schen Gesetze. Zu 1 pmol der Myoglobin-DNA Konjugate bzw. nativen Myoglobin pro Kavität [50  $\mu\text{L}$ , 20 nM in  $\text{KPi}$ -Puffer; pH = 6,0] wurde 50  $\mu\text{L}$  einer Amplex<sup>®</sup> Red Lösung mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  gegeben und die enzymatische Aktivität soweit nicht anders vermerkt für 1 h bei Raumtemperatur verfolgt (Die Amplex<sup>®</sup> Red Lösung wurde nach Herstellerangaben vorbereitet). Die Endkonzentrationen der einzelnen Reagenzien betragen: 50  $\mu\text{M}$  Amplex<sup>®</sup> Red, 1 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  und 10 nM Protein. Jede Messung erfolgte in dreifacher Ausführung bei einer Emissionswellenlänge  $\lambda_{\text{Em}}$  von 590 nm und unter Verwendung einer Anregungswellenlänge  $\lambda_{\text{Ex}}$  von 530 nm. Die Sensitivität des Geräts betrug 100.

#### AAV 5. Beschichtung von Mikrotiterplatten mit Streptavidin bzw. Streptactin

Zur Beschichtung wurden hoch absorbierende schwarze Mikrotiterplatten der Firma *NUNC* verwendet. Zunächst wurde eine 500 nM Streptavidin (STV) (bzw. Streptactin) Lösung in einem Gesamtvolumen von 5 mL hergestellt, indem eine Stammlösung mittels PBS-Puffer verdünnt wurde. Anschließend wurde mittels einer Mehrkanalpipette der Firma *Eppendorf* 50  $\mu\text{L}$  dieser Lösung in jede einzelne Kavität einer Mikrotiterplatte pipettiert, die Platte mittels Alufolie überdeckt und für ca. 48 h bei 4°C inkubiert. Nach der Inkubation, wurde die Platte insgesamt 3mal mit 240  $\mu\text{L}$  TBS-Puffer gewaschen. Das Entleeren der

Kavitäten erfolgte durch leichtes Abklopfen der Platten auf einem Tuch. Die Kavitäten wurden dann mittels je 150  $\mu\text{L}$  MESTBS befüllt und nochmals über Nacht bei 4°C inkubiert. Nicht direkt verwendete Platten konnten ebenfalls mit MESTBS beschichtet, mit Frischhaltefolie überdeckt und für mehrere Wochen bei 4°C gelagert werden.

#### **AAV 6. Immobilisierung von Fängeroligonukleotiden auf Streptavidin beschichteten Mikrotiterplatten**

Die Streptavidin (STV) Modifizierung der Mikrotiterplatten (STV-MTPs) mit Fängeroligonukleotiden erfolgte nach bereits veröffentlichten Protokollen<sup>164</sup> mit kleineren Abweichungen, wobei die frisch hergestellten STV-MTPs (vgl. AAV 6) zunächst 5mal mit jeweils 250  $\mu\text{L}$  TETBS gewaschen wurden. Anschließend wurden die einzelnen Kavitäten für ca. 45 min bei Raumtemperatur mit 50  $\mu\text{L}$  komplementärer biotinylierter Oligonukleotide [240 nM; 1,2 nmol] in TETBS Puffer unter leichtem Schütteln inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Kavitäten 5mal mit 200  $\mu\text{L}$  TETBS Puffer gewaschen und anschließend 10 min bei Raumtemperatur mit jeweils 200  $\mu\text{M}$  TETBS-Biotin Puffer inkubiert, um freie STV Monomere zu blockieren. Nach der Blockierung des STVs wurden die Kavitäten wiederum 3mal mittels TETBS-Puffer gewaschen und die modifizierten MTPs direkt für die Protein-DNA Konjugat Immobilisierung verwendet.

#### **AAV 7. DNA vermittelte Immobilisierung von Protein-DNA Konjugaten**

Für die Immobilisierung der Myoglobin-DNA Konjugate wurden die Kavitäten der Mikrotiterplatten zunächst mit Streptavidin (STV) und den entsprechenden komplementären biotinylierten Fängeroligonukleotiden nach AAV 6 und AAV 6 modifiziert. Die einzelnen Kavitäten wurden anschließend mit jeweils 50  $\mu\text{L}$  Myoglobin-DNA Konjugaten [1  $\mu\text{M}$ ] in  $\text{KPi}$ -Puffer (pH = 6,0) (bzw. als negativ Kontrolle mittels nativen Myoglobin) versetzt und für 1 h bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln und Lichtausschluss inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Kavitäten 4mal mit jeweils 200  $\mu\text{L}$   $\text{KPi}$ -Puffer (pH = 6,0) gewaschen und letztendlich mit 50  $\mu\text{L}$   $\text{KPi}$ -Puffer befüllt, um den Aktivitätstest durchführen zu können. Die Peroxidasetest der Myoglobin-DNA Konjugate (bzw. von nativen Myoglobin) erfolgte unter Verwendung des Mikrotiterplatten-Lesegeräts „Synergy H1 Hybrid Reader“ der Firma *BioTek*. Die Amplex® Red/ $\text{H}_2\text{O}_2$  Lösung in  $\text{KPi}$ -Puffer (pH = 6,0) wurde nach Herstellerangaben vorbereitet und 50  $\mu\text{L}$  einer Stammlösung kurz vor dem Messungsstart in die jeweiligen Kavitäten pipettiert. Die Endkonzentrationen der einzelnen Reagenzien

betragen: 50  $\mu\text{M}$  Amplex® Red und 1 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Jede Messung erfolgte über einen Zeitraum von 1 h bei Raumtemperatur in dreifacher Ausführung bei einer Emissionswellenlänge  $\lambda_{\text{Em}}$  von 590 nm und unter Verwendung einer Anregungswellenlänge  $\lambda_{\text{Ex}}$  von 530 nm.

#### **5.4.2 Färbemethoden von Polyacrylamid- und Agarosegelen**

Zur Charakterisierung von Doppelstrang DNA wurde Ethidiumbromid verwendet, während die Detektion von Einzelstrang DNA mittels SYBR Gold Färbung durchgeführt wurde. Während die Proteine mittels Coomassie Brilliant Blau bzw. Silber gefärbt wurden, wurde für die Charakterisierung der Protein-DNA Konjugate eine abgestufte Färbemethode gewählt. Hierzu wurden die entsprechenden Gele zunächst mittels SYBR Gold gefärbt, um die Einzelstrang DNA zu detektieren und anschließend mittels Silber, um eine Proteinfärbung durchzuführen.

#### **AAV 8. Silberfärbung**

In der folgenden Tabelle 32 sind die verwendeten Lösungen zur Silberfärbung von Polyacrylamidelen dargestellt. Das Gel wurde zunächst über Nacht in Lösung A fixiert (Vorsicht: Methanol ist giftig und darf nicht im Spülbecken entsorgt werden!), die Lösung am nächsten Tag entfernt und das fixierte Gel ca. 20 min Lösung B getaucht, um die Proteine vollständig zu denaturieren und das Detergens SDS zu entfernen. Folgend wurde das Gel dreimal für ca. für 20 min mit  $\text{ddH}_2\text{O}$  gewaschen und danach für 20 min in Lösung C geschüttelt. Nach einem weiteren Waschprozess (3 x 20 min in  $\text{ddH}_2\text{O}$ ), wurde das Gel für 20 min mittels einer Silberfärbelösung behandelt. Hierbei lagern sich die Silberionen auf der negativ geladenen Oberfläche des Proteins an. Nach einem letzten Waschprozess (4 x 1 min in  $\text{ddH}_2\text{O}$ ) wurden die Silberionen durch Zugabe einer Formaldehyd enthaltenen Reduktionslösung zu elementarem Silber unter Sichtkontrolle reduziert und die Färbung durch Entnahme des Gels mittels 7 % Essigsäure gestoppt. Das Gel wurde mittels eines Geldoc™ XR Visualisierungssystems der Fimra *BioRad* charakterisiert.

**Tabelle 32:** Verwendete Lösung zur Durchführung der Silberfärbung von Proteinen.

Lösungen	Zusammensetzung
<b>Lösung A</b>	25 mL Methanol; 6 mL Eisessig; auf 50 mL mit ddH <sub>2</sub> O auffüllen.
<b>Lösung B</b>	5 mL Ethanol; 2,5 mL Eisessig; auf 50 mL mit ddH <sub>2</sub> O auffüllen.
<b>Lösung C</b>	0,95 g Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> (Borax) in 40 mL ddH <sub>2</sub> O lösen; 2 mL Glutaraldehyd; auf 50 mL mit ddH <sub>2</sub> O auffüllen.
<b>Silberfärbelösung</b>	a) 0,3 g AgNO <sub>3</sub> in 10 mL ddH <sub>2</sub> O lösen b) 950 µL NaOH (1 M); 961,5 µL Ammoniak (25 %); auf 20 mL mit ddH <sub>2</sub> O auffüllen → langsam (a) in (b) tropfen lassen und direkt verwenden
<b>Reduktionslösung</b>	5 mL Ethanol, 125 µL Formaldehyd (37 %), 300 µL Zitronensäure (1 %); auf 50 mL mit ddH <sub>2</sub> O auffüllen.
<b>7 % Essigsäure (v/v)</b>	3,5 mL Essigsäure auf 50 mL mit ddH <sub>2</sub> O auffüllen.

### AAV 9. SYBR Gold Färbung

Zur SYBR Gold Färbung wurde das kommerziell erhältliche SYBR<sup>®</sup> Gold der Firma *ThermoFisherScientific* (10000 x konzentriert) verwendet. Hierzu wurde ca. 10 mL TBE 1x Puffer mit 1 µL SYBR Gold versetzt. Anschließend wurden die Gele für ca. 20 min mit der Färbung unter leichtem Schwenken inkubiert. Die Gele wurden vorsichtig mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen und mittels eines GelDoc<sup>TM</sup> XR Visualisierungssystems der Firma *BioRad* unter UV Bestrahlung charakterisiert.

### AAV 10. Ethidumbromidfärbung

Die Ethidumbromidfärbung wurde mit dem kommerziell erhältlichen Ethidumbromid der Firma Carl Roth (10000 x konzentriert) durchgeführt. Hierzu wurde zunächst 10 mL TBE 1x Puffer mit 1 µL Ethidumbromid versetzt. Anschließend wurden die jeweiligen Gele (Polyacrylamid bzw. Agarosegele) für ca. 20 min in der frisch angesetzten Lösung inkubiert. Die Gele wurden vorsichtig mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen und mittels eines GelDoc<sup>TM</sup> XR Visualisierungssystems der Firma *BioRad* unter UV Bestrahlung charakterisiert.

### AAV 11. Coomassie Blau Färbung

Zur Coomassie Färbung von Proteinen wurden die jeweiligen Polyacrylamidgele für ca. 30 min in einer Coomassie-Färbelösung inkubiert (vgl. Tabelle 33). Nach der Färbung wurden die Gele in eine 50 mL ddH<sub>2</sub>O Lösung gegeben, die Lösung vorsichtig mittels einer

Mikrowelle erhitzt und die Gele für ca. 10 min durch vorsichtigem Schütteln entfärbt. Dieser Prozess wurde solange wiederholt, bis das Gel vollständig entfärbt und die Proteinbanden deutlich sichtbar waren. Die Gele wurden mittels eines Flachbrettscanners (CanoScan 9000F) der Firma *Canon* dokumentiert.

**Tabelle 33:** Zusammensetzung der Coomassie Färbelösung.

<b>Coomassie-Färbelösung</b>	40 % (v/v) Ethanol, 10 % (v/v) Essigsäure, 500 mg/L Coomassie Brilliant Blau G 250
------------------------------	--

### 5.4.3 Molekularbiologische und genetische Methoden

Alle molekularbiologischen und genetischen Methoden wurden unter sterilen Arbeiten und mittels sterilen (autoklavierten) Reaktionsgefäßen und Verbrauchsmaterialien wie Pipettenspitzen durchgeführt.

#### **AAV 12. Ausstreichen von Bakteriensuspensionen auf Agarplatten**

Für das Ausstreichen der Bakteriensuspensionen wurden L-förmige sterile Petrischalenspatel der Firma *Roth* verwendet, indem ca. 300 µL der zu analysierenden Suspensionen vorsichtig auf 37°C vorgewärmte Agarplatten verteilt wurden. Die Agarplatten wurden anschließend bei 37°C über Nacht in einem Inkubator der Firma *INFORS HT* inkubiert.

#### **AAV 13. Übertragung von Kolonien in Wachstumsmedium**

Einzelne gewünschte Kolonien wurden mittels einer autoklavierten Pipettenspitze von den Agarplatten in ein entsprechendes Volumen an LB-Medium (evtl. mit Ampicillin, Endkonzentration von 100 µg/mL) übertragen und über Nacht bei 37°C in einem Schüttelinkubator der Firma *INFORS HT* inkubiert.

#### **AAV 14. Isolierung der Plasmide aus Bakterienzellen mittels Zyppy™ Plasmid Mini-Prep Kits**

Die Isolierung der Plasmide aus Bakterienzellen erfolgte mittels des Zyppy™ Plasmid Miniprep Kit der Firma *ZYMO Research* mittels leichter Veränderungen der Herstellerangaben. Zunächst wurden 1,5 mL einer frisch hergestellten 5 mL Bakterienkultur (Inkubation einer Pipettenspitze der jeweiligen Bakterienkultur bei 37°C in Ampicillin LB-

Medium über Nacht) in ein 2 mL Eppendorf-Gefäß übertragen und bei ca.  $10^3$  rpm für 1 min zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig verworfen und der Prozess solange wiederholt, bis die restlichen 3,5 mL der Bakterienkultur ebenfalls ab zentrifugiert und in das jeweilige Eppendorf-Gefäß übertragen wurden. Das Bakterienpellet wurde anschließend in 600  $\mu$ L H<sub>2</sub>O resuspendiert und mit 100  $\mu$ L blauen *7xLysis* Puffer versetzt. Hierbei wurde das Eppendorf-Gefäß mehrmals invertiert, bis sich die deckend blaue Farbe in eine homogen hell blaue Farbe verteilt hat. Anschließend wurde die Lösung mit 350  $\mu$ L gelben Neutralisations-Puffer versetzt und solange durchmischt, bis das Pellet eine hell gelbe Farbe aufwies (die Lösung wechselt zur gelben Farbe bei erfolgreicher Neutralisation). Die Probe wurde für 5 min bei  $13,5 \times 10^3$  rpm zentrifugiert, um das Pellet abzutrennen. Der Überstand (ca. 900  $\mu$ L) wurde vorsichtig in eine *Zymo-Spin<sup>TM</sup> IIN* Säule übertragen und die Säulen in ein 2 mL Eppendorf Gefäß platziert. Anschließend wurde die Säule mit jeweils 200  $\mu$ L Endo-Wasch Puffer und 400  $\mu$ L *Zyppy<sup>TM</sup>* Wasch Puffer durch Zentrifugation für 30 s bei  $5 \times 10^3$  rpm gewaschen und nach dem Waschvorgang in ein neues 1,5 mL Eppendorf-Gefäß platziert. Die DNA wurde mittels 30  $\mu$ L H<sub>2</sub>O durch Zentrifugation für 1 min bei  $5 \times 10^3$  rpm eluiert und die Konzentration der Plasmide spektrometrisch mittels eines Biophotometers der Firma *Eppendorf* bestimmt.

#### **AAV 15. Restriktionsverdau von Plasmiden**

Um die klonierten Plasmide in einem ersten Schritt zu charakterisieren, wurde ein Restriktionsverdau durchgeführt. Hierzu wurden 200 ng der jeweiligen Plasmide mit (soweit nicht anders vermerkt) mit 1  $\mu$ L Restriktionsenzym und 2  $\mu$ L 10x Restriktionspuffer versetzt. Das Volumen wurde mittels H<sub>2</sub>O auf 20  $\mu$ L erhöht und der Verdau folgte in einem Thermoschüttler der Firma *Eppendorf* für eine Stunde bei 37 °C. Die verwendeten Restriktionspuffer und Restriktionsenzyme können aus der Tabelle 22 entnommen werden. Der Verdau wurde anschließend mittels ein prozentiger Agarosegelelektrophorese charakterisiert (vgl. AAV 16).

#### **AAV 16. Charakterisierung des Restriktionsverdaus mit Agarosegelelektrophorese**

Zur Charakterisierung des Restriktionsverdaus wurden 1 % Agarosegele verwendet. Zur Herstellung wurde 1 g Agarose in 100 mL 1x TBE Puffer durch Erhitzen in einem Mikrowellengerät gelöst. Nach Abkühlung der Lösung auf ca. 60 °C wurde die Lösung anschließend in eine Horizontalkammer der Firma *ThermoScientific* gegeben und mit einem

Probenkamm versehen. Das Gel wurde bei Raumtemperatur für ca. 1 h ausgehärtet und daraufhin mit 1x TBE Puffer überschichtet. Die Probenvorbereitung des Restriktionsverdaus erfolgte durch Zugabe von 4  $\mu\text{L}$  6x-Ladepuffer in die mit Restriktionsenzym behandelten Proben (vgl. AAV 15) und Durchmischen mittels eines Vortexers und kurzer Zentrifugation. Die Elektrophorese wurde soweit nicht anders vermerkt bei 200 V in der Hoizontalkammer durchgeführt. Nach ca. 1 h wurde das Gel aus der Kammer entnommen und eine Ethidiumbromidfärbung nach AAV 10 durchgeführt. Die Dokumentation erfolgte mittels des Gel Doc<sup>TM</sup> XR Imaging system der Firma *BioRad*.

### **AAV 17. Sequenzierung der Plasmide**

Die Sequenzierung der isolierten Plasmide erfolgte durch die Firma *GATC Biotech*. Hierzu wurden die einzelnen Plasmide in  $\text{H}_2\text{O}$  isoliert und in einem Eppendorf-Gefäß mit einer Endkonzentration von 30-50  $\text{ng}/\mu\text{L}$  (und in einem Volumen von ca. 10-20  $\mu\text{L}$ ) versendet. Für die Sequenzierung wurden von der Firma zur Verfügung stehende Primer verwendet, wobei die Hybridisierungspositionen und Sequenzen der einzelnen Primer auf den entsprechenden Plasmiden der Tabelle 24 zu entnehmen sind.

### **AAV 18. Herstellung von kompetenten Bakterienzellen**

Für die Herstellung kompetenter BL21 *E. coli* Bakterienzellen wurde zunächst ein Aliquot von Bakterienzellen (100  $\mu\text{L}$  Bakteriumsuspension in 1x LB-Medium) vorsichtig auf Eis aufgetaut, in 3 mL 1x LB-Medium überführt und über Nacht bei 37°C in einem Thermoschüttler inkubiert. Um sicherzustellen, dass das anschließend verwendete Medium keine Verunreinigungen aufwies, wurde zusätzlich 250 mL 1x LB-Medium mit  $\text{MgSO}_4$  versetzt (Endkonzentration  $c_E = 20 \text{ mM}$ ) und ebenfalls über Nacht bei 37°C inkubiert (War das Medium am nächsten Tag klar, konnte sichergestellt werden, dass keine Verunreinigungen/Kontaminationen vorhanden waren). Am nächsten Tag wurde die 3 mL Übernachtkultur in das 250 mL LB-Medium mit 20 mM  $\text{MgSO}_4$  überführt und die Zellen solange bei 37°C kultiviert, bis eine optische Dichte (OD-Wert) von 0,4-0,6 bei 620 nm erreicht wurde. Hierzu wurden ca. alle 30 min die OD-Werte photometrisch bestimmt. Das Kulturmedium wurde anschließend vorsichtig bei 4500 x g bei 4°C für 5 min abzentrifugiert, der Überstand verworfen, das Bakterienpellet in 100 mL kalter TFB-1 Lösung resuspendiert und für ca. 60 min auf Eis inkubiert. Die Lösung wurde nach der Inkubation wiederum für 5 min bei 4500 x g zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Pellet in 10 ml TFB-2 Lösung

resuspendiert und für 15 min auf Eis gelagert. Die kompetente Bakteriensuspension wurde nun in 1 ml Eppendorf-Gefäßen zu jeweils 100 µL aliquotiert, in flüssigen Stickstoff schockgefroren und die Aliquote bei -80°C gelagert.

#### **AAV 19. Transformationen kompetenter Bakterienzellen mittels Expressionsvektoren**

Die Expression der Proteine erfolgte in BL21 kompetenter *E. coli* Bakterienzellen, wobei für die Transformation zunächst ein Aliquot kompetenter BL21 *E.coli* Bakteriensuspensionen (vgl. AAV 18) vorsichtig für ca. 15 min auf Eis aufgetaut wurde. Die aufgetaute Bakteriensuspension wurde mit jeweils 100 ng der isolierten Expressionsvektoren (vgl. AAV 14) versetzt, vorsichtig durch Schwenken des Eppendorf-Gefäßes durchmischt und für ca. 35 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock der Bakterienzellen, indem die Zellen für 45 s in einem Heizblock auf 42°C erhitzt und für 15 min auf Eis gelagert wurden. Die abgekühlte Suspension wurde mit 900 µL SOC-Medium versetzt und für ca. 1 h bei 37°C in einem Thermoschüttler inkubiert. Nach der Inkubation wurden ca. 300 µL auf erwärmten Agarplatten mit Ampicillin ausplattiert (die Platten wurden 2 h vorher in einem Inkubator vorgewärmt) und über Nacht in einem Brutschrank bei 37°C inkubiert.

#### **AAV 20. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

Die Flankierung der PCR Produkte mittels homologen Sequenzen für die Klonierung der Expressionsvektoren erfolgte mittels der Polymerasen-Kettenreaktionen (PCR). Hierzu wurden die einzelnen Bestandteile nach der Tabelle 34 auf ein Endvolumen von 50 µL zusammen pipettiert, wobei darauf zu achten war, dass die I-Proof<sup>TM</sup>High-Fidelity Polymerase als letzter Bestandteil zur Reaktionslösung pipettiert und das Reaktionsgemisch vor dem Beginn der PCR mittels einer Pipette gut durchmischt wurde. Die Gradienten PCR wurde mit einer Hybridisierungstemperatur zwischen 56°C und 72°C nach Tabelle 13 durchgeführt. Die Charakterisierung der PCR-Produkte erfolgte mittels Agarosegelelektrophorese nach AAV 21 und die Geldokumentationen sind dem Anhang Kapitel 11.4 beigefügt worden, während die Sequenzen der einzelnen Forward- (FW) und Backward (BW)-Primerpaare, die für die jeweilige Amplifizierung verwendet wurden, der Tabelle 42 und Tabelle 47 im Anhang 11.4 zu entnehmen sind.

**Tabelle 34:** Pipettierschema zur Durchführung der Polymerase-Kettenreaktion.

Substanz	Konzentration	Eingesetztes Volumen [ $\mu\text{L}$ ]	Endkonzentration
<b>I Proof™ High-Fidelity Polymerase</b>	2 U/ $\mu\text{L}$	1	0,04 U / $\mu\text{L}$
<b>dNTP-Mix</b>	10 mM	1	0,2 mM
<b>5x I Proof HF-Puffer</b>	/	10	1x
<b>Templat / Plasmid</b>	50 ng/ $\mu\text{L}$	1	1 ng/ $\mu\text{L}$
<b>F-Primer</b>	10 $\mu\text{M}$	5	1 $\mu\text{M}$
<b>B-Primer</b>	10 $\mu\text{M}$	5	1 $\mu\text{M}$
<b>H<sub>2</sub>O</b>	/	auf 50 $\mu\text{L}$	/

### AAV 21. Analyse der PCR Produkte mittels Agarosegelelektrophorese

Zur Analyse der PCR Produkte wurden 2  $\mu\text{L}$  der PCR Proben mit 4  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O und 1  $\mu\text{L}$  6x Ladepuffer versetzt. Die Proben wurden gut durchmischt und kurz für ca. 5 s bei 2000 rpm zentrifugiert. Die anschließende Charakterisierung erfolgte mittels 1 % Agarosegelen in 1x TBE Laufpuffer, indem die Elektrophorese (soweit nicht anders vermerkt) bei 100 V in einer Horizontalkammer der Firma *ThermoScientific* durchgeführt wurde. Nach ca. 1 h wurden das Gel entnommen und eine Ethidiumbromidfärbung nach AAV 10 durchgeführt. Die Dokumentation erfolgte mittels des Gel Doc™ XR Imaging system der Firma *BioRad*. Die Ausbeuten wurden über Densitometrie unter Verwendung des Computerprogramms *ImageJ* untereinander verglichen.

### AAV 22. Isolierung der PCR-Produkte mittels präparativer Agarosegelelextraktion

Die Aufreinigung der PCR-Produkte erfolgte mittels des Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kits der Firma *ZYMO Research*. Hierzu wurde zunächst eine präparative Agarosegelelektrophorese durchgeführt, indem die 50  $\mu\text{L}$  PCR Probelösungen aus AAV 20 mit ca. 10  $\mu\text{L}$  6x Ladepuffer versetzt und in die Kammern eines 1 % Agarosegels pipettiert wurden. Nach der Elektrophorese bei 100 V für ca. 1h wurde das Gel zunächst mittels Ethidiumbromid nach AAV 10 gefärbt. Die Hauptprodukte wurden anschließend auf einem UV-Block sichtbar gemacht und vorsichtig mittels eines Skalpell's ausgeschnitten. Die kleinen Agarosestückchen wurden in ein 1,5 ml Mikrozentrifugen-Gefäß übertragen und anschließend pro 100 mg Agarose mit ca. 3 Volumen an ADB Puffer (ca. 300  $\mu\text{L}$ ) versetzt. Die Mixtur wurde für ca. 5-10 min bei 55°C und ca. 600 rpm in einem Thermoschüttler der Firma *Eppendorf* inkubiert. Die geschmolzene Agarose Lösung wurde anschließend in eine Zymo-Spin™ Säule übertragen, welche in einem 2 mL Sammelgefäß platziert wurde und für 1 min bei 10<sup>3</sup> rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule insgesamt zweimal mittels

Wasch-Puffer und Zentrifugation für 30 s bei  $10^3$  rpm gewaschen. Die Säule wurde in neues Sammelgefäß platziert, mit ca. 15  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}$  überschichtet, für ca. 5 min inkubiert und die dsDNA durch Zentrifugation für 1 min bei  $13,5 \times 10^3$  rpm eluiert. Die Konzentration der DNA Fragmente wurde spektroskopisch bestimmt.

### **AAV 23. Transformation von *Escherichia coli* mittels PCR-Produkte**

Zur Transformation der PCR Produkte zu Klonierung der Expressionsvektoren wurden kompetente NEB 5-alpha *Escherichia coli* Zellen der Firma *New England BioLabs (NEB)* verwendet und die Bakterienzellen mittels des hoch effizienten *NEB*-Transformationsprotokolls (mit kleineren Abweichungen) nach Herstellerangaben behandelt. Zunächst wurde ein Röhrchen kompetenter Zellen langsam für ca. 10 min auf Eis aufgetaut und anschließend die aufgetaute Lösung mit jeweils 100 ng isolierter PCR-Produkte versetzt (vgl. AAV 22). Die Bakterienlösung wurde vorsichtig 4-5mal mittels handliches invertieren der Röhrchen („**nicht**“ vortexen, um Zellschäden zu vermeiden!) durchmischt und für ca. 30 min auf Eis inkubiert. Nach der Inkubation erfolgte ein Hitzeschock für 30 s bei exakt  $42^\circ\text{C}$  in einem Thermoblock der Firma *Eppendorf* gefolgt von einer Abkühlung für ca. 5 min auf Eis. Nach der Behandlung wurde 950  $\mu\text{L}$  SOC Medium zu den Zellen pipettiert, die Röhrchen vorsichtig geschwenkt und für 60 min bei  $37^\circ\text{C}$  auf einem Thermoschüttler der Firma *Eppendorf* bei 300 rpm inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Bakterienlösung vorsichtig mittels einer Pipette durchmischt und ca. 250  $\mu\text{L}$  der Suspension auf  $37^\circ\text{C}$  erwärmte LB-Agarplatten mit Ampicillin pipettiert. Die Platten wurden über Nacht bei  $37^\circ\text{C}$  in einem Brutschrank inkubiert, am folgenden Tag analysiert und die einzelnen gewachsenen Kolonien in 1,5 mL LB-Medium mit Ampicillin (Endkonzentration von 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) übertragen. Die Bakterienzellen wurden über Nacht bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert und zur Plasmidaufreinigung nach AAV 14 mittels des Zyppy<sup>TM</sup> Plasmid Miniprep Kit der Firma *ZYMO Research* verwendet.

### **AAV 24. Überexpression der rekombinanten Proteine**

Zur Überexpression der rekombinanten Proteine wurde zunächst mittels einer sterilen Pipettenspitze etwas Bakterienkultur einer Stammkultur (vgl. AAV 23) in 5 mL LB-Medium mit Ampicillin (Endkonzentration von 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) übertragen und bei  $37^\circ\text{C}$  über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde die 5 mL frisch angesetzte Bakterienkultur in 250 mL LB-Medium mit Ampicillin (Endkonzentration von 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) pipettiert und die Bakteriensuspension wiederholt unter gleichen Konditionen über Nacht inkubiert. Nach der

Inkubation wurden die Bakterienzellen für 30 min bei 10000 rpm und 4°C in einer Eppendorf Zentrifuge abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Bereits in diesem Schritt konnte eine erfolgreiche Überexpression der rekombinanten Myoglobin Proteine erkannt werden, da das Pellet eine stark dunkel rote Färbung aufwies. Das Zellpellet wurde in 40 mL Medium resuspendiert und in ein 50 mL steriles Falcon-Gefäß überführt. Anschließend wurde die Bakteriensuspension mittels einer Zentrifuge bei 5000 rpm und 4°C zentrifugiert, der Überstand wiederum verworfen, das Zellpellet (ca. 5 mg) für 1 h unter einer Sterilbank auf Eis an der Luft getrocknet und anschließend bei -4°C gelagert.

#### **AAV 25. Aufschluss von Bakterienzellen mittels enzymatischer und mechanischer Behandlung**

Für den Aufschluss der *E. coli* Zellen, wurde zunächst ein enzymatisches Aufschlussverfahren durchgeführt. Hierzu wurde eine Spatelspitze Lysozym (Firma *Roche*) in 30 mL Lysis-Puffer gegeben, mit einer Proteaseinhibitor Tablette (Firma *Roche*) versetzt und zu ca. 3-5 mg des frisch hergestellten überexprimierten und aufgetauten Zellpellets (vgl. AAV 24) gegeben (die Zellpellets wurden vor der Zugabe für ca. 2 h auf Eis aufgetaut). Anschließend wurde das Zellpellet mittels eines Vortexer resuspendiert und für ca. 1 h auf Eis inkubiert. Nach dem enzymatischen Aufschluss folgte eine mechanische Strategie mittels Ultraschallbehandlung. Hierzu wurde die Bakteriensuspension in einem 50 mL Falcon-Gefäß in eine Eisschale gegeben und ein Ultraschallstab-Laborhomogenisator HD 2070 der Firma *Bandelin electronics* senkrecht in die Suspension eingetaucht. Die Ultraschallbehandlung erfolgte in 5 Schritten, indem die Suspension jeweils für 2 min bei einer Stärke von 80% beschallt wurde, gefolgt von einer 3 minütigen Pause, wobei der Beschallungsprozess insgesamt 5mal wiederholt wurde. Nach dem Ultraschallaufschluss wurde das Falcon-Gefäß in eine Zentrifuge überführt und für ca. 45 min bei  $20 \times 10^3$  rpm zentrifugiert. Der erfolgreiche Aufschluss und die erfolgreiche Expression des Myoglobins konnte hier an einem stark dunkel rot gefärbten Überstand erkannt werden. Der rötliche Überstand (ca. 40 mL) wurde vorsichtig in ein neues 50 mL Falcon-Gefäß übertragen (ohne dass die Zelltrümmer dabei mit übertragen wurden), das Zellpellet verworfen und das frisch gewonnene Zelllysat direkt für die weiteren Reinigungsschritte verwendet. Das Zelllysat der exprimierten Myoglobin Proteine ohne Aufreinigungstags (**mMb**) wurde zunächst für eine Ammoniumsulfatfällung verwendet (vgl. AAV 26), bevor die Reinigung mittels Dialyse (vgl. AAV 27) und Anionenaustauschchromatographie (vgl. AAV 28) fortgesetzt wurde. Die

Zellysate der rekombinanten Myoglobin Proteine mit Reinigungstag (**mMbSTII**) wurden zunächst dialysiert (vgl. AAV 27) und anschließend für die chromatographische Reinigung mittels StrepTactin Affinitätssäulen eingesetzt (vgl. AAV 29).

### AAV 26. Ammoniumsulfatfällung von Proteinen

Die rekombinanten Myoglobin Proteine **mMb** wurden vor der Aufreinigung mittels Anionenaustauschchromatographie mit Ammoniumsulfat gefällt. Hierzu wurden 10 mL des frisch hergestellten Zellysats nach dem Zellaufschluss (vgl. AAV 25) zunächst mit 3,9 g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  versetzt und die Salzkonzentration somit auf ca. 60% erhöht (vgl. Tabelle 35). Die Fällung erfolgte durch vorsichtige Zugabe des  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  in kleineren Schritten bei RT, indem etwa 0,05 g/min in das Lysat gegeben wurde und das Lysat vorsichtig mittels eines Magnetstäbchen auf einem Magnetrührers durchmischt wurde. Die Mixtur wurde ca. 1 h bei RT inkubiert und anschließend bei 5000 rpm für 30 min zentrifugiert. Der rot gefärbte Überstand wurde in ein neues 50 mL Falcon-Gefäß übertragen und das gefällte Pellet verworfen. Bereits in diesem Schritt konnten zahlreiche Proteine abgetrennt werden. In einem folgenden Fällungsschritt wurde der rot gefärbte Überstand vorsichtig unter gleichen Bedingungen mit 2,61 g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  versetzt, die Salzkonzentration somit auf ca. 95% erhöht und die Lösung über Nacht bei 4°C mittels vorsichtigem Rühren auf einem Magnetrührer gelagert. Am nächsten Tag wurde die Lösung bei 4°C und 5000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das stark rote Pellet wurde in ca. 10 mL 20 mM Ethanolamin gelöst und in einem nächsten Schritt gegen 20 mM Ethanolamin dialysiert (vgl. AAV 27).

**Tabelle 35:** Anteil der Menge an Ammoniumsulfat in g/L für prozentual gesättigte Lösungen.

Erreichte Endsättigung der $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung [%]								
	40	50	60	70	80	90	95	100
Anfangssättigung [%]	Zugabe der Menge an $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ in g pro 1 L Lösung							
0	242	314	390	472	561	657	708	761

### AAV 27. Dialyse des Zellysats

Die Dialyse des Zellysats (vgl. AAV 25) erfolgte mittels Spectra/Por Dialyse Membranen (MWCO: 6-8000) der Firma *Spectrum Laboratories, Inc.*. Hierzu wurde zunächst ca. 20-35 cm der Membran für ca. 30 min in Dialyselösung (20 mM Ethanolamin, pH: 10) inkubiert und die Membranen mehrmals durchspült, indem etwas Dialyselösung in die Membraninnenseite

pipettiert wurde. Nach der Inkubation wurde eines der beiden offenen Enden der Membran mittels einer schweren Magnetklammer verschlossen und das Zellysate vorsichtig in die Membrankammer pipettiert. Anschließend wurde die zweite Öffnung mittels einer Plastikklammer verschlossen, die befüllte Membran in 3 L Dialyselösung überführt und auf einem Magnetrührer bei 4°C platziert. Durch das Verwenden zweier verschiedener schwerer Klammern wurde gewährleistet, dass die Membran senkrecht in der Dialyselösung eintauchen konnte und somit die Membranen mit einem größeren Volumen der Dialyselösung umgeben wurde. Die Lösung wurde nun ca. 3mal im Laufe des Tages durch eine frisch angesetzte ersetzt (in ca. 1,5 h Rhythmus) und die Membranen anschließend bei 4°C über Nacht auf einem Magnetrührer durch leichtes Rühren gelagert. Am nächsten Tag wurde die Lösung nochmals durch frische ersetzt und die Dialyse für 1 h fortgeführt. Das Zellysate wurde anschließend vorsichtig entnommen und die dialysierte Lösung direkt für die folgenden Aufreinigungsschritte verwendet.

#### **AAV 28. Reinigung rekombinanter Proteine mittels Anionenaustauschchromatographie**

Die Reinigung der rekombinanten Myoglobin Proteine **mMb** erfolgte mittels Anionenaustauschchromatographie unter Verwendung eines Äkta Explorer-Systems und einer Anionenaustauschsäule Mono Q 5/50 (Gesamtvolumen  $V_{\text{Ges}} = 1\text{mL}$ ). Hierzu wurden 1 mL der frisch exprimierten und aufgearbeitete Myoglobin Proteine (vgl. AAV 25 bis AAV 27) in das Äkta Explorer-System injiziert und mittels des Anionenaustauschpuffers C (20 mM Ethanolamin) durch Inkubation von ca. 10 mL an die Säule gebunden (Flussrate von 1 mL/min). Die Elution der rekombinanten Proteine erfolgte durch langsamere Erhöhung der NaCl Salzkonzentration mittels eines linearen Gradientenanstiegs des Anionenaustauschpuffers D (20 mM Ethanolamin; 1 M NaCl) von 0 auf 100 Prozent in 35 min. Die Myoglobin Proteine wurden durch eine Absorptionsspektroskopie bei 280 nm (Absorption der aromatischen Aminosäuren) und 410 nm (Absorption des Kofaktors Häm) detektiert. Die Hauptfraktionen wurden gesammelt und der Elutionspuffer (durch gleichzeitiges einengen) mittels Zentrifugationsröhrchen der Firma *GE Healthcare* (5 KDa MWCO Vivaspin 6) zu 1x PBS Puffer (pH: 7.4) ausgetauscht. Die Konzentrationsbestimmungen und Charakterisierung der einzelnen Fraktionen erfolgten spektrometrisch und mittels 12%iger SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese.

## **AAV 29. Reinigung rekombinanter Proteine mittels StrepTactin®-Affinitätschromatographie**

Zur Reinigung rekombinanter Myoglobin Proteine mit einklonierter N-terminaler SrepTag® II Modifizierungen (**mMbSTII**) wurden Strep-Tactin® Gravitations Säulen der Firma *IBA-Life-science* verwendet. Für den Aufreinigungsprozess wurden unterschiedliche Säulen in Bezug auf ihre Ausbeute getestet. Hierzu zählten die *Super-Tactin® Superflow (high capacity)* Säule, die *Strep-Tactin® Superflow* Säule und die *Strep-Tactin® Sepharose* Säule mit einem Säulenvolumen (CV, engl.: „*Column Volume*“) von insgesamt 5 mL, wohingegen die erstgenannte die besten Ergebnisse lieferte. Alle Säulen wurden nach dem Strep-Tag® Aufreinigungsprotokoll der Herstellerangaben verwendet. Hierzu wurde die jeweilig genutzte Säule zunächst mittels zwei CV Waschpuffer W (Puffer W) equilibriert und anschließend mit 10 mL frisch hergestellten Zelllysats (vgl. AAV 24, AAV 25 und AAV 27) beladen. Wichtig hierbei war es zu beachten, dass das Zelllysats vor der Auftragung nach AAV 27 dialysiert wurde, um evtl. vorhandene Biotin-Moleküle im Zelllysats zu entfernen, da Biotin eine höhere Affinität zu Strep-Tactin® aufweist als der StrepTag® II selbst und somit die Bindungsstellen für die StrepTag® modifizierten Fusionsproteine blockieren könnte. Nach der Auftragung des Zelllysats auf der Säule wurde sie mit insgesamt 5 CV Waschpuffer W (Puffer W) gewaschen, um nicht gebundene Moleküle zu entfernen. In einem nächsten Schritt wurden anschließend die Myoglobin Proteine von der Strep-Tactin® Matrix gelöst, indem die Säule in mehreren Schritten mit dem Elutionspuffer (Puffer E) beladen wurde. Hierzu wurde die Säule sechsmal mit 0,5 CV beladen (gesamtes Elutionsvolumen: 3 CV). Um eine schnellere Aufreinigung zu erreichen, konnte in diesem Schritt die Säule auch in drei Schritten mit 0,8 CV, gefolgt von 1,4 CV und letztendlich 0,8 CV durchgeführt werden, um den größten Anteil der StrepTag® Fusionsproteine in der zweiten Fraktion zu eluieren. Die einzelnen Fraktionen wurden mittels UV-Spektroskopie und denaturierender SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese analysiert (vgl AAV 30). Nach dem Elutionsprozess wurde die Säule insgesamt dreimal mit 5 CV Regenerationspuffer (Puffer R) equilibriert (gelbe Färbung der Matrix tritt auf) und anschließend zweimal mit 4 CV Waschpuffer W (Puffer) gewaschen. Konnte in dem Waschprozess keine erfolgreiche Entfärbung der Säule beobachtet werden, wurde die Säule ebenfalls mit 4 CV Puffer W (pH: 10, eingestellt mit 1 M NaOH) gewaschen und anschließend mit 3 CV Puffer W (pH: 8) equilibriert und bei 4°C gelagert.

### AAV 30. Charakterisierung der gereinigten rekombinanten Proteine mittels denaturierender SDS PAGE

Die Charakterisierung der rekombinanten Proteine **mMb** und **mMbSTII** erfolgte mittels 12%-iger denaturierender SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE). Zur Vorbereitung der Proben wurden zunächst die Konzentrationen der gewonnenen Myoglobinvarianten UV-Vis spektrometrisch über das Lambert Beer'sche Gesetz und unter Verwendung der Soretbandenabsorption bei 410 nm bestimmt ( $\epsilon(\text{Mb}_{410\text{ nm}}) = 171000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Anschließend wurden pro isolierte Fraktionen (vgl. AAV 28 und AAV 29) eine 25  $\mu\text{M}$  Proteinlösung mit einem Endvolumen von 12  $\mu\text{L}$  hergestellt und mit 4  $\mu\text{L}$  4x SDS-Ladepuffer versetzt. Die Proben wurden für ca. 3 min in einem Heizblock der Firma *Eppendorf* erhitzt, kurz zentrifugiert und in die Geltaschen aufgetragen. Die Elektrophorese wurde zunächst bei 80 V gestartet und nach Erreichen des Trenngels nach etwa 10 min wurde die Spannung auf 120 V erhöht.

**Tabelle 36:** Zusammenstellung der Lösungen zur Herstellung von SDS-Polyacrylamidgelen.

Lösung	Sammlgel (5 %) [mL]	Trenngel (12 %) [mL]
30%-ige Bisacrylamidlösung	0,67	4
1,5 M Tris/HCl, pH 8,8	/	2,5/
0,5 M Tris/HCl, pH 6,8	1	/
10%-ige SDS Lösung	0,04	0,1
ddH <sub>2</sub> O	2,2	3,3
10%-ige APS Lösung	0,04	0,1
TEMED	0,04	0,004

### AAV 31. Aktivitätstest der exprimierten und gereinigten Myoglobin Mutanten

Für den Aktivitätstest wurden zunächst die Konzentrationen der Myoglobinvarianten **mMb** bzw. **mMbSTII** über die Soretbande bei 410 nm ( $\epsilon(\text{Mb})_{410\text{ nm}} = 171000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) und unter Verwendung der Lambert Beer'schen Gesetzes. Zu 1 pmol der rekombinanten Myoglobinvarianten pro Kavität [50  $\mu\text{L}$ , 20 nM in  $\text{KP}_i$ -Puffer; pH = 6,0] wurde 50  $\mu\text{L}$  einer Amplex<sup>®</sup> Red Lösung mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  gegeben und die enzymatische Aktivität soweit nicht anders vermerkt für 1 h bei Raumtemperatur verfolgt (Die Amplex<sup>®</sup> Red Lösung wurde nach Herstellerangaben vorbereitet). Als Vergleichsprobe wurde mit dem kommerziell erhältlichen Myoglobin (Firma Sigma) analog verfahren. Die Endkonzentrationen der einzelnen Reagenzien betragen: 50  $\mu\text{M}$  Amplex<sup>®</sup> Red, 1 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  und 10 nM Protein. Jede

Messung erfolgte in vierfacher Ausführung bei einer Emmissionswellenlänge  $\lambda_{\text{Em}}$  von 590 nm und unter Verwendung einer Anregungswellenlänge  $\lambda_{\text{Ex}}$  von 530 nm. Die Sensitivität des Geräts betrug 100.

## 5.5 Detaillierte Arbeitsvorschriften (DAV)

### 5.5.1 Experimenteller Aufbau der Licht gesteuerten Reaktion

#### DAV 1. Bestrahlungstest von nativen Myoglobin

Für den Bestrahlungstest des nativen Myoglobins (**Mb**) wurde zunächst eine **Mb** Stammlösung hergestellt. Hierzu wurden 5 mg lyophilisiertes **Mb** aus dem Pferdeskelettmuskel (95-100%, *Sigma-Aldrich*) in PBS pH 7,1 gelöst und mittels einer NAP-5-Säule gefiltert, um überschüssige Salze zu entfernen. Anschließend wurden zur Bestrahlung eine 50  $\mu\text{M}$  Myoglobin-Lösung in Acetonitril und PBS-Puffer (Verhältniss: 1:1; Endvolumen = 1 mL) hergestellt und die Lösung in ein Schnappdeckel-Reagenzglas (sog. Headspace vial von *Pyrex*, 20 mm Durchmesser) überführt und luftdicht verschlossen. Um eine sauerstoffarme Atmosphäre herzustellen, wurde die Probe mehrmals vorsichtig mit Argon gespült. Die Bestrahlung wurde über Nacht (ca. 12 h) in einem selbstgebauten Photoreaktor (vgl. Kapitel 5.2.10) durchgeführt. Nach der Bestrahlung wurde der Pufferwechsel vollzogen, indem die Probe durch Gelfiltration mit einer NAP-5 Säule (*GE Healthcare*) behandelt wurde. Die Konzentration wurde spektrometrisch bestimmt und das bestrahlte Myoglobin zunächst mittels 12%-iger denaturierender SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese charakterisiert.

Zur Charakterisierung wurde eine 25  $\mu\text{M}$  Lösung hergestellt (Endvolumen 12  $\mu\text{L}$ ) und mit 4  $\mu\text{L}$  4x Ladepuffer versetzt. Die Probe wurde für ca. 3 min auf 90 °C in einem Heizblock erhitzt und direkt zur Analyse verwendet. Als Negativkontrolle wurde analog eine native Mb Lösung hergestellt. Die Proben wurden in die Taschen aufgetragen und die Elektrophorese nach AAV 30 durchgeführt.

#### DAV 2. Charakterisierung des bestrahlten DNA Einzelstranges mittels nicht denaturierender Polyacrylamidgelelektrophorese

Für den Bestrahlungstest der ssDNA **NH<sub>2</sub>D1** wurde eine Stammlösung (100  $\mu\text{M}$ ) in ein Schnappdeckel-Reagenzglas (sog. Headspace vial von *Pyrex*, 20 mm Durchmesser) überführt, luftdicht verschlossen und vorsichtig mit Argon gespült, um eine sauerstoffarme Atmosphäre zu erschaffen. Die Bestrahlung wurde in einem selbstgebauten Photoreaktor (vgl. Kapitel

5.2.10) durchgeführt und nach jeweils 0,5 h, 1 h, 1,5 h, 2h und 12 h ein Aliquot an ssDNA entnommen. Die Aliquote wurde über Nacht bei 4 °C gelagert und am nächsten Tag mittels nicht denaturierender 21%-iger Polyacrylamidgelelektrophorese analysiert (vgl. Tabelle 37). Hierzu wurden 20 pmol der jeweiligen Proben (ca. 5 µL) mit 1 µL 6x Ladepuffer versetzt und in die Geltaschen aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte in TBE 1x Puffer für ca. 1h bei 100 V und das Gel wurde anschließend nach AAV 9 mittels SYBR Gold gefärbt. Die Dokumentation erfolgte mit Hilfe des GelDoc™ XR Visualisierungssystems der Firma *BioRad*.

**Tabelle 37:** Zusammensetzung der Lösungen zur Herstellung von nicht denaturierenden 21%-igen TBE-Polyacrylamidgelen.

Lösung	Volumen [mL]
30%-ige Bisacrylamidlösung	8,4 mL
5x TBE Puffer	2 mL
ddH <sub>2</sub> O	1,6 mL
10%-ige APS Lösung	100 µL
TEMED	5 µL

### DAV 3. Hybridisierungstest des bestrahlten DNA Einzelstranges

Für den Hybridisierungstest wurden zunächst 100 µL [100 µM] Stammlösungen der **NH<sub>2</sub>D1** bzw. **cD1** ssDNA mit jeweils 350 µL PBS Puffer und 450 µL Acetonitril versetzt. Anschließend wurden die Lösungen in ein Schnappdeckel-Reagenzglas (sog. Headspace vial von *Pyrex*, 20 mm Durchmesser) überführt, luftdicht verschlossen und vorsichtig mit Argon gespült, um eine sauerstoffarme Atmosphäre zu erschaffen. Die Bestrahlung erfolgte über Nacht in einem selbstgebauten Photoreaktorsystem (vgl. Kapitel 5.2.10). Am nächsten Tag wurde das Lösungsmittel mittels eines Konzentrator Plus System der Firma *Eppendorf* im Vakuum entfernt und die DNA Pellets in 100 µL ddH<sub>2</sub>O gelöst. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte UV-Vis spektromtrisch und die Proben wurden direkt für einen Hybridisierungstest verwendet. Für den Hybridisierungstest wurden alle möglichen Kombinationen zwischen nicht bestrahlter (**NH<sub>2</sub>D1** und **cD1**) und der jeweiligen bestrahlten (**NH<sub>2</sub>D1\*** und **cD1\***) Einzelstränge getestet, indem die komplementären Stränge für ca. 30 min bei RT mit einem Verhältnis von 1:1 (jeweils 30 pmol in einem Gesamtvolumen von 10 µL) inkubiert wurden. Die Charakterisierung erfolgte anschließend mittels 21%-iger nativer Polyacrylamidgelelektrophorese (vgl. Tabelle 37; DAV 2), indem die Hybridisierungsproben

mit 2  $\mu\text{L}$  6x Ladepuffer versetzt und in die Geltaschen aufgetragen wurden. Die Elektrophorese erfolgte für ca. 1h bei 100 V und das Gel wurde anschließend nach AAV 9 mittels SYBR Gold gefärbt. Die Dokumentation erfolgte mit Hilfe des GelDoc™ XR Visualisierungssystems der Firma *BioRad*.

#### **DAV 4. Charakterisierung des bestrahlten DNA Einzelstranges mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie**

Zur Charakterisierung der bestrahlten **NH<sub>2</sub>D1** bzw. **cd1** ssDNA mittels HPLC wurden die Proben zunächst nach DAV 3 in dem Photoreaktorsystem bestrahlt und am nächsten Tag wurde das Lösungsmittel mittels eines Konzentrator Plus System der Firma *Eppendorf* im Vakuum entfernt. Die Pellets wurden 100  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O gelöst und in das HPLC System injiziert. Als Vergleich wurde ebenfalls ein Chromatogramm der nicht bestrahlten **NH<sub>2</sub>D1** bzw. **cd1** ssDNA aufgenommen. Die chromatographische Trennung erfolgte mittels eines Standardgradienten zwischen 0,1 M Ammoniumacetat und Acetonitrillösung (vgl. Tabelle 38).

#### **DAV 5. Kupplung des Photoenolderivats an die DNA**

##### **DAV 5.1. Abspaltung der Dimethoxytrityl Schutzgruppe**

Zur Synthese der Photoenol modifizierten ssDNA wurde die ssDNA **NH<sub>2</sub>D1** verwendet, welche von der Firma Sigma erworben wurde. Die ssDNA war hierbei über das 3'-Ende an poröses Glas (CPG, engl.: „*Controlled Pore Glass*“) gekoppelt, wobei das 5'-Ende geschützt mittels Dimethoxytrityl (DMT) vorlag. Die DMT Schutzgruppe wurde mittels 1 mL Dichloressigsäure abgespalten, indem die Festphasensäulen mehrmals mittels einer 1 mL Spritze langsam „durchspült“ wurden. Die erfolgreiche Entschützung konnte visuell anhand eines Farbumschlages von farblos nach gelb wahrgenommen werden. Nach der Entschützung wurde die Festphasensäule insgesamt 3mal mit 1 mL Acetonitril (CH<sub>3</sub>CN) und jeweils 3mal mit 1 mL Dimethylformamid (DMF) gewaschen, bis die Lösungsmittel keine gelbliche Färbung mehr aufwiesen. Die Festphase wurde anschließend vorsichtig mittels Druckluft getrocknet, aus der Festphasenfassung durch das Kappen einer Säulenseite geöffnet und die Festphasenkügelchen in ein 1,5 mL Eppendorfgefäß überführt. Die vorbereitete Festphase würde direkt für die weitere FMP-Derivat Kupplung verwendet.

### **DAV 5.2. Aktivierung der Carboxylgruppe des FMP-Derivats**

Zur Aktivierung der Carboxylgruppe des FMP-Derivats **BL-1** wurden 45 µmol des Crosslinkers (1 Äq.) mit 45 µmol 1-Hydroxybenzotriazol (HOBt; 1 Äq.) und 45 µmol 2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphat (HBTU; 1 Äq.) in 300 µL Dimethylformamid/Acetonitril (DMF/CH<sub>3</sub>CN; Verhältnis 1:1) mit 10 µL Diisopropylethylamin (DIPEA) gelöst und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das aktivierte FMP-Derivat wurde nach der Inkubation direkt für die folgende ssDNA Kupplung verwendet.

### **DAV 5.3. Kupplung des FMP-Derivats an die ssDNA über die Festphasenstrategie**

Das aktivierte FMP-Derivat **BL-1** (vgl. DAV 5.2) wurde zur entschützten CPG-ssDNA (vgl. DAV 5.1) pipettiert und für ca. 1,5 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation wurde der Überstand mittels Zentrifugation für 30 s bei 13200 rpm von der Festphase abgetrennt und verworfen. Anschließend wurde die Festphase 3mal mittels 200 µL DMF und 3mal mittels 200 µL Acetonitril durch jeweiligen Abtrennen des Überstandes durch Zentrifugation (13200 rpm, 30 s) gewaschen und die Festphase vorsichtig mittels Druckluft getrocknet. Die Photoenol modifizierte CPG-ssDNA wurde durch Inkubation in 1,5 mL 25%iger Ammoniaklösung bei 55 °C über Nacht von der CPG-Festphase abgespalten und das CPG mittels Zentrifugation (13200 rpm 2 min) entfernt, indem der Überstand vorsichtig abgetrennt und in ein 1,5 mL Eppendorf Gefäß übertragen wurde. Anschließend wurde die Ammoniaklösung unter Vakuum entfernt, das ssDNA Pellet in 200 µL ddH<sub>2</sub>O gelöst und die Lösung mittels eines Spartan-Filters (0,2 µm) der Firma *GE-Healthcare* gefiltert, um restliche CPG Kügelchen zu entfernen. Die modifizierte ssDNA wurde weiter mittels HPLC gereinigt.

### **DAV 5.4. Reinigung und Charakterisierung der FMP modifizierten ssDNA**

Die Reinigung der **FMP-D1** erfolgte über Umkehrphasen-Hochdruckflüssigkeitschromatographie (engl.: „*Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography*“, rp-HPLC). Nach Abspaltung der **FMP-D1** von der Festphase (vgl. DAV 5.3) wurde die Lösung in das System injiziert und die chromatographische Trennung mittels eines Gradienten zwischen 0,1 M Ammoniumacetat und Acetonitrillösung durchgeführt (vgl. Tabelle 38). Hierbei wurde die ssDNA Absorption bei 260 nm und die Photoenolabsorption bei 317 nm

verfolgt. Nach der Trennung wurden die Hauptfraktionen in ein 1,5 mL Eppendorf Gefäß übertragen und das Lösungsmittel im Rotationsverdampfer entfernt. Es folgte eine Resuspendierung der ssDNA Pellets in ddH<sub>2</sub>O und eine Behandlung mittels NAP<sup>TM</sup>- 5 Gelfiltrationssäulen der Firma *GE-Healthcare*, um entsprechende Salze zu entfernen. Die filtrierte Lösung wurde im Vakuum auf ca. 200 µL eingengt und die Konzentrationen spektrometrisch bestimmt. Die Fraktionen wurden letztendlich mittels MALDI-TOF und 21%iger nativer Polyacrylamidgelelektrophorese charakterisiert.

**Tabelle 38:** Darstellung der Gradienten für die Aufreinigung der modifizierten Photoenol-ssDNA mittels rp-HPLC. Die Tabelle gibt den prozentualen Anteil des Elutionslösungsmittels B in Abhängigkeit der Elutionszeitzeit wieder. **Lösungsmittel A:** Ammoniumacetat in Wasser, **Lösungsmittel B:** Acetonitril.

Zeit [min]	Anteil B [%]
0	0
10	5
15	10
20	15
25	30
32	80
40	100
45	0

#### DAV 6. Funktionalisierung von Myoglobin mittels Sulfosuccinimidyl 4-(N-maleimidomethyl)-cyclohexan-1-carboxylat

Ca. 6-8 mg lyophilisiertes Myoglobin (Mb) aus dem Skelettmuskel des Pferdes (Firma *Sigma*) wurden in PBS Puffer (pH = 7,4) gelöst und die Lösung mittels NAP<sup>TM</sup>- 5 Gelfiltrationssäulen der Firma *GE-Healthcare* behandelt, um entsprechende Salze zu entfernen. Anschließend wurden zu 570 µL Mb Lösung [335 µM; 158 nmol, 1 Äq.] in PBS Puffer (pH=7,4) ca. 22 µL sSMCC [76,7 mM, 1,69 pmol, 11 Äq.] in DMF gegeben und die Mixtur für 1,5 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Lösung mittels NAP<sup>TM</sup>-5 und NAP<sup>TM</sup>-10 Gelfiltrationssäulen behandelt, um die überschüssigen nicht reagierten sSMCC Moleküle zu entfernen und die Konzentration spektrometrisch bestimmt. Die frisch präparierte sSMCC-Mb Konjugatlösung wurde direkt für die lichtinduzierte Konjugation eingesetzt.

### DAV 7. Lichtinduzierte Konjugation von FMP-D1 mit Mb-Mal

Für die lichtinduzierte Konjugation wurden 300 µL sSMCC modifiziertes Myoglobin [82 µM; 25 nmol; 1 Äq.] (vgl. DAV 6) mit 150 µL der synthetisieren und gereinigten **FMP-D1** [135 µM; 20 nmol; 0,8 Äq.] (vgl. DAV 5.4) in ein Schnappdeckel-Gläschen (sog. „headspace vials“ der Firma *Pyrex* mit einem Durchmesser von 20 mm) überführt. Anschließend wurde 450 µL Acetonitril hinzu pipettiert und Reaktionsgefäß luftdicht verschlossen. Um eine sauerstoffarme Atmosphäre zu gewährleisten, wurde die Lösung vorsichtig für ca. 15 min mit Argon gespült und in einem selbstgebauten Photoreaktorsystem (vgl. 5.2.10) über Nacht bei 320 nm bestrahlt. Nach der Bestrahlung wurde die Reaktionslösung mittels Ultrafiltrationsröhrchen der Firma GE Healthcare (5 KDa MWCO Vivaspin 6) konzentriert und ein Pufferwechsel zu 20 mM Tris (pH=8.3) durchgeführt. Die Reinigung der Konjugate erfolgte mittels Anionenaustausch-chromatographie unter Verwendung einer Mono Q 5/50 Säule der Firma *GE Healthcare* (**Flussrate:** 1 mL/min; **(Lauf-)Puffer A:** 20mM Tris, pH=8,2; **(Elutions-)Puffer B:** 20 mM Tris, 1 M NaCl, pH=8,3.). Nach der Reinigung wurden die Hauptfraktionen gesammelt, der Puffer gegen PBS (1x) Puffer mittels Ultrafiltrationsröhrchen getauscht und die Konzentrationen spektroskopisch bestimmt, bevor die Fraktionen mittels nicht denaturierender 12%-iger Polyacrylamidgelelektrophorese charakterisiert wurden.

### 5.5.2 Kovalente DNA Kupplung über Tyrosine

#### DAV 8. Kupplung von Crosslinker BL-4, BL-5 und BL-6 an L-Tyrosin

Eine L-Tyrosin Lösung in ddH<sub>2</sub>O [ca. 2,67 mM, 1,38 µmol] wurde zu 2,84 µmol einer frisch hergestellten aktivierten bifunktionellen Linker Lösung gegeben (zur Herstellung: 2,84 µmol der Linker wurden mit 2,84 µmol Pyridin (Pyr) und 2,84 µmol N-Bromsuccinimid (NBS) für 5 min in DMF auf Eis inkubiert) und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Beendigung der Reaktion (verfolgt mittels Dünnschichtchromatographie, DC) wurde das Lösungsmittel unter Vakuum entfernt und die Produkte massenspektrometrisch mittels hoch auflösenden „*Fast Atomic Bombardment* (FAB)“ charakterisiert. **MS. HRMS (FAB): BL-4\_Tyr** C<sub>28</sub>H<sub>32</sub>N<sub>5</sub>O<sub>11</sub> [M+H]<sup>+</sup> *theor.:* 614,2096; *gefunden:* 614,2098; **BL-5\_Tyr** C<sub>24</sub>H<sub>30</sub>N<sub>7</sub>O<sub>9</sub> [M+H]<sup>+</sup> *theor.:* 560,2103; *gefunden:* 560, 2105; **BL-6\_Tyr** C<sub>33</sub>H<sub>41</sub>N<sub>5</sub>O<sub>10</sub> [M+H]<sup>+</sup> *theor.:* 686,2; *gefunden:* 686,2.

### **DAV 9. Aktivierung der Tyrosin bindenden Crosslinker und anschließende Protein Kupplung**

Jeweils 2,5  $\mu\text{mol}$  der bifunktionellen Linker **BL-4**, **BL-5** bzw. **BL-6** [62, 5 mM in DMF] wurden mit 2,5  $\mu\text{mol}$  Pyridin (Pyr) und 2,5  $\mu\text{mol}$  N-Bromsuccinimid (NBS) für 5 min auf Eis in DMF inkubiert. Bei allen Linkern konnte eine schnelle Farbänderungen von farblos zu dunkel rot beobachtet werden. Die frisch aktivierten Linker wurden direkt für die Proteinkupplung verwendet: 0,12  $\mu\text{mol}$  Streptavidin (STV) [300  $\mu\text{M}$ ] bzw. 0,12  $\mu\text{mol}$  Myoglobin vom Pferdeherz (Mb) [300  $\mu\text{M}$ ] in 1xPBS Puffer (pH = 7,1) wurden jeweils mit einem 10fachen Überschuss [1,2  $\mu\text{mol}$ ] der entsprechenden frisch aktivierten Linker für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert (Anteil an DMF ca. 10 %). Nach der Inkubation wurden die Lösungen mittels Größenausschluss-chromatographie Säulen NAP<sup>TM</sup>- 5 und NAP<sup>TM</sup>-10 der Firma *GE-Healthcare* („Sephadex<sup>TM</sup> G25 DNA Grade“ Säulen) behandelt, um die nicht reagierten und kleinen organischen Moleküle NBS und Pyr zu entfernen. Die Lösungsmixtur aus modifizierten und nicht modifizierten Proteinen wurden anschließend für die ssDNA Kupplung verwendet (nicht modifizierte bzw. „reaktive“ Proteine konnten nach der ssDNA Kupplung über Anionenaustauschchromatographie voneinander abgetrennt werden).

### **DAV 10. Fluorophorkupplung an Tyrosin modifizierten Streptavidin und Myoglobin**

Jeweils 0,8  $\mu\text{mol}$  der frisch aktivierten bifunktionellen Linker [80 mM in DMF] (vgl. DAV 9) wurden zu 20 nmol Proteinlösung von Streptavidin (STV) bzw. Myoglobin vom Pferdeherz (Mb) in 1xPBS Pufferlösung (pH = 7,4) gegeben und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert (DMF Anteil ca. 15 %). Die Reaktionslösungen wurden mittels Gelfiltrationssäulen NAP<sup>TM</sup>- 5 und NAP<sup>TM</sup>-10 der Firma *GE-Healthcare* („Sephadex<sup>TM</sup> G25 DNA Grade“ Säulen) behandelt, um die nicht reagierten Linker und kleinen organischen Moleküle N-Bromsuccinimid (NBS) und Pyridin (Pyr) zu entfernen. In einem nächsten Schritt wurden 0,4  $\mu\text{mol}$  des Thiol funktionalisierten Fluorophor Acetylmercapto-Succinoyl-Aminofluorescein (**SAMSA**), Azid modifizierten Fluorophor (**AzF**) oder Cyclooctin Fluorescein (**COF**) zu den entsprechenden mit bi-funktionellen Linker modifizierten Proteinen gegeben und über Nacht bei 4 °C im dunkeln inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Lösungen mittels Gelfiltrationssäulen behandelt und mittels Zentrifugationsröhrchen der Firma *GE Healthcare* (5 kDa MWCO Vivapins 6 für Mb und 10 kDa MWCO Vivapins 6 für STV) auf ein Endvolumen von ca. 200  $\mu\text{L}$  konzentriert. Die erfolgreiche Kupplung der Fluorophore auf die

entsprechende Proteinoberfläche wurde mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (12 % SDS-PAGE) und Absorptionsspektroskopie verifiziert. Als Negativkontrollen wurden die nativen Proteine STV und Mb unter den gleichen experimentellen Konditionen behandelt und analysiert. Für die Berechnung des stöchiometrischen Verhältnisses wurde mittels der ermittelten Absorption und unter Anwendung des Lambert-Beerschen Gesetzes die Konzentration der jeweiligen Proteine und Fluorophore bestimmt. Die verwendeten Extinktionskoeffizienten sind in der folgenden Tabelle 39 dargestellt.  $\epsilon_{A495}(\text{SAMSA}) = 80000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Während das Fluorophor SAMSA von der Firma Sigma gekauft wurde, wurde der Farbstoff **AzF** von Prof. O. S. Wolfbeis (Universität Regensburg)<sup>203</sup> und der Farbstoff **COF** von Prof. S. Braese (Karlsruher Institut für Technologie) zur Verfügung gestellt.

**Tabelle 39:** Verwendete Fluorophore und ihre Extinktionskoeffizienten zur Berechnung des Protein/Fluorophor Verhältnisses über das Lambert Beer'sche Gesetz.

Fluorophor	Absorptionsmaximum	Extinktionskoeffizient [ $\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ]	Herkunft
SAMSA	495	80000	Sigma
AzF	630	18197	Geschenk von Prof. O. S. Wolfbeis (Universität Regensburg)*
COF	495	80000	Geschenk von Herrn Prof. S. Bräse (Karlsruher Institut für Technologie)

\* vgl. Referenz<sup>203</sup>

## DAV 11. DNA Kupplung an die Tyrosin modifizierten Zielproteine

Zur DNA Modifizierung wurden alle <sup>POI</sup>BL-X Konjugate frisch hergestellt und direkt verwendet (vgl. DAV 9).

### DAV 11.1. Protein-DNA Konjugation mittels einer Thiol-Michael Reaktion

Für die DNA Modifizierung mittels der Thiol-Michael Reaktion wurden 10 nmol der SHD2 bzw. SHD3 Stammlösungen [100  $\mu\text{M}$  in 100  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O] mit 60  $\mu\text{mol}$  Dithiothreitol (DTT) [1 M] versetzt und 2 h bei Raumtemperatur inkubiert, um die Disulfidbrücken der ssDNA Biomoleküle zu reduzieren. Nach der Inkubation wurden die kleinen DTT Moleküle mittels NAP<sup>TM</sup>- 5 und NAP<sup>TM</sup>-10 Gelfiltrationssäulen der Firma *GE-Healthcare* entfernt, wobei die ssDNA SHD2 bzw. SHD3 in 1xPBS Puffer (pH = 7,4) eluiert wurden. Diese Lösungen wurden anschließend mit 60 nmol einer frisch hergestellten <sup>POI</sup>BL-4 Lösungen [80

$\mu\text{M}$ ] vereinigt, über Nacht bei 4 °C im Dunkeln inkubiert und am folgenden Tag mittels Zentrifugationsröhrchen der Firma *GE Healthcare* (5 KDa MWCO Vivaspin 6 für Mb und 10 kDa MWCO Vivapins 6 für STV) mehrmals in 20 mM Tris Puffer (pH = 8,3) umgepuffert und auf ein Endvolumen von ca. 1 mL eingengt. Die Konjugate wurden nach AAV 1 mittels Anionenaustauschchromatographie unter Verwendung einer Mono Q 5/50 Säule der Firma *GE-Healthcare* gereinigt.

### **DAV 11.2. Protein-DNA Konjugation mittels einer Kupfer katalysierten Alkin-Azid Cycloaddition (CuAAC)**

Zur Modifizierung der Proteine mittels Kupfer(I) katalysierte Alkin-Azid Cycloaddition (CuAAC; „*Copper(I)-Catalyzed-Azide-Alkyne-Cycloaddition*“) wurden zunächst in ddH<sub>2</sub>O 100 nmol CuSO<sub>4</sub> mit 5  $\mu\text{mol}$  Natriumascorbat vermischt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. In der Lösung konnte eine Farbänderung von leicht blau zu leicht braun beobachtet werden und die Cu<sup>1+</sup>-Ionen wurden durch die Zugabe von Tris(3-Hydroxypropyl-triazolylmethyl)amin (THPTA) stabilisiert. Die Lösung wurde anschließend zu 10 nmol alkD2 bzw. alkD3 ssDNA [100  $\mu\text{M}$  in 100  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O] gegeben, für 5 min auf Eis inkubiert, und mit 60 nmol einer frisch hergestellten <sup>POI</sup>BL-5 Lösungen [80  $\mu\text{M}$ ] vereinigt. Die Mischung wurde mittels 1xPBS Pufferlösung (pH = 7,4) auf ein Endvolumen von 1 mL erhöht und bei 4 °C im Dunkeln und über Nacht inkubiert. Die Endkonzentrationen betragen 100  $\mu\text{M}$  CuSO<sub>4</sub>, 500  $\mu\text{M}$  THPTA, 5 mM Natriumascorbat und 10  $\mu\text{M}$  alkD2 bzw. alkD3 ssDNA. Am folgenden Tag wurde mittels Zentrifugationsröhrchen der Firma *GE Healthcare* (5 KDa MWCO Vivaspin 6 für Mb und 10 kDa MWCO Vivapins 6 für STV) ein Pufferwechsel in 20 mM Tris Puffer (pH = 8,3) durchgeführt und die Lösungen auf ein Endvolumen von ca. 1 mL eingengt. Die Konjugate wurden nach AAV 1 mittels Anionenaustauschchromatographie unter Verwendung einer Mono Q 5/50 Säule der Firma *GE-Healthcare* gereinigt.

### **DAV 11.3. Protein-DNA Konjugation mittels einer spannungsvermittelten Kupfer freien Cycloaddition**

Zur Synthese der DNA-Protein Konjugate mittels Kupfer freier Huisgen Cycloaddition wurden 60 nmol einer frisch hergestellten <sup>POI</sup>BL-6 Lösung zu 10 nmol Azid-modifizierter ssDNA azD2 bzw. azD3 [Stammlösungen: 100  $\mu\text{M}$  in 100  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O] gegeben und die Lösung über Nacht bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Am folgenden Tag wurde mittels Zentrifugationsröhrchen der Firma *GE Healthcare* (5 KDa MWCO Vivaspin 6 für Mb und 10

kDa MWCO Vivapins 6 für STV) ein Pufferwechsel in 20 mM Tris Puffer (pH = 8,3) durchgeführt und die Lösungen auf ein Endvolumen von ca. 1 mL aufkonzentriert. Die Konjugate wurden nach AAV 1 mittels Anionenaustauschchromatographie unter Verwendung einer Mono Q 5/50 Säule der Firma *GE-Healthcare* gereinigt (**Flussrate:** 1 mL/min; **Puffer A:** 20mM Tris, pH = 8,2; (**Elutions-)****Puffer B:** 20 mM Tris, 1 M NaCl, pH = 8,3).

#### **DAV 12. Charakterisierung der gereinigten Protein-DNA Konjugate mit nicht denaturierender Polyacrylamidgelelektrophorese**

Die Konzentrationen der einzelnen gereinigten Fraktionen wurden UV-Vis spektrometrisch nach Kapitel 3.1.5 und AAV 3 bestimmt. Anschließend wurden ca. 30 pmol der gereinigten Protein-Fraktionen für die weiteren Charakterisierungen verwendet. Die Charakterisierung der Fraktionen erfolgte mittels 12%-iger nicht denaturierender Polyacrylamidgelelektrophorese nach AAV 2. Zur Analyse wurden ca. 30 pmol an Protein-DNA Konjugate in die Geltaschen aufgetragen und die Elektrophorese nach AAV 2 durchgeführt. Die Visualisierung der Banden erfolgte durch eine abgestufte Färbemethode. Zunächst wurden die ssDNA Stränge mittels SYBR<sup>®</sup>-Gold und anschließend die Proteine mittels einer Silberfärbung gefärbt (vgl. AAV 9 und AAV 8).

#### **DAV 13. Hybridisierungstest der Tyrosin modifizierten Protein-DNA Konjugate**

Die „Funktionalität“ der Protein-DNA Konjugate wurde mittels eines Hybridisierungstests überprüft. Hierzu wurden 40 pmol der aufgereinigten Protein-DNA Konjugate mit einem 10fachen Überschuss Fluorophor markierter komplementärer Oligonukleotide inkubiert. Die Inkubation erfolgte für ca. 30 min bei Raumtemperatur und die erfolgreichen Hybridisierungsprozesse wurden mittels 12%-iger nativer Polyacrylamidgelelektrophorese (native-PAGE) nach AAV 2 charakterisiert. Hierzu wurden die Gele in einem ersten Schritt nur unter UV-Bestrahlung visualisiert, um die Positionen der Fluorophor markierten komplementären Oligonukleotiden zu bestimmen. In einem zweiten Schritt wurden dann anschließend die DNA Moleküle mittels SYBR<sup>®</sup> Gold angefärbt, während in einem letzten Färbeschritt die Positionen der Proteine mittels Silberfärbung charakterisiert wurden.

### 5.5.3 Methoden zur Analyse des DNA Origamis

#### DAV 14. Gestaltung und Assemblierung des DNA Origamis

Die Gestaltung des DNA Origamis erfolgte mittels des Computerprogramm SARSE<sup>104</sup>, während die Assemblierung nach dem Protokoll von Rothemund<sup>29</sup> erfolgte. Zur Assemblierung wurde eine Lösung mit einem Endvolumen von 500  $\mu\text{L}$  hergestellt, wobei die Endkonzentration der Helferstränge 160 nM und die Endkonzentration des Scaffoldstranges M13Mp18 1,6 nM betragen. Zur Herstellung der 500  $\mu\text{L}$  Lösung wurden zunächst 100  $\mu\text{L}$  TEMg 5x Puffer vorgelegt und anschließend die einzelnen 220 Helferstränge (vgl. Anhang Kapitel 11.3.1) in das Eppendorfgefäß pipettiert. Zu guter Letzt wurde die entsprechende Menge des M13Mp18 Stranges hinzu pipettiert und das Volumen mittels ddH<sub>2</sub>O auf 500  $\mu\text{L}$  aufgefüllt. Die Probe wurde für 2 min auf 90 °C erhitzt, kurz für 2 s zentrifugiert und die 500  $\mu\text{L}$  Assemblierungsprobe direkt in insgesamt 5 PCR Gefäße à 100  $\mu\text{L}$  übertragen. Für den Assemblierungsprozess wurden die Proben von 90 °C auf 4 °C (0,1 °C pro Sekunde) abgekühlt, indem ein MJ Mini Personal Thermal Zyklus der Firma *BioRad* verwendet wurde. Nach dem Assemblierungsprozess wurden die einzelnen Proben gevortext, kurz zentrifugiert, die Aliquote wieder in einem 1 mL Eppendorfgefäß vereinigt und direkt für weitere Analysen verwendet.

#### DAV 15. Charakterisierung des DNA Origamis mit Agarosegelelektrophorese

Die Charakterisierung des assemblierten DNA Origamis (**Ori**) erfolgte mit 1%-iger Agarosegelelektrophorese. Hierzu wurden zunächst 1 g Agarose in 100 mL TAE 1x Puffer gegeben und in einer Mikrowelle gelöst. Die Befüllung der Agarosekammer erfolgte nach Herstellerangaben und das Gel wurde für ca. 1 h bei Raumtemperatur ausgehärtet. Anschließend wurden ca. 10  $\mu\text{L}$  der Origamistammlösung mit 2  $\mu\text{L}$  6x Ladepuffer versetzt und in die Taschen aufgetragen. Als Vergleichsprobe wurde ebenfalls der M13Mp18 Einzelstrang in das Gel beladen. Die elektrophoretische Trennung erfolgte für ca. 1 h bei 50 V., indem 1x TAE Laufpuffer verwendet wurde. Das Gel wurde anschließend mittels Ethidiumbromid nach AAV 10 gefärbt.

#### DAV 16. Assemblierung des DNA Origamis mit Fängeroligonukleotiden

Die Assemblierung des Origamis mit Fängeroligonukleotiden (**Ori<sub>Mod</sub>**) erfolgte analog zu DAV 14. Zur Assemblierung wurden lediglich die modifizierten Helferstränge mit den

entsprechenden nicht modifizierten Helfersträngen ausgetauscht und zur Assemblierung verwendet (vgl. Anhang Kapitel 11.3.1).

### **DAV 17. Charakterisierung der immobilisierten Myoglobin-DNA Konjugaten mittels Agarosegelelektrophorese**

Zur Charakterisierung der immobilisierten Myoglobin-DNA Konjugate wurde zunächst eine **Ori<sub>Mod</sub>** Stammlösung nach DAV 16 assembliert. Die Stammlösung wurde vorsichtig bei 1000 rpm für ca. 1 min mittels 5 kDa Vivaspins der Firma *GE Healthcare* zentrifugiert und auf ca. 20 µL aufkonzentriert. Anschließend wurden 4 µL der Lösung mit 15 µL TEMg 1x Puffer und 1 µL (20 pmol) der jeweiligen Myoglobin-DNA Konjugate (<sup>Mb</sup>**BL-4<sub>D2</sub>**, <sup>Mb</sup>**BL-4<sub>D3</sub>** bzw. <sup>Mb</sup>**BL-4<sub>D2</sub>** + <sup>Mb</sup>**BL-4<sub>D3</sub>**) versetzt und für ca. 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Als Negativkontrolle wurde ebenfalls das nicht modifizierte Origami (**Ori**) assembliert und analog behandelt. Nach der Inkubation wurden die Proben mit 4 µL 6x Ladepuffer versetzt und eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt. In diesem Fall wurde ein 0,75%-iges Agarosegel vorbereitet, indem 1 g Agarose in 1x TBE Puffer gelöst wurde. Die Elektrophorese erfolgte bei 4 °C bei 80 V für ca. 2 h, indem 1x TBE Laufpuffer verwendet wurde. Das Gel wurde anschließend mittels Ethidiumbromid nach AAV 10 gefärbt und mit Hilfe des GelDoc<sup>TM</sup> XR Visualisierungssystems der Firma *BioRad* dokumentiert.

### **DAV 18. Charakterisierung des Origamis mittels Rasterkraftmikroskopie**

Die Charakterisierung des DNA Origamis erfolgte mit einem hochauflösendem Rasterkraftmikroskop (AFM). Hierzu wurden zunächst 5µL der frisch hergestellten Origamiprobe auf eine Glimmroberfläche pipettiert („*Mica surface*“), welche zuvor mit einem Klebeband bearbeitet wurde, um eine glatte Oberfläche zu erzeugen. Nach einer drei minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Probe mit 15 µL TAEMg 1x Puffer (40 mM Tris, 20 mM Essigsäure, 2 mM EDTA, 12,5 mM Magnesiumacetat, pH 8) versetzt und für weitere 10 min inkubiert. Die einzelnen Proben wurden mittels eines „Tapping modes“ gescannt, indem ein Multimode<sup>TM</sup> Mikroskop (*Veeco Metrology*), welches mit einem Nanoscope IV Kontroller ausgestattet war, verwendet wurde. Für das Scannen wurden „*Cantilever*“ mit scharfen und pyramidalen Spitzen und einer Kraftkonstante von 0,58 N/m (SNL-10 Tips) der Firma *Veeco Metrology* verwendet. Die Amplitudensollwert wurde unter 1 Volt gehalten und die Scanraten befanden sich zwischen 1 Hz und 2 Hz. Alle Bilder wurden mittels des Computerprogramms NanoScope 6.14 analysiert.

## 6 *Abkürzungsverzeichnis*

3-HPA	3-Hydroxypicolinsäure
AAV	Allgemeine Arbeitsvorschrift
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Äq.	Äquivalente
BL	<b>B</b> ifunktioneller <b>L</b> inker
bp	Basenpaare
CuAAC	<b>K</b> upfer(I) katalysierte <b>A</b> lkin- <b>A</b> zid <b>C</b> ycloaddition (engl.: <b>C</b> opper(I)- <b>C</b> atalyzed- <b>A</b> zide- <b>A</b> lkyne- <b>C</b> ycloaddition)
d	Tage (engl.: <b>D</b> ays)
DAV	Detaillierte Arbeitsvorschriften
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
DHB	Dihydroxybenzoesäure
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl.: <b>D</b> esoxyribonucleic <b>A</b> cid)
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
dsDNA	Doppelstrang-DNA (engl.: <b>D</b> ouble <b>S</b> tranded <b>D</b> N <b>A</b> )
DTT	Dithiothreitol
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid

<i>et al.</i>	<i>et alii</i> , und andere
EtBr	Ethidiumbromid
FAB	engl.: <b>F</b> ast <b>A</b> tom <b>B</b> ombardment
FPLC	Schnelle Flüssigkeitschromatographie (engl.: <b>F</b> ast <b>P</b> rotein <b>L</b> iquid <b>C</b> hromatography)
g	Gramm
h	Stunde
HBTU	O-(Benzotriazol-1-yl)-N, N, N',N'-Tetramethyluronium hexafluorophosphat
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie (engl.: <b>H</b> igh <b>P</b> ressure <b>L</b> iquid <b>C</b> hromatography)
HRMS	Hochauflösende Massenspektroskopie (engl.: <b>H</b> igh <b>R</b> esolution <b>M</b> ass <b>S</b> pectrometry)
kg	Kilogramm
kbp	Kilobasenpaare
L	Liter
$\lambda$	<i>Lambda</i> , Wellenlänge
LA	Liponsäure (engl.: <b>L</b> ipoic <b>A</b> cid)
M	Molar
MALDI	Matrix-unterstützte Laser Desorption/Ionisation (engl.: <b>M</b> atrix- <b>A</b> ssisted <b>L</b> aser <b>D</b> esorption <b>I</b> onisation)
Mb	Myoglobin
mMb	Myoglobin-Mutante
MeCN	Acetonitril

- Abkürzungsverzeichnis -

---

mg	Milligramm
min	Minute(n)
mL	Milliliter
MS	Massenspektrometrie
ms	Millisekunden
MTP	Mikrotiterplatte(n)
MW	Molekulargewicht (engl.: <b>M</b> olecular <b>W</b> eight)
μ	Mikro
μg	Mikrogramm
μL	Mikroliter
μM	Mikromolar
NaOH	Natriumhydroxid
NBS	N-Bromsuccinimid
ng	Nanogramm
NHS	N-Hydroxysuccinimid
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
NP	Nanopartikel
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
POI	Protein von Interesse (engl.: <b>P</b> rotein <b>O</b> f <b>I</b> nterest)
Pyr	Pyridin
rpm	Umdrehung pro Minute (engl.: <b>R</b> evolutions <b>P</b> er <b>M</b> inute)

RT	Rautemperatur
s	Sekunden
ssDNA	Einzelstrang-DNA (engl.: <b>Single Stranded DNA</b> )
SDS	Sodiumdodecylsulfat (engl.: <b>Sodium Dodecyl Sulfate</b> )
STV	Streptavidin
TBTA	Tris[(1-benzyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl]amin
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TFA	Trifluoressigsäure (engl.: <b>Trifluoro-Acetic-Acid</b> )
TOF	Flugzeitanalysator (engl.: <b>Time Of Flight</b> )
UV	Ultraviolette Strahlung
Vis	Sichtbares Licht (engl.: <b>Visible Light</b> )

## 7 Literaturverzeichnis

1. J. D. Watson, F. H. Crick, *The structure of DNA*, *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **1953**, 18, 123-131.
2. S. L. Beaucage, M. H. Caruthers, *Deoxynucleoside Phosphoramidites - a New Class of Key Intermediates for Deoxypolynucleotide Synthesis*, *Tetrahedron Letters* **1981**, 22, 1859-1862.
3. S. J. Horvath, J. R. Firca, T. Hunkapiller, M. W. Hunkapiller, L. Hood, *An automated DNA synthesizer employing deoxynucleoside 3'-phosphoramidites*, *Methods Enzymol* **1987**, 154, 314-326.
4. D. A. Lashkari, S. P. Hunicke-Smith, R. M. Norgren, R. W. Davis, T. Brennan, *An automated multiplex oligonucleotide synthesizer: development of high-throughput, low-cost DNA synthesis*, *Proc Natl Acad Sci U S A* **1995**, 92, 7912-7915.
5. Y. Dong, D. Liu, Z. Yang, *A brief review of methods for terminal functionalization of DNA*, *Methods* **2014**, 67, 116-122.
6. A. B. Chetverin, F. R. Kramer, *Oligonucleotide arrays: new concepts and possibilities*, *Biotechnology (N Y)* **1994**, 12, 1093-1099.
7. C. M. Niemeyer, *Semisynthetic DNA-protein conjugates for biosensing and nanofabrication*, *Angew Chem Int Ed Engl* **2010**, 49, 1200-1216.
8. K. Vogel, M. Glettenberg, H. Schroeder, C. M. Niemeyer, *DNA-modification of eukaryotic cells*, *Small* **2013**, 9, 255-262.
9. S. C. Hsiao, B. J. Shum, H. Onoe, E. S. Douglas, Z. J. Gartner, R. A. Mathies, C. R. Bertozzi, M. B. Francis, *Direct cell surface modification with DNA for the capture of primary cells and the investigation of myotube formation on defined patterns*, *Langmuir* **2009**, 25, 6985-6991.
10. G. J. Tong, S. C. Hsiao, Z. M. Carrico, M. B. Francis, *Viral capsid DNA aptamer conjugates as multivalent cell-targeting vehicles*, *J Am Chem Soc* **2009**, 131, 11174-11178.
11. H. I. Peng, B. L. Miller, *Recent advancements in optical DNA biosensors: exploiting the plasmonic effects of metal nanoparticles*, *Analyst* **2011**, 136, 436-447.
12. S. Su, X. Zuo, D. Pan, H. Pei, L. Wang, C. Fan, W. Huang, *Design and applications of gold nanoparticle conjugates by exploiting biomolecule-gold nanoparticle interactions*, *Nanoscale* **2013**, 5, 2589-2599.
13. Z. Wang, Y. Lu, *Functional DNA directed assembly of nanomaterials for biosensing*, *J Mater Chem* **2009**, 19.
14. M. Kwak, A. Herrmann, *Nucleic acid/organic polymer hybrid materials: synthesis, superstructures, and applications*, *Angew Chem Int Ed Engl* **2010**, 49, 8574-8587.
15. K. Liu, L. Zheng, Q. Liu, J. W. de Vries, J. Y. Gerasimov, A. Herrmann, *Nucleic acid chemistry in the organic phase: from functionalized oligonucleotides to DNA side chain polymers*, *J Am Chem Soc* **2014**, 136, 14255-14262.
16. C. M. Niemeyer, M. Adler, B. Pignataro, S. Lenhert, S. Gao, L. Chi, H. Fuchs, D. Blohm, *Self-assembly of DNA-streptavidin nanostructures and their use as reagents in immuno-PCR*, *Nucleic Acids Res* **1999**, 27, 4553-4561.
17. T. Sano, C. L. Smith, C. R. Cantor, *Immuno-PCR: very sensitive antigen detection by means of specific antibody-DNA conjugates*, *Science* **1992**, 258, 120-122.
18. G. Ramsay, *DNA chips: state-of-the art*, *Nat Biotechnol* **1998**, 16, 40-44.
19. G. Shtenberg, N. Massad-Ivanir, S. Engin, M. Sharon, L. Fruk, E. Segal, *DNA-directed immobilization of horseradish peroxidase onto porous SiO<sub>2</sub> optical transducers*, *Nanoscale Res Lett* **2012**, 7, 443.

20. A. W. Tepper, *Electrical contacting of an assembly of pseudoazurin and nitrite reductase using DNA-directed immobilization*, *J Am Chem Soc* **2010**, 132, 6550-6557.
21. N. C. Seeman, *Nucleic acid junctions and lattices*, *J Theor Biol* **1982**, 99, 237-247.
22. U. Feldkamp, C. M. Niemeyer, *Rational design of DNA nanoarchitectures*, *Angew Chem Int Ed Engl* **2006**, 45, 1856-1876.
23. N. C. Seeman, *The design and engineering of nucleic acid nanoscale assemblies*, *Curr Opin Struct Biol* **1996**, 6, 519-526.
24. N. C. Seeman, *Structural DNA nanotechnology: an overview*, *Methods Mol Biol* **2005**, 303, 143-166.
25. N. C. Seeman, P. S. Lukeman, *Nucleic Acid Nanostructures: Bottom-Up Control of Geometry on the Nanoscale*, *Rep Prog Phys* **2005**, 68, 237-270.
26. N. C. Seeman, *At the crossroads of chemistry, biology, and materials: structural DNA nanotechnology*, *Chem Biol* **2003**, 10, 1151-1159.
27. N. C. Seeman, *Biochemistry and structural DNA nanotechnology: an evolving symbiotic relationship*, *Biochemistry* **2003**, 42, 7259-7269.
28. N. C. Seeman, *DNA in a material world*, *Nature* **2003**, 421, 427-431.
29. P. W. Rothemund, *Folding DNA to create nanoscale shapes and patterns*, *Nature* **2006**, 440, 297-302.
30. S. Woo, P. W. Rothemund, *Programmable molecular recognition based on the geometry of DNA nanostructures*, *Nat Chem* **2011**, 3, 620-627.
31. B. Sacca, C. M. Niemeyer, *Functionalization of DNA nanostructures with proteins*, *Chem Soc Rev* **2011**, 40, 5910-5921.
32. Q. Liu, C. Song, Z. G. Wang, N. Li, B. Ding, *Precise organization of metal nanoparticles on DNA origami template*, *Methods* **2014**, 67, 205-214.
33. D. V. Voet, J.G.; Pratt, C. W., *Lehrbuch der Biochemie*, Wiley-VCH, Weinheim, 2002.
34. P. C. Weber, D. H. Ohlendorf, J. J. Wendoloski, F. R. Salemme, *Structural origins of high-affinity biotin binding to streptavidin*, *Science* **1989**, 243, 85-88.
35. B. Sacca, C. M. Niemeyer, *Functionalization of DNA nanostructures with proteins*, *Chemical Society Reviews* **2011**, 40, 5910-5921.
36. C. M. Dundas, D. Demonte, S. Park, *Streptavidin-biotin technology: improvements and innovations in chemical and biological applications*, *Appl Microbiol Biotechnol* **2013**, 97, 9343-9353.
37. A. Chilkoti, B. L. Schwartz, R. D. Smith, C. J. Long, P. S. Stayton, *Engineered chimeric streptavidin tetramers as novel tools for bioseparations and drug delivery*, *Biotechnology (N Y)* **1995**, 13, 1198-1204.
38. M. Howarth, D. J. Chinnapen, K. Gerrow, P. C. Dorrestein, M. R. Grandy, N. L. Kelleher, A. El-Husseini, A. Y. Ting, *A monovalent streptavidin with a single femtomolar biotin binding site*, *Nat Methods* **2006**, 3, 267-273.
39. J. Crowe, H. Dobeli, R. Gentz, E. Hochuli, D. Stuber, K. Henco, *6xHis-Ni-NTA chromatography as a superior technique in recombinant protein expression/purification*, *Methods Mol Biol* **1994**, 31, 371-387.
40. R. P. Goodman, C. M. Erben, J. Malo, W. M. Ho, M. L. McKee, A. N. Kapanidis, A. J. Turberfield, *A facile method for reversibly linking a recombinant protein to DNA*, *Chembiochem* **2009**, 10, 1551-1557.
41. L. Fruk, C. H. Kuo, E. Torres, C. M. Niemeyer, *Apoenzyme reconstitution as a chemical tool for structural enzymology and biotechnology*, *Angew Chem Int Ed Engl* **2009**, 48, 1550-1574.
42. L. Fruk, C. M. Niemeyer, *Covalent heme-DNA adducts for generating a novel class of artificial heme enzymes*, *Angew Chem Int Ed Engl* **2005**, 44, 2603-2606.

43. L. Fruk, J. Muller, C. M. Niemeyer, *Kinetic analysis of semisynthetic peroxidase enzymes containing a covalent DNA-heme adduct as the cofactor*, *Chemistry* **2006**, 12, 7448-7457.
44. L. Fruk, J. Kuhlmann, C. M. Niemeyer, *Analysis of heme-reconstitution of apoenzymes by means of surface plasmon resonance*, *Chem Commun (Camb)* **2009**, 230-232.
45. L. Fruk, J. Muller, G. Weber, A. Narvaez, E. Dominguez, C. M. Niemeyer, *DNA-directed immobilization of horseradish peroxidase-DNA conjugates on microelectrode arrays: towards electrochemical screening of enzyme libraries*, *Chemistry* **2007**, 13, 5223-5231.
46. M. Glettenberg, C. M. Niemeyer, *Tuning of peroxidase activity by covalently tethered DNA oligonucleotides*, *Bioconjug Chem* **2009**, 20, 969-975.
47. C. M. Niemeyer, *The developments of semisynthetic DNA-protein conjugates*, *Trends Biotechnol* **2002**, 20, 395-401.
48. C. M. Niemeyer, W. Burger, R. M. Hoedemakers, *Hybridization characteristics of biomolecular adaptors, covalent DNA--streptavidin conjugates*, *Bioconjug Chem* **1998**, 9, 168-175.
49. S. S. Ghosh, P. M. Kao, A. W. McCue, H. L. Chappelle, *Use of maleimide-thiol coupling chemistry for efficient syntheses of oligonucleotide-enzyme conjugate hybridization probes*, *Bioconjug Chem* **1990**, 1, 71-76.
50. F. Kukulka, M. Lovrinovic, R. Wacker, C. M. Niemeyer, *Covalent coupling of DNA oligonucleotides and streptavidin*, *Methods Mol Biol* **2004**, 283, 181-196.
51. F. Kukulka, C. M. Niemeyer, *Synthesis of fluorescent oligonucleotide--EYFP conjugate: towards supramolecular construction of semisynthetic biomolecular antennae*, *Org Biomol Chem* **2004**, 2, 2203-2206.
52. V. Lapiene, F. Kukulka, K. Kiko, A. Arndt, C. M. Niemeyer, *Conjugation of fluorescent proteins with DNA oligonucleotides*, *Bioconjug Chem* **2010**, 21, 921-927.
53. C. M. Niemeyer, T. Sano, C. L. Smith, C. R. Cantor, *Oligonucleotide-directed self-assembly of proteins: semisynthetic DNA--streptavidin hybrid molecules as connectors for the generation of macroscopic arrays and the construction of supramolecular bioconjugates*, *Nucleic Acids Res* **1994**, 22, 5530-5539.
54. T. W. Muir, *Semisynthesis of proteins by expressed protein ligation*, *Annu Rev Biochem* **2003**, 72, 249-289.
55. M. Lovrinovic, C. M. Niemeyer, *Rapid synthesis of DNA-cysteine conjugates for expressed protein ligation*, *Biochem Biophys Res Commun* **2005**, 335, 943-948.
56. M. Lovrinovic, R. Seidel, R. Wacker, H. Schroeder, O. Seitz, M. Engelhard, R. S. Goody, C. M. Niemeyer, *Synthesis of protein-nucleic acid conjugates by expressed protein ligation*, *Chem Commun (Camb)* **2003**, 822-823.
57. M. Lovrinovic, M. Spengler, C. Deutsch, C. M. Niemeyer, *Synthesis of covalent DNA-protein conjugates by expressed protein ligation*, *Mol Biosyst* **2005**, 1, 64-69.
58. Y. Mashimo, H. Maeda, M. Mie, E. Kobatake, *Construction of semisynthetic DNA-protein conjugates with Phi X174 Gene-A\* protein*, *Bioconjug Chem* **2012**, 23, 1349-1355.
59. R. Hanai, J. C. Wang, *The mechanism of sequence-specific DNA cleavage and strand transfer by phi X174 gene A\* protein*, *J Biol Chem* **1993**, 268, 23830-23836.
60. C. B. Rosen, A. L. Kodal, J. S. Nielsen, D. H. Schaffert, C. Scavenius, A. H. Okholm, N. V. Voigt, J. J. Enghild, J. Kjems, T. Topping, K. V. Gothelf, *Template-directed covalent conjugation of DNA to native antibodies, transferrin and other metal-binding proteins*, *Nat Chem* **2014**, 6, 804-809.

61. X. Li, D. R. Liu, *DNA-templated organic synthesis: nature's strategy for controlling chemical reactivity applied to synthetic molecules*, *Angew Chem Int Ed Engl* **2004**, 43, 4848-4870.
62. R. Damoiseaux, A. Keppler, K. Johnsson, *Synthesis and applications of chemical probes for human O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase*, *Chembiochem* **2001**, 2, 285-287.
63. A. Gautier, A. Juillerat, C. Heinis, I. R. Correa, Jr., M. Kindermann, F. Beaufils, K. Johnsson, *An engineered protein tag for multiprotein labeling in living cells*, *Chem Biol* **2008**, 15, 128-136.
64. T. Gronemeyer, C. Chidley, A. Juillerat, C. Heinis, K. Johnsson, *Directed evolution of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase for applications in protein labeling*, *Protein Eng Des Sel* **2006**, 19, 309-316.
65. M. A. Jongsma, R. H. Litjens, *Self-assembling protein arrays on DNA chips by auto-labeling fusion proteins with a single DNA address*, *Proteomics* **2006**, 6, 2650-2655.
66. B. P. Duckworth, Y. Chen, J. W. Wollack, Y. Sham, J. D. Mueller, T. A. Taton, M. D. Distefano, *A universal method for the preparation of covalent protein-DNA conjugates for use in creating protein nanostructures*, *Angew Chem Int Ed Engl* **2007**, 46, 8819-8822.
67. P. M. Gramlich, C. T. Wirges, A. Manetto, T. Carell, *Postsynthetic DNA modification through the copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition reaction*, *Angew Chem Int Ed Engl* **2008**, 47, 8350-8358.
68. J. E. Yeo, S. Wickramaratne, S. Khatwani, Y. C. Wang, J. Vervacke, M. D. Distefano, N. Y. Tretyakova, *Synthesis of site-specific DNA-protein conjugates and their effects on DNA replication*, *ACS Chem Biol* **2014**, 9, 1860-1868.
69. M. Humenik, T. Scheibel, *Nanomaterial building blocks based on spider silk-oligonucleotide conjugates*, *ACS Nano* **2014**, 8, 1342-1349.
70. R. Meyer, S. Giselsbrecht, B. E. Rapp, M. Hirtz, C. M. Niemeyer, *Advances in DNA-directed immobilization*, *Curr Opin Chem Biol* **2014**, 18, 8-15.
71. R. A. Chandra, E. S. Douglas, R. A. Mathies, C. R. Bertozzi, M. B. Francis, *Programmable cell adhesion encoded by DNA hybridization*, *Angew Chem Int Ed Engl* **2006**, 45, 896-901.
72. S. Dey, T. L. Sheppard, *Ketone-DNA: a versatile postsynthetic DNA decoration platform*, *Org Lett* **2001**, 3, 3983-3986.
73. S. Wickramaratne, S. Mukherjee, P. W. Villalta, O. D. Scharer, N. Y. Tretyakova, *Synthesis of sequence-specific DNA-protein conjugates via a reductive amination strategy*, *Bioconjug Chem* **2013**, 24, 1496-1506.
74. N. J. Agard, J. A. Prescher, C. R. Bertozzi, *A strain-promoted [3 + 2] azide-alkyne cycloaddition for covalent modification of biomolecules in living systems*, *J Am Chem Soc* **2004**, 126, 15046-15047.
75. S. L. Khatwani, J. S. Kang, D. G. Mullen, M. A. Hast, L. S. Beese, M. D. Distefano, T. A. Taton, *Covalent protein-oligonucleotide conjugates by copper-free click reaction*, *Bioorg Med Chem* **2012**, 20, 4532-4539.
76. I. Singh, F. Heaney, *Solid phase strain promoted "click" modification of DNA via [3+2]-nitrile oxide-cyclooctyne cycloadditions*, *Chem Commun (Camb)* **2011**, 47, 2706-2708.
77. H. S. Lee, R. D. Dimla, P. G. Schultz, *Protein-DNA photo-crosslinking with a genetically encoded benzophenone-containing amino acid*, *Bioorg Med Chem Lett* **2009**, 19, 5222-5224.

78. J. Czichos, M. Kohler, B. Reckmann, M. Renz, *Protein-DNA conjugates produced by UV irradiation and their use as probes for hybridization*, *Nucleic Acids Res* **1989**, 17, 1563-1572.
79. G. D. Meredith, H. Y. Wu, N. L. Allbritton, *Targeted protein functionalization using His-tags*, *Bioconjug Chem* **2004**, 15, 969-982.
80. S. Arndt, H. A. Wagenknecht, *"Photoclick" postsynthetic modification of DNA*, *Angew Chem Int Ed Engl* **2014**, 53, 14580-14582.
81. A. Saghatelian, K. M. Guckian, D. A. Thayer, M. R. Ghadiri, *DNA detection and signal amplification via an engineered allosteric enzyme*, *J Am Chem Soc* **2003**, 125, 344-345.
82. Y. Lu, B. Weers, N. C. Stellwagen, *DNA persistence length revisited*, *Biopolymers* **2001**, 61, 261-275.
83. N. C. Gianneschi, M. R. Ghadiri, *Design of molecular logic devices based on a programmable DNA-regulated semisynthetic enzyme*, *Angew Chem Int Ed Engl* **2007**, 46, 3955-3958.
84. F. Wang, C. H. Lu, I. Willner, *From cascaded catalytic nucleic acids to enzyme-DNA nanostructures: controlling reactivity, sensing, logic operations, and assembly of complex structures*, *Chem Rev* **2014**, 114, 2881-2941.
85. M. Erkelenz, C. H. Kuo, C. M. Niemeyer, *DNA-mediated assembly of cytochrome P450 BM3 subdomains*, *J Am Chem Soc* **2011**, 133, 16111-16118.
86. J. Muller, C. M. Niemeyer, *DNA-directed assembly of artificial multienzyme complexes*, *Biochem Biophys Res Commun* **2008**, 377, 62-67.
87. M. You, R. W. Wang, X. Zhang, Y. Chen, K. Wang, L. Peng, W. Tan, *Photon-regulated DNA-enzymatic nanostructures by molecular assembly*, *ACS Nano* **2011**, 5, 10090-10095.
88. F. Bano, L. Fruk, B. Sanavio, M. Glettenberg, L. Casalis, C. M. Niemeyer, G. Scoles, *Toward multiprotein nanoarrays using nanografting and DNA directed immobilization of proteins*, *Nano Lett* **2009**, 9, 2614-2618.
89. S. B. Nimse, K. Song, M. D. Sonawane, D. R. Sayyed, T. Kim, *Immobilization Techniques for Microarray: Challenges and Applications*, *Sensors (Basel)* **2014**, 14, 22208-22229.
90. D. S. Ginger, H. Zhang, C. A. Mirkin, *The evolution of dip-pen nanolithography*, *Angew Chem Int Ed Engl* **2004**, 43, 30-45.
91. B. Sacca, R. Meyer, M. Erkelenz, K. Kiko, A. Arndt, H. Schroeder, K. S. Rabe, C. M. Niemeyer, *Orthogonal protein decoration of DNA origami*, *Angew Chem Int Ed Engl* **2010**, 49, 9378-9383.
92. A. Kuzyk, R. Schreiber, Z. Fan, G. Pardatscher, E. M. Roller, A. Hoge, F. C. Simmel, A. O. Govorov, T. Liedl, *DNA-based self-assembly of chiral plasmonic nanostructures with tailored optical response*, *Nature* **2012**, 483, 311-314.
93. Z. Zhao, E. L. Jacovetty, Y. Liu, H. Yan, *Encapsulation of gold nanoparticles in a DNA origami cage*, *Angew Chem Int Ed Engl* **2011**, 50, 2041-2044.
94. F. C. Simmel, *DNA-based assembly lines and nanofactories*, *Curr Opin Biotechnol* **2012**, 23, 516-521.
95. Z. G. Wang, C. Song, B. Ding, *Functional DNA nanostructures for photonic and biomedical applications*, *Small* **2013**, 9, 2210-2222.
96. N. A. Bell, U. F. Keyser, *Nanopores formed by DNA origami: a review*, *FEBS Lett* **2014**, 588, 3564-3570.
97. J. Li, C. Fan, H. Pei, J. Shi, Q. Huang, *Smart drug delivery nanocarriers with self-assembled DNA nanostructures*, *Adv Mater* **2013**, 25, 4386-4396.

98. A. Rajendran, M. Endo, H. Sugiyama, *DNA origami: synthesis and self-assembly*, *Curr Protoc Nucleic Acid Chem* **2012**, Chapter 12, Unit 12 19 11-18.
99. A. Rajendran, M. Endo, H. Sugiyama, *Single-molecule analysis using DNA origami*, *Angew Chem Int Ed Engl* **2012**, 51, 874-890.
100. I. Saaem, T. H. LaBean, *Overview of DNA origami for molecular self-assembly*, *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol* **2013**, 5, 150-162.
101. B. Sacca, C. M. Niemeyer, *DNA origami: the art of folding DNA*, *Angew Chem Int Ed Engl* **2012**, 51, 58-66.
102. C. Song, Z. G. Wang, B. Ding, *Smart nanomachines based on DNA self-assembly*, *Small* **2013**, 9, 2382-2392.
103. Y. C. Hung, D. M. Bauer, I. Ahmed, L. Fruk, *DNA from natural sources in design of functional devices*, *Methods* **2014**, 67, 105-115.
104. E. S. Andersen, M. Dong, M. M. Nielsen, K. Jahn, A. Lind-Thomsen, W. Mamdouh, K. V. Gothelf, F. Besenbacher, J. Kjems, *DNA origami design of dolphin-shaped structures with flexible tails*, *ACS Nano* **2008**, 2, 1213-1218.
105. S. M. Douglas, A. H. Marblestone, S. Teerapittayanon, A. Vazquez, G. M. Church, W. M. Shih, *Rapid prototyping of 3D DNA-origami shapes with caDNAno*, *Nucleic Acids Res* **2009**, 37, 5001-5006.
106. H. Dietz, S. M. Douglas, W. M. Shih, *Folding DNA into twisted and curved nanoscale shapes*, *Science* **2009**, 325, 725-730.
107. D. Han, S. Pal, J. Nangreave, Z. Deng, Y. Liu, H. Yan, *DNA origami with complex curvatures in three-dimensional space*, *Science* **2011**, 332, 342-346.
108. A. Kuzuya, M. Kimura, K. Numajiri, N. Koshi, T. Ohnishi, F. Okada, M. Komiyama, *Precisely programmed and robust 2D streptavidin nanoarrays by using periodical nanometer-scale wells embedded in DNA origami assembly*, *Chembiochem* **2009**, 10, 1811-1815.
109. K. Numajiri, M. Kimura, A. Kuzuya, M. Komiyama, *Stepwise and reversible nanopatterning of proteins on a DNA origami scaffold*, *Chem Commun (Camb)* **2010**, 46, 5127-5129.
110. N. V. Voigt, T. Topping, A. Rotaru, M. F. Jacobsen, J. B. Ravensbaek, R. Subramani, W. Mamdouh, J. Kjems, A. Mokhir, F. Besenbacher, K. V. Gothelf, *Single-molecule chemical reactions on DNA origami*, *Nat Nanotechnol* **2010**, 5, 200-203.
111. M. Endo, Y. Katsuda, K. Hidaka, H. Sugiyama, *Regulation of DNA methylation using different tensions of double strands constructed in a defined DNA nanostructure*, *J Am Chem Soc* **2010**, 132, 1592-1597.
112. M. Endo, Y. Katsuda, K. Hidaka, H. Sugiyama, *A versatile DNA nanochip for direct analysis of DNA base-excision repair*, *Angew Chem Int Ed Engl* **2010**, 49, 9412-9416.
113. M. Tintore, I. Gallego, B. Manning, R. Eritja, C. Fabrega, *DNA origami as a DNA repair nanosensor at the single-molecule level*, *Angew Chem Int Ed Engl* **2013**, 52, 7747-7750.
114. S. Burge, G. N. Parkinson, P. Hazel, A. K. Todd, S. Neidle, *Quadruplex DNA: sequence, topology and structure*, *Nucleic Acids Res* **2006**, 34, 5402-5415.
115. S. N. Georgiades, N. H. Abd Karim, K. Suntharalingam, R. Vilar, *Interaction of metal complexes with G-quadruplex DNA*, *Angew Chem Int Ed Engl* **2010**, 49, 4020-4034.
116. R. F. Macaya, P. Schultze, F. W. Smith, J. A. Roe, J. Feigon, *Thrombin-binding DNA aptamer forms a unimolecular quadruplex structure in solution*, *Proc Natl Acad Sci U S A* **1993**, 90, 3745-3749.
117. M. Tintore, A. Avino, F. M. Ruiz, R. Eritja, C. Fabrega, *Development of a Novel Fluorescence Assay Based on the Use of the Thrombin-Binding Aptamer for the*

- Detection of O-Alkylguanine-DNA Alkyltransferase Activity, J Nucleic Acids* **2010**, 2010.
118. A. E. Pegg, *Multifaceted roles of alkyltransferase and related proteins in DNA repair, DNA damage, resistance to chemotherapy, and research tools, Chem Res Toxicol* **2011**, 24, 618-639.
119. Y. Fu, D. Zeng, J. Chao, Y. Jin, Z. Zhang, H. Liu, D. Li, H. Ma, Q. Huang, K. V. Gothelf, C. Fan, *Single-step rapid assembly of DNA origami nanostructures for addressable nanoscale bioreactors, J Am Chem Soc* **2013**, 135, 696-702.
120. I. Ahmed, L. Fruk, *The power of light: photosensitive tools for chemical biology, Mol Biosyst* **2013**, 9, 565-570.
121. A. A. Beharry, G. A. Woolley, *Azobenzene photoswitches for biomolecules, Chem Soc Rev* **2011**, 40, 4422-4437.
122. C. Brieke, F. Rohrbach, A. Gottschalk, G. Mayer, A. Heckel, *Light-controlled tools, Angew Chem Int Ed Engl* **2012**, 51, 8446-8476.
123. A. Deiters, *Principles and applications of the photochemical control of cellular processes, Chembiochem* **2010**, 11, 47-53.
124. U. Krauss, T. Drepper, K. E. Jaeger, *Enlightened enzymes: strategies to create novel photoresponsive proteins, Chemistry* **2011**, 17, 2552-2560.
125. W. H. Li, G. Zheng, *Photoactivatable fluorophores and techniques for biological imaging applications, Photochem Photobiol Sci* **2012**, 11, 460-471.
126. M. Bhagawati, S. Lata, R. Tampe, J. Piehler, *Native laser lithography of His-tagged proteins by uncaging of multivalent chelators, J Am Chem Soc* **2010**, 132, 5932-5933.
127. C. Grunwald, K. Schulze, A. Reichel, V. U. Weiss, D. Blaas, J. Piehler, K. H. Wiesmuller, R. Tampe, *In situ assembly of macromolecular complexes triggered by light, Proc Natl Acad Sci U S A* **2010**, 107, 6146-6151.
128. M. C. Pirrung, C. Y. Huang, *A general method for the spatially defined immobilization of biomolecules on glass surfaces using "caged" biotin, Bioconjug Chem* **1996**, 7, 317-321.
129. J. Binschik, J. Zettler, H. D. Mootz, *Photocontrol of protein activity mediated by the cleavage reaction of a split intein, Angew Chem Int Ed Engl* **2011**, 50, 3249-3252.
130. N. Wu, A. Deiters, T. A. Cropp, D. King, P. G. Schultz, *A genetically encoded photocaged amino acid, J Am Chem Soc* **2004**, 126, 14306-14307.
131. C. Chou, D. D. Young, A. Deiters, *Photocaged t7 RNA polymerase for the light activation of transcription and gene function in pro- and eukaryotic cells, Chembiochem* **2010**, 11, 972-977.
132. W. F. Edwards, D. D. Young, A. Deiters, *Light-activated Cre recombinase as a tool for the spatial and temporal control of gene function in mammalian cells, ACS Chem Biol* **2009**, 4, 441-445.
133. E. Arbely, J. Torres-Kolbus, A. Deiters, J. W. Chin, *Photocontrol of tyrosine phosphorylation in mammalian cells via genetic encoding of photocaged tyrosine, J Am Chem Soc* **2012**, 134, 11912-11915.
134. T. Hiraoka, I. Hamachi, *Caged RNase: photoactivation of the enzyme from perfect off-state by site-specific incorporation of 2-nitrobenzyl moiety, Bioorg Med Chem Lett* **2003**, 13, 13-15.
135. A. Gautier, A. Deiters, J. W. Chin, *Light-activated kinases enable temporal dissection of signaling networks in living cells, J Am Chem Soc* **2011**, 133, 2124-2127.
136. T. Dvir, M. R. Banghart, B. P. Timko, R. Langer, D. S. Kohane, *Photo-targeted nanoparticles, Nano Lett* **2010**, 10, 250-254.
137. M. Izquierdo-Serra, M. Gascon-Moya, J. J. Hirtz, S. Pittolo, K. E. Poskanzer, E. Ferrer, R. Alibes, F. Busque, R. Yuste, J. Hernando, P. Gorostiza, *Two-photon*

- neuronal and astrocytic stimulation with azobenzene-based photoswitches*, *J Am Chem Soc* **2014**, 136, 8693-8701.
138. J. Y. Wang, Q. F. Wu, J. P. Li, Q. S. Ren, Y. L. Wang, X. M. Liu, *Photo-sensitive liposomes: chemistry and application in drug delivery*, *Mini Rev Med Chem* **2010**, 10, 172-181.
139. P. Gorostiza, E. Y. Isacoff, *Optical switches for remote and noninvasive control of cell signaling*, *Science* **2008**, 322, 395-399.
140. P. Gorostiza, E. Y. Isacoff, *Nanoengineering ion channels for optical control*, *Physiology (Bethesda)* **2008**, 23, 238-247.
141. M. Y. Rose, J. S. Olson, *The kinetic mechanism of heme binding to human apohemoglobin*, *J Biol Chem* **1983**, 258, 4298-4303.
142. C. Wang, L. L. Lovelace, S. Sun, J. H. Dawson, L. Lebioda, *Structures of K42N and K42Y sperm whale myoglobins point to an inhibitory role of distal water in peroxidase activity*, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **2014**, 70, 2833-2839.
143. M. S. Hargrove, A. J. Wilkinson, J. S. Olson, *Structural factors governing hemin dissociation from metmyoglobin*, *Biochemistry* **1996**, 35, 11300-11309.
144. M. Brunori, *Myoglobin strikes back*, *Protein Sci* **2010**, 19, 195-201.
145. C. U. Carlsen, I. M. Skovgaard, L. H. Skibsted, *Pseudoperoxidase activity of myoglobin: kinetics and mechanism of the peroxidase cycle of myoglobin with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and 2,2-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate) as substrates*, *J Agric Food Chem* **2003**, 51, 5815-5823.
146. C. H. Kuo, L. Fruk, C. M. Niemeyer, *Addressable DNA-myoglobin photocatalysis*, *Chem Asian J* **2009**, 4, 1064-1069.
147. H. Kitagishi, K. Oohora, H. Yamaguchi, H. Sato, T. Matsuo, A. Harada, T. Hayashi, *Supramolecular hemoprotein linear assembly by successive interprotein heme-heme pocket interactions*, *J Am Chem Soc* **2007**, 129, 10326-10327.
148. K. Oohora, T. Hayashi, *Hemoprotein-based supramolecular assembling systems*, *Curr Opin Chem Biol* **2014**, 19, 154-161.
149. G. Arrabito, S. Reisewitz, L. Dehmelt, P. I. Bastiaens, B. Pignataro, H. Schroeder, C. M. Niemeyer, *Biochips for cell biology by combined dip-pen nanolithography and DNA-directed protein immobilization*, *Small* **2013**, 9, 4243-4249.
150. M. Ganau, A. Bosco, A. Palma, S. Corvaglia, P. Parisse, L. Fruk, A. P. Beltrami, D. Cesselli, L. Casalis, G. Scoles, *A DNA-based nano-immunoassay for the label-free detection of glial fibrillary acidic protein in multicell lysates*, *Nanomedicine* **2014**.
151. D. M. Bauer, A. Rogge, L. Stolzer, C. Barner-Kowollik, L. Fruk, *Light induced DNA-protein conjugation*, *Chem Commun (Camb)* **2013**, 49, 8626-8628.
152. T. Gruending, K. K. Oehlenschlaeger, E. Frick, M. Glassner, C. Schmid, C. Barner-Kowollik, *Rapid UV light-triggered macromolecular click conjugations via the use of o-quinodimethanes*, *Macromol Rapid Commun* **2011**, 32, 807-812.
153. K. K. Oehlenschlaeger, J. O. Mueller, N. B. Heine, M. Glassner, N. K. Guimard, G. Delaittre, F. G. Schmidt, C. Barner-Kowollik, *Light-induced modular ligation of conventional RAFT polymers*, *Angew Chem Int Ed Engl* **2013**, 52, 762-766.
154. T. Pauloehrl, G. Delaittre, V. Winkler, A. Welle, M. Bruns, H. G. Borner, A. M. Greiner, M. Bastmeyer, C. Barner-Kowollik, *Adding spatial control to click chemistry: phototriggered Diels-Alder surface (bio)functionalization at ambient temperature*, *Angew Chem Int Ed Engl* **2012**, 51, 1071-1074.
155. J. O. Müller, *Photo- induced Diels-Alder Chemistry and its application*, *Diplomarbeit, Karlsruher Institut für Technologie* **2011**.
156. K. K. Öhlenschläger, *Photo induced Click-Chemistry for Polymer-Polymer conjugation*, *Diplomarbeit, Karlsruher Institut für Technologie* **2011**.

157. J. Cadet, T. Douki, J. P. Pouget, J. L. Ravanat, S. Sauvaigo, *Effects of UV and visible radiations on cellular DNA*, *Curr Probl Dermatol* **2001**, 29, 62-73.
158. J. L. Ravanat, T. Douki, J. Cadet, *Direct and indirect effects of UV radiation on DNA and its components*, *J Photochem Photobiol B* **2001**, 63, 88-102.
159. A. L. Dany, T. Douki, C. Triantaphylides, J. Cadet, *Repair of the main UV-induced thymine dimeric lesions within Arabidopsis thaliana DNA: evidence for the major involvement of photoreactivation pathways*, *J Photochem Photobiol B* **2001**, 65, 127-135.
160. T. Douki, J. Cadet, *Individual determination of the yield of the main UV-induced dimeric pyrimidine photoproducts in DNA suggests a high mutagenicity of CC photolesions*, *Biochemistry* **2001**, 40, 2495-2501.
161. M. J. Davies, *Singlet oxygen-mediated damage to proteins and its consequences*, *Biochem Biophys Res Commun* **2003**, 305, 761-770.
162. G. Porter, M. F. Tchir, *Flash Photolysis of an Ortho-Alkyl-Benzophenone*, *Journal of the Chemical Society D-Chemical Communications* **1970**, 1372-&.
163. G. Porter, M. F. Tchir, *Photoenolization of Ortho-Substituted Benzophenones by Flash Photolysis*, *Journal of the Chemical Society a -Inorganic Physical Theoretical* **1971**, 3772-&.
164. C. M. Niemeyer, M. Adler, D. Blohm, *Fluorometric polymerase chain reaction (PCR) enzyme-linked immunosorbent assay for quantification of immuno-PCR products in microplates*, *Anal Biochem* **1997**, 246, 140-145.
165. H. Ban, J. Gavriilyuk, C. F. Barbas, 3rd, *Tyrosine bioconjugation through aqueous ene-type reactions: a click-like reaction for tyrosine*, *J Am Chem Soc* **2010**, 132, 1523-1525.
166. H. Ban, M. Nagano, J. Gavriilyuk, W. Hakamata, T. Inokuma, C. F. Barbas, 3rd, *Facile and stabile linkages through tyrosine: bioconjugation strategies with the tyrosine-click reaction*, *Bioconjug Chem* **2013**, 24, 520-532.
167. U. Feldkamp, H. Schroeder, C. M. Niemeyer, *Design and evaluation of single-stranded DNA carrier molecules for DNA-directed assembly*, *J Biomol Struct Dyn* **2006**, 23, 657-666.
168. U. Feldkamp, R. Wacker, H. Schroeder, W. Banzhaf, C. M. Niemeyer, *Microarray-based in vitro evaluation of DNA oligomer libraries designed in silico*, *Chemphyschem* **2004**, 5, 367-372.
169. M. Erkelenz, D. M. Bauer, R. Meyer, C. Gatsogiannis, S. Raunser, B. Sacca, C. M. Niemeyer, *A facile method for preparation of tailored scaffolds for DNA-origami*, *Small* **2014**, 10, 73-77.
170. A. Langer, W. Kaiser, M. Svejda, P. Schwertler, U. Rant, *Molecular dynamics of DNA-protein conjugates on electrified surfaces: solutions to the drift-diffusion equation*, *J Phys Chem B* **2014**, 118, 597-607.
171. R. J. Roberts, *How restriction enzymes became the workhorses of molecular biology*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2005**, 102, 5905-5908.
172. K. Danna, D. Nathans, *Specific cleavage of simian virus 40 DNA by restriction endonuclease of Hemophilus influenzae*, *Proc Natl Acad Sci U S A* **1971**, 68, 2913-2917.
173. H. O. Smith, K. W. Wilcox, *A restriction enzyme from Hemophilus influenzae. I. Purification and general properties*, *J Mol Biol* **1970**, 51, 379-391.
174. W. Arber, *Restriction endonucleases*, *Angew Chem Int Ed Engl* **1978**, 17, 73-79.
175. W. A. Loenen, D. T. Dryden, E. A. Raleigh, G. G. Wilson, *Type I restriction enzymes and their relatives*, *Nucleic Acids Res* **2014**, 42, 20-44.

176. D. N. Rao, D. T. Dryden, S. Bheemanaik, *Type III restriction-modification enzymes: a historical perspective*, *Nucleic Acids Res* **2014**, 42, 45-55.
177. R. J. Roberts, *Restriction endonucleases: a new role in vivo?*, *Nature* **1978**, 271, 502.
178. S. N. Cohen, A. C. Chang, H. W. Boyer, R. B. Helling, *Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro*, *Proc Natl Acad Sci U S A* **1973**, 70, 3240-3244.
179. I. R. Lehman, *DNA ligase: structure, mechanism, and function*, *Science* **1974**, 186, 790-797.
180. K. S. Rabe, *Herstellung rekombinanter Proteine für die Synthese von DNA-Protein-Konjugaten*, *Promotionsarbeit, TU-Dortmund* **2009**.
181. A. Kuzminov, *Recombinational repair of DNA damage in Escherichia coli and bacteriophage lambda*, *Microbiol Mol Biol Rev* **1999**, 63, 751-813, table of contents.
182. C. A. Hutchison, 3rd, S. Phillips, M. H. Edgell, S. Gillam, P. Jahnke, M. Smith, *Mutagenesis at a specific position in a DNA sequence*, *J Biol Chem* **1978**, 253, 6551-6560.
183. L. Zheng, U. Baumann, J. L. Reymond, *An efficient one-step site-directed and site-saturation mutagenesis protocol*, *Nucleic Acids Res* **2004**, 32, e115.
184. Q. Liu, M. Z. Li, D. Leibham, D. Cortez, S. J. Elledge, *The univector plasmid-fusion system, a method for rapid construction of recombinant DNA without restriction enzymes*, *Curr Biol* **1998**, 8, 1300-1309.
185. J. L. Hartley, G. F. Temple, M. A. Brasch, *DNA cloning using in vitro site-specific recombination*, *Genome Res* **2000**, 10, 1788-1795.
186. A. J. Walhout, G. F. Temple, M. A. Brasch, J. L. Hartley, M. A. Lorson, S. van den Heuvel, M. Vidal, *GATEWAY recombinational cloning: application to the cloning of large numbers of open reading frames or ORFeomes*, *Methods Enzymol* **2000**, 328, 575-592.
187. G. Rumsby, *An introduction to PCR techniques*, *Methods Mol Biol* **2006**, 324, 75-89.
188. M. Z. Li, S. J. Elledge, *Harnessing homologous recombination in vitro to generate recombinant DNA via SLIC*, *Nat Methods* **2007**, 4, 251-256.
189. K. Terpe, *Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems*, *Appl Microbiol Biotechnol* **2003**, 60, 523-533.
190. J. J. Lichty, J. L. Malecki, H. D. Agnew, D. J. Michelson-Horowitz, S. Tan, *Comparison of affinity tags for protein purification*, *Protein Expr Purif* **2005**, 41, 98-105.
191. J. E. Grundy, L. Y. Wirtanen, M. Beauregard, *Addition of a poly-(6X) His tag to Milk Bundle-1 and purification using immobilized metal-affinity chromatography*, *Protein Expr Purif* **1998**, 13, 61-66.
192. O. Letourneur, S. Ottone, V. Delauzun, M. C. Bastide, A. Foussadier, *Molecular cloning, overexpression in Escherichia coli, and purification of 6x his-tagged C-terminal domain of Clostridium difficile toxins A and B*, *Protein Expr Purif* **2003**, 31, 276-285.
193. T. G. Schmidt, A. Skerra, *One-step affinity purification of bacterially produced proteins by means of the "Strep tag" and immobilized recombinant core streptavidin*, *J Chromatogr A* **1994**, 676, 337-345.
194. T. G. Schmidt, A. Skerra, *The Strep-tag system for one-step purification and high-affinity detection or capturing of proteins*, *Nat Protoc* **2007**, 2, 1528-1535.
195. A. Skerra, T. G. Schmidt, *Applications of a peptide ligand for streptavidin: the Strep-tag*, *Biomol Eng* **1999**, 16, 79-86.
196. A. Skerra, T. G. Schmidt, *Use of the Strep-Tag and streptavidin for detection and purification of recombinant proteins*, *Methods Enzymol* **2000**, 326, 271-304.

197. S. Voss, A. Skerra, *Mutagenesis of a flexible loop in streptavidin leads to higher affinity for the Strep-tag II peptide and improved performance in recombinant protein purification*, *Protein Eng* **1997**, 10, 975-982.
198. K. I. Ivanov, M. Basic, M. Varjosalo, K. Makinen, *One-step purification of twin-strep-tagged proteins and their complexes on strep-tactin resin cross-linked with bis(sulfosuccinimidyl) suberate (BS3)*, *J Vis Exp* **2014**.
199. M. Sato, M. Kondoh, *Recent studies on metallothionein: protection against toxicity of heavy metals and oxygen free radicals*, *Tohoku J Exp Med* **2002**, 196, 9-22.
200. D. M. Kenziora, *Biofunktionalisierung von metallischen Nanopartikeln zur Entwicklung von Biosensoren, Promotionsarbeit, Karlsruher Institut für Technologie* **2013**.
201. A. J. Senesi, D. J. Eichelsdoerfer, R. J. Macfarlane, M. R. Jones, E. Auyeung, B. Lee, C. A. Mirkin, *Stepwise evolution of DNA-programmable nanoparticle superlattices*, *Angew Chem Int Ed Engl* **2013**, 52, 6624-6628.
202. D. M. Bauer, I. Ahmed, A. Vigovskaya, L. Fruk, *Clickable tyrosine binding bifunctional linkers for preparation of DNA-protein conjugates*, *Bioconjug Chem* **2013**, 24, 1094-1101.
203. P. Kele, X. Li, M. Link, K. Nagy, A. Herner, K. Lorincz, S. Beni, O. S. Wolfbeis, *Clickable fluorophores for biological labeling--with or without copper*, *Org Biomol Chem* **2009**, 7, 3486-3490.

## 8 *Danksagung*

Zunächst möchte ich mich bei Frau PD Dr. Ljiljana Fruk herzlichst bedanken. Ich erinnere mich gerne an den Tag zurück, an dem es in Dortmund an meiner Tür klopfte und mir jemand ein interessantes Angebot machte. Aus einem „*sunce sija*“ wurde eine erfolgreiche Zusammenarbeit, in der ich meine wissenschaftliche Kreativität vollständig entfalten konnte. Ich bedanke mich für das Vertrauen, meine eigenen Ideen umzusetzen zu können und dafür, meine Ergebnisse auf internationalen Konferenzen präsentieren zu dürfen. Weiterhin für die fachliche und praktische Kompetenz, die immer stets offene Tür, die psychologische und farbprächtige Couch und überhaupt für die Chance, eine wissenschaftliche Karriere einschlagen zu können. Aus diesem Grund: *“Hvala, vidimo se and stay like you are”!*

Bei Herrn Prof. Bräse möchte ich mich für die Annahme als Doktorand am Karlsruher Institut für Technologie bedanken.

Bedanken möchte ich mich bei Antonina Vigovskaya, Lukas Stolzer, Dr. Dania Kendziora, Dr. Bianca Geiseler, Dr. Marko Miljevic und Dr. Cheng Chen für das stets familiäre Klima in unserer Arbeitsgruppe. Frau Dr. Kendziora danke ich ebenfalls für das Korrekturlesen meiner Arbeit. Ganz herzlich möchte ich Dr. Ishtiaq Ahmed danken für die nächtelangen Synthesen, kooperative Gemeinschaftsarbeit und den Glauben, etwas Neues erschaffen und aufbauen zu wollen.

Des Weiteren möchte ich mich bei meiner alten Arbeitsgruppe bedanken. Speziell bei Herrn Prof. Niemeyer der es ermöglichte, dass ich während meiner Bachelor und Masterarbeit das Feld der DNA Nanotechnologie vertiefen konnte. Besonders möchte ich mich bei Frau Dr. Barbara Sacca bedanken, denn ohne Ihre Ausbildung und Ihren Glauben an mich würde ich heute nicht dort stehen, wo ich stehe. Bis heute tauschen wir wissenschaftliche Ideen aus und es entstand eine wunderschöne Freundschaft. Ebenfalls danke ich Herrn Dr. Michael Erkelenz für Ratschläge und für die Korrekturlesung. Frau Dr. Rebecca Meier möchte ich für die Hilfe der AFM Aufnahmen danken.

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Markus Kaiser für die Zukunftsratschläge, stets immer offene Tür an der Universität Duisburg-Essen und für die Nutzung des AFM.

Ein weiterer Dank geht an Herrn Prof. D. Graham für das positive Feedback auf den FOCUS Konferenzen. An dieser Stelle möchte ich mich ebenfalls bei Prof. F. Benfenati, Prof. E. D. Fabrizio und Prof. C. Torre für die hervorragenden Organisationen der Konferenzen bedanken und für die Chance, meine wissenschaftlichen Ergebnisse dort präsentieren zu dürfen.

Weiterhin danke ich Dr. M. Lazzarino und Prof. Dr. A. Bek bedanken, für die Gastfreundschaft und wissenschaftlichen Diskussionen.

Bedanken möchte ich mich bei Luca Piantanida für die fruchtbare Zusammenarbeit und der Erzeugung neuer Ideen während des KHYS Stipendiums. Anita Rogge und Sarah Datolli möchte ich für die Hilfe der praktischen Durchführungen bedanken.

Für die Hilfe der massenspektrometrischen Messungen möchte ich den Mitarbeitern der Analytikabteilung des Instituts für organische Chemie danken.

Andreas Elkeries danke ich für die IT Unterstützung. Frau Mösle und Frau Bender danke ich sehr für die Beihilfe in administrativen Fragen.

Eine der dicksten Umarmung geht an meine Familie. Sie unterstützten mich bei all meinen Entscheidungen und standen immer hinter mir. Ohne Ihre Unterstützung wäre all dies nicht möglich gewesen. Speziell möchte ich vom ganzen Herzen meiner Lebenspartnerin Katja Heermann danken. Sie gab mir Kraft, sowie in guten als auch in schlechten Zeiten.

## 9 Publikationsliste

### Artikel:

D.M. Bauer, I. Ahmed, A. Vigovskaya, L. Fruk, *Clickable Tyrosine Binding Bifunctional Linkers for Preparation of DNA Protein Conjugates*, **Bioconj. Chem.**, 2013, 24(6), 1094-1101.

M. Erkelenz, D. M. Bauer, R. Meyer, C. Gatsogiannis, S. Raunser, B. Sacca, C. M. Niemeyer, *Facile Method for Preparation of Tailored Scaffolds for DNA-Origami*, **small**, 2014, 10(1), 73-77.

D. M. Bauer, A. Rogge, L. Stolzer, C. Barner-Kowollik, F. Fruk, *Light induced DNA-protein conjugation*, **Chem. Commun.**, 2013, 49(77), 8626-8628.

Y.C. Hung, D. M. Bauer, I. Ahmed, L. Fuk, *Use of DNA from Natural Sources in Design of Functional Devices*, **Methods**, 2014, 67(2), 105-115..

L. Piantanida, D. Naumenko, E. Torelli, M. Marini, D. M. Bauer, L. Fruk, G. Firrao, M. Lazzarino, *Plasmon Resonance Tuning Using DNA Origami Actuation*, **Chem. Commun.**, 2015, 51, 4789-4792.

### Buchkapitel:

D. M. Bauer, D. M. Kendziora, Y. C. Hung, I. Ahmed, L. Fruk, *DNA as Nano Structuring Element for Design of Functional Devices*, 2014, **Springer Verlag**.

## ***10 Konferenzbeiträge und Posterpräsentationen***

**Tagesvortrag**, Juni 2013, Zagreb, Kroatien. Vortrag: *DNA in Nanobiotechnology: Protein modification and structuring.*

**Munich FOCUS conference**, Februar 2013, München, Deutschland. Vortrag: *Prototype of new artificial molecular devices.*

**International workshop: Single Molecule Activation and Detection in Molecular Devices**, Oktober 2012, Venedig, Italien. Vortrag: *Design and DNA directed immobilization of photoswitchable heme proteins.*

**Permanente Posterausstellung am Centrum für funktionelle Nanostrukturen (CFN)** zum Jahrestag der Chemie, Juni 2011, Karlsruhe, Deutschland. Poster: *Molecules That Changed the World.*

**International Symposium of molecular aesthetics**, July 2011, Karlsruhe, Deutschland. Design einer 3D Ausstellung in Zusammenarbeit mit dem Zentrum für Kunst und Medien (ZKM) Karlsruhe unter dem Titel: „*Molecules That Changed the World.*“

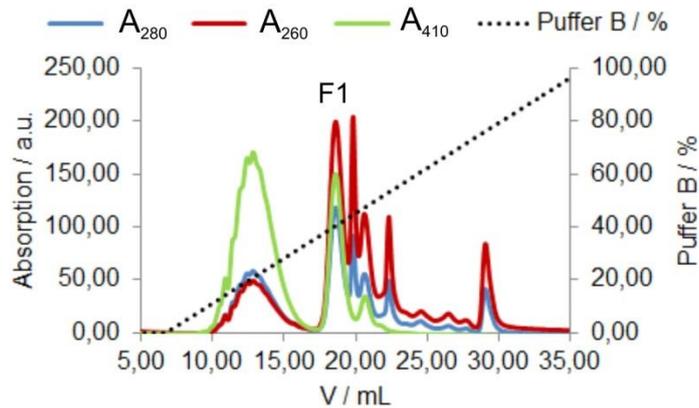
**CFN-Nano-Biology Summer School**, September 2011, Bad-Herrenalb, Deutschland. Organisationsgremium der CFN-Summer School 2011.

## 11 Anhang

### 11.1 Lichtinduzierte Protein DNA Konjugation

#### 11.1.1 Reinigung des MbD1<sub>Chem</sub> Konjugats

(A)



(B)

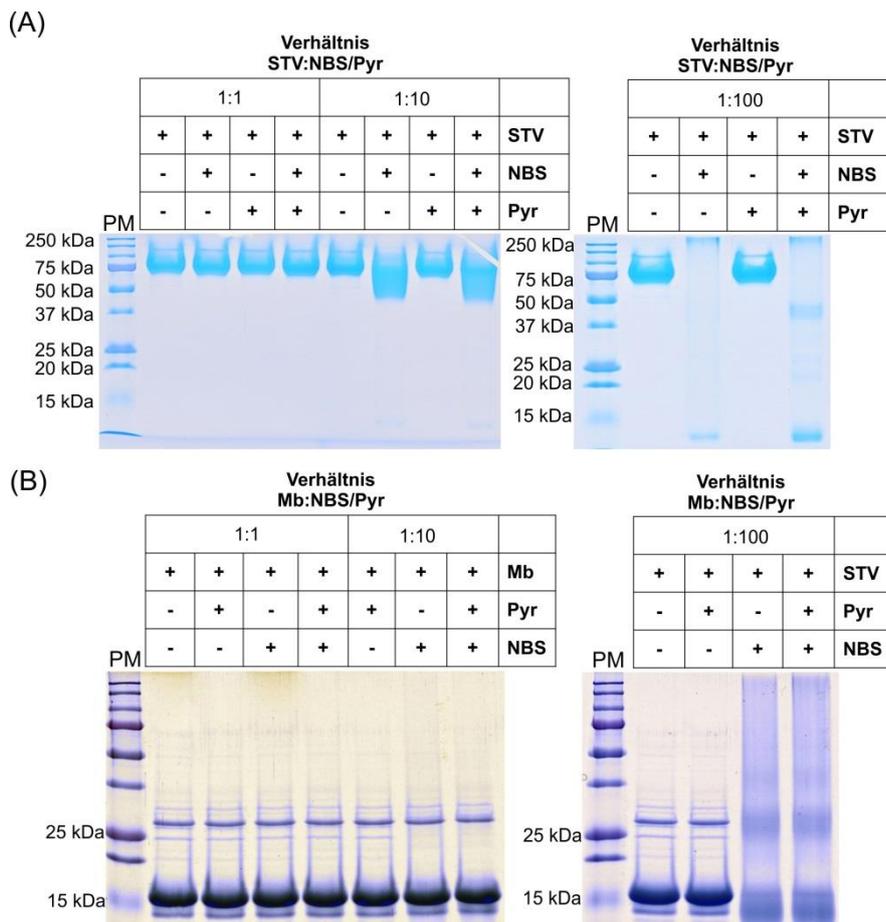
Fraktion	A <sub>410</sub>	A <sub>260</sub>	c(DNA) [μM]	c(Mb) [μM]	A <sub>410</sub> /A <sub>260</sub>	Verhältnis (DNA/Mb)
F1	0,41	0,48	3	2,34	0,9	1,3

**Abbildung 98:** (A) FPLC Chromatogramm zur Aufreinigung des MbD1<sub>Chem</sub> Konjugats mittels Anionenaustauschchromatographie. Detektiert wurden die Absorptionen der Probe bei 280 nm (blauer Verlauf), 260 nm (roter Verlauf) und 410 nm (grüner Verlauf). Die Salzkonzentration wurde graduell gesteigert, indem der Anteil des Anionenaustauschpuffers B (schwarz gepunktet) linear innerhalb von 35 min auf 100 % erhöht wurde. **Puffer A:** 20 mM Tris (pH = 8,3); **Puffer B:** 20 mM Tris, 1M NaCl (pH = 8,3). (B) Ermittelte Absorption des MbD1<sub>Chem</sub> Konjugats bei 410 nm bzw. 260 nm und die daraus berechneten Konzentrationen und DNA/Mb Verhältnisse nach Kapitel 3.1.5.

## 11.2 DNA Modifizierung von Tyrosinen

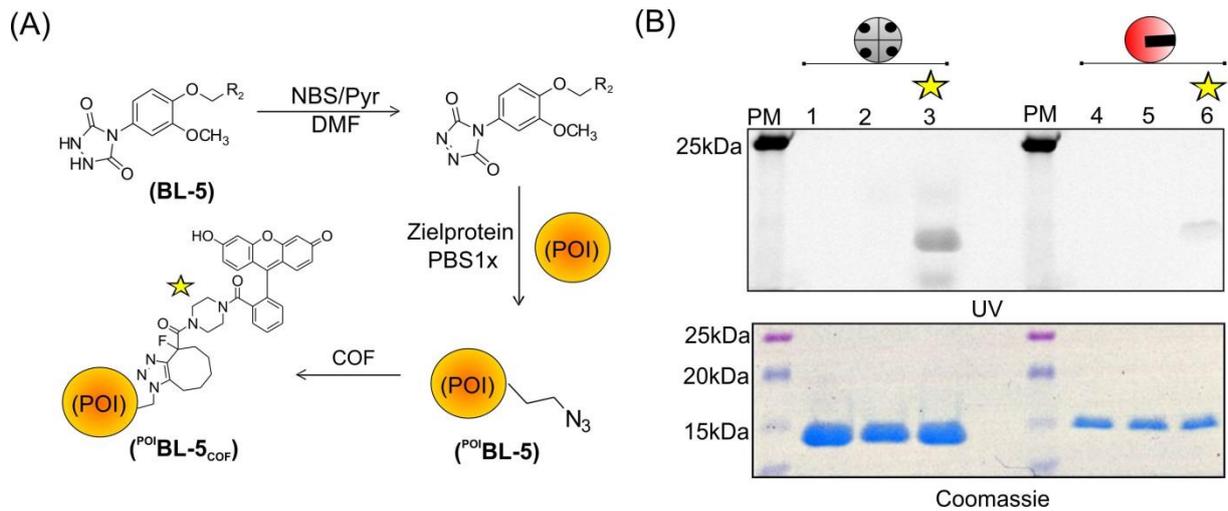
### 11.2.1 Einfluss von N-Bromsuccinimid und Pyridin auf die Stabilität der Modelproteine

Um die Stabilität der Modelproteine von Streptavidin und Myoglobin unter den Einfluss von N-Bromsuccinimid (NBS) und Pyridin (Pyr) zu testen, wurden 1 nmol STV [100 µM] bzw. 1 nmol Mb [100 µM] in PBS 1x Puffer mit unterschiedlichen Verhältnissen (1:1; 1:10 bzw. 1:100) von NBS oder Pyr für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die NBS und Pyr Stammlösungen wurden in DMF hergestellt [ca. 0,125 M] und es wurde präzise darauf geachtet, dass der Anteil von DMF in allen Reaktionslösungen ca. 8 % betrug. 400 pmol der Reaktionslösungen wurden in ein 12 %-iges natives Gel aufgetragen und die Gele nach der PAGE mittels Coomassie Blau Färbung dokumentiert. In Abbildung 99 ist deutlich zu erkennen, dass das Protein STV nach einem 100fachen Überschuss in seine Monomeren Untereinheiten zerfällt und das Myoglobin ein stark beeinträchtigtes Laufverhalten aufweist, welches auf eine Veränderung der Proteinstruktur hindeutet.

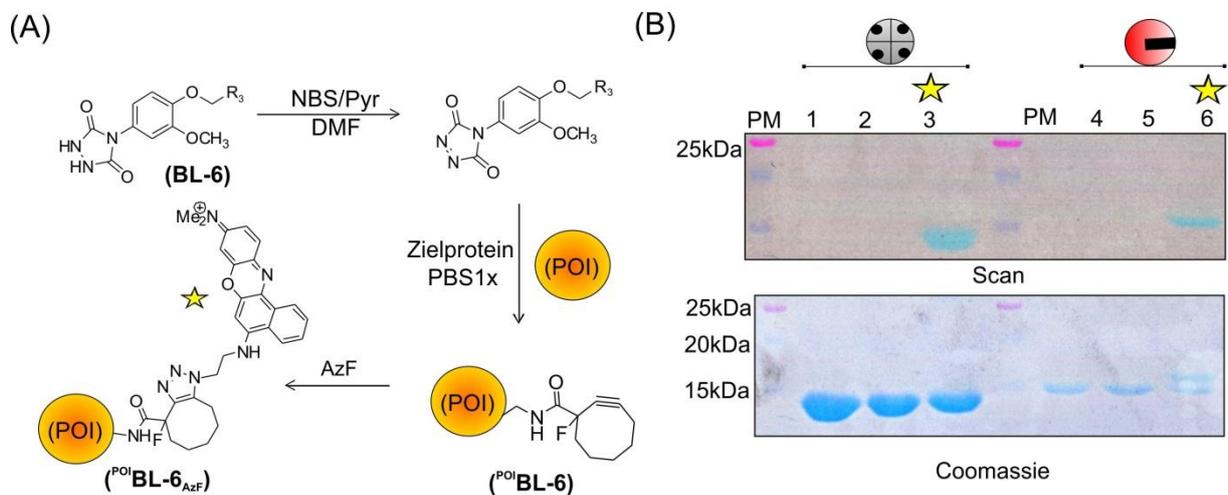


**Abbildung 99:** Nicht denaturierende PAGE zur Analyse des Einflusses von NBS und Pyridin auf die Stabilität der Modelproteine Myoglobin (Mb) und Streptavidin (STV). **Konditionen:** 12 % PA-Gel, 100 V; **Laufpuffer:** TBE 1x (pH = 8,3); **Färbung:** Coomassie Balu. **PM:** Protein Marker.

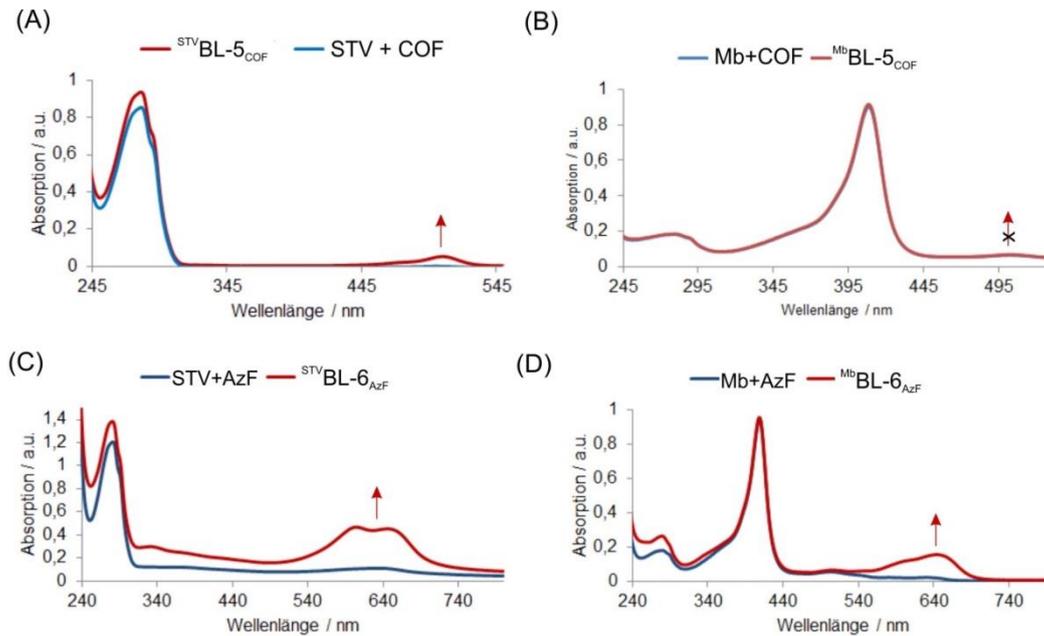
## 11.2.2 Fluorophormodifizierungen von Tyrosinen



**Abbildung 100:** (A) Schematische Darstellung der Kupplung des fluoreszierenden Farbstoffs **COF** auf die **BL-5** modifizierten POI („protein of interest“) Oberflächen. (B) 12%ige SDS-PA-Gel zur Charakterisierung der Konjugate <sup>STV</sup>**BL-5**<sub>COF</sub> (Bahn 1-3) und <sup>Mb</sup>**BL-5**<sub>COF</sub> (Bahn 4-6). **PM**: Protein Marker; **1**: natives Streptavidin (**STV**); **2**: natives **STV** inkubiert mit **COF**; **3**: <sup>STV</sup>**BL-5**<sub>COF</sub>; **4**: natives Myoglobin (**Mb**); **5**: natives **Mb** inkubiert mit **COF**; **6**: <sup>Mb</sup>**BL-5**<sub>COF</sub>. Das Gel wurde zunächst nach UV Anregung charakterisiert und anschließend die Proteine mittels Coomassie-Brilliant-Blau gefärbt.



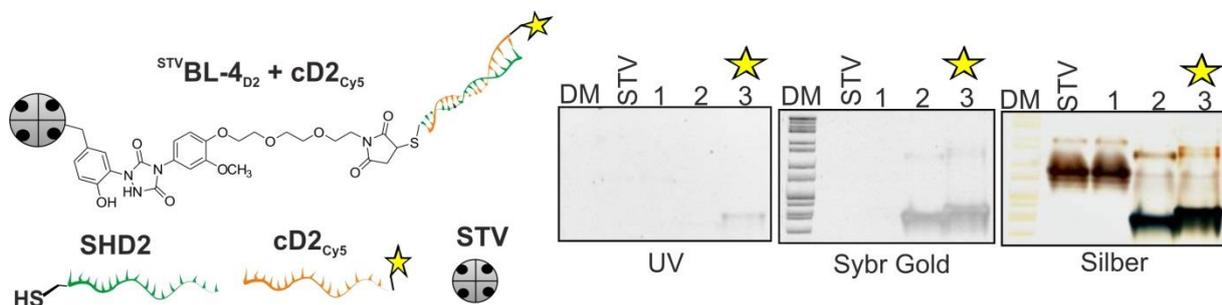
**Abbildung 101:** (A) Schematische Darstellung der Kupplung des fluoreszierenden Farbstoffs **AzF** auf die **BL-6** modifizierten POI („protein of interest“) Oberflächen. (B) 12%ige SDS-PA-Gel zur Charakterisierung der Konjugate <sup>STV</sup>**BL-6**<sub>AzF</sub> (Bahn 1-3) und <sup>Mb</sup>**BL-6**<sub>AzF</sub> (Bahn 4-6). **PM**: Protein Marker; **1**: natives Streptavidin (**STV**); **2**: natives **STV** inkubiert mit **AzF**; **3**: <sup>STV</sup>**BL-6**<sub>AzF</sub>; **4**: natives Myoglobin (**Mb**); **5**: natives **Mb** inkubiert mit **AzF**; **6**: <sup>Mb</sup>**BL-6**<sub>AzF</sub>. Das Gel wurde zunächst nach UV Anregung charakterisiert und anschließend die Proteine mittels Coomassie-Brilliant-Blau gefärbt.



**Abbildung 102:** UV-Vis Spektren zur Charakterisierung der Kupplung des **COF** (A-B) bzw. **AzF** (C-D) Farbstoffes auf die **BL-5** bzw. **BL-6** modifizierten POI Oberflächen. **(A)** UV-Vis Spektren nach der Inkubationen von nativen **STV** (blaues Spektrum) bzw. dem modifizierten **<sup>STV</sup>BL-5** Protein (rotes Spektrum) mit dem Fluorophor **COF**. **(B)** UV-Vis Spektren nach der Inkubation von nativen **Mb** (blaues Spektrum) bzw. dem modifizierten **<sup>Mb</sup>BL-5** Protein (rotes Spektrum) mit dem Fluorophor **COF**. **(C)** UV-Vis Spektren nach der Inkubationen von nativen **STV** (blaues Spektrum) bzw. dem modifizierten **<sup>STV</sup>BL-6** Protein (rotes Spektrum) mit dem Fluorophor **AzF**. **(D)** UV-Vis Spektren nach der Inkubation von nativen **Mb** (blaues Spektrum) bzw. dem modifizierten **<sup>Mb</sup>BL-6** Protein (rotes Spektrum) mit dem Fluorophor **AzF**.

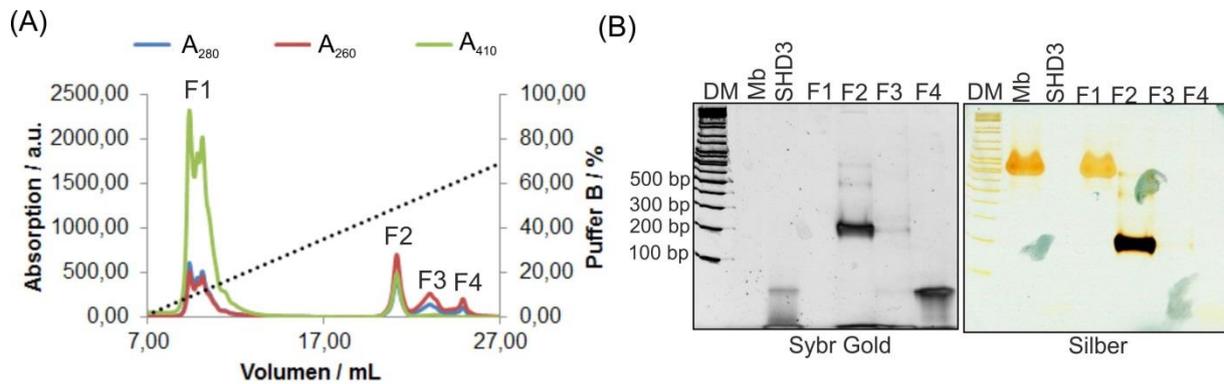
### 11.2.3 Reinigung der synthetisierten Konjugate

<sup>STV</sup>BL-4<sub>D2</sub>+cD2<sub>Cy5</sub>



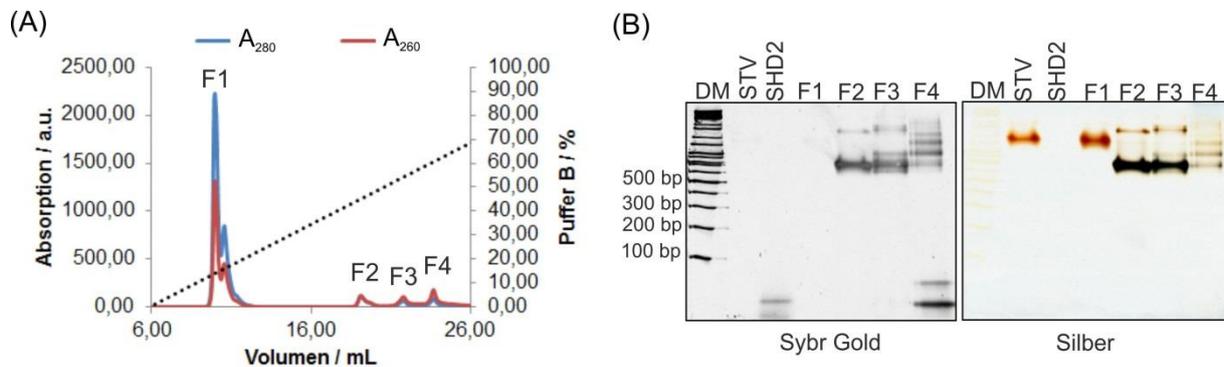
**Abbildung 103:** Hyridisierungstest des **<sup>STV</sup>BL-4<sub>D2</sub>** Konjugats mit der komplementären ssDNA **cD2<sub>Cy5</sub>** und die Charakterisierung mittels nPAGE. **DM:** 10 kbp DNA-Marker; **Mb:** natives Streptavidin; **1:** Negativ Kontrolle, **STV** inkubiert mit **SHD2** und **cD2<sub>Cy5</sub>**; **2:** **<sup>STV</sup>BL-4<sub>D2</sub>** Konjugat; **3:** **<sup>STV</sup>BL-4<sub>D2</sub>** Konjugat inkubiert mit einem 10fachen Überschuss an **cD2<sub>Cy5</sub>**; **Konditionen:** 12,5 % PA-Gel, 120 V; **Laufpuffer:** Tris-Glycin; **Reihenfolge der Visualisierung:** 1) UV-Anregung 2) SybrGold®-Färbung, 2) Silberfärbung.

MbBL-4D3



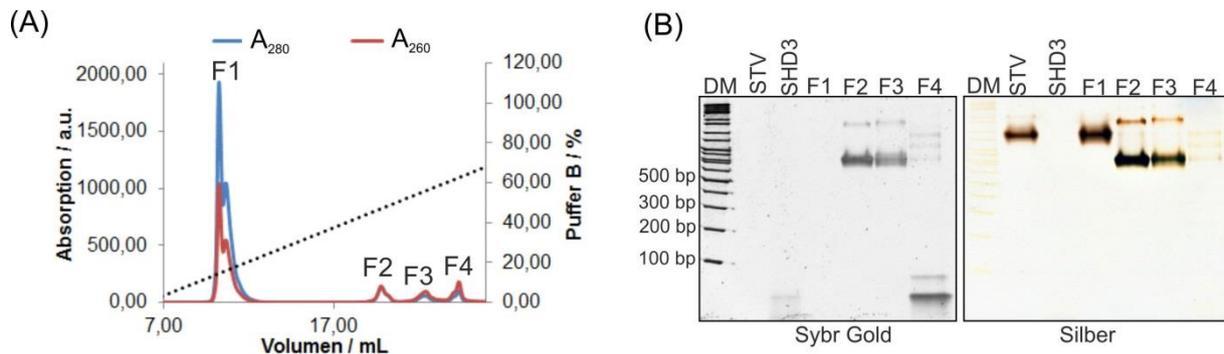
**Abbildung 104:** (A) FPLC Chromatogramm zur Aufreinigung des <sup>Mb</sup>BL-4<sub>D3</sub> Konjugats mittels Anionenaustauschchromatographie. Detektiert wurden die Absorptionen der Probe bei 280 nm (blau), 260 nm (rot) und 410 nm (grün). Die Salzkonzentration wurde graduell gesteigert, indem der Anteil des Anionenaustauschpuffers B (schwarz gepunktet) linear innerhalb von 35 min auf 100 % erhöht wurde. **Puffer A:** 20 mM Tris (pH = 8,3); **Puffer B:** 20 mM Tris, 1M NaCl (pH = 8,3). (B) Native PAGE Charakterisierung der FPLC Fraktionen F1, F2, F3 und F4. Als Referenzproben wurden die Edukte SH<sub>2</sub>D3 und Mb aufgetragen. **Konditionen:** 12,5 % PA-Gel, 120 V; **Laufpuffer:** Tris-Glycin (pH = 8,3); **Reihenfolge der Färbung:** 1) SybrGold®, 2) Silber; **DM:** 10 kbp DNA-Marker

STVBL-4D2



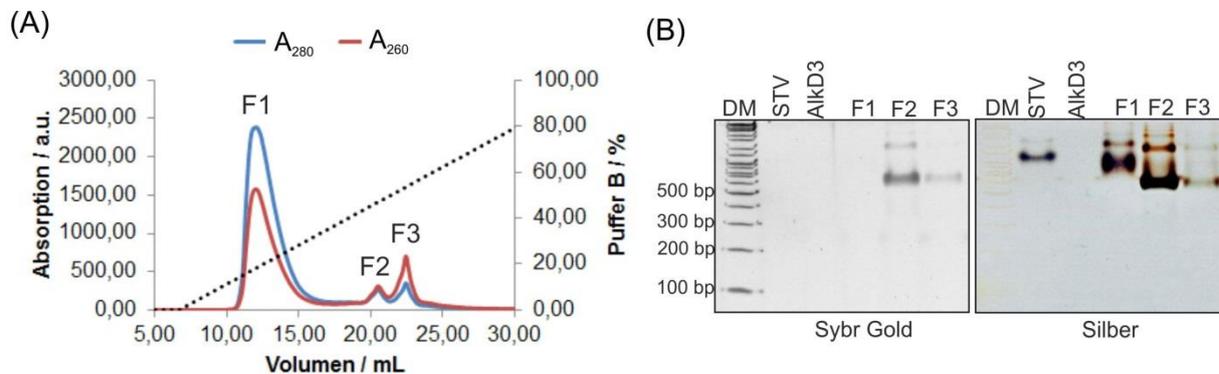
**Abbildung 105:** (A) FPLC Chromatogramm zur Aufreinigung des <sup>STV</sup>BL-4<sub>D2</sub> Konjugats mittels Anionenaustauschchromatographie. Detektiert wurden die Absorptionen der Probe bei 280 nm (blau) und 260 nm (rot). Die Salzkonzentration wurde graduell gesteigert, indem der Anteil des Anionenaustauschpuffers B (schwarz gepunktet) linear innerhalb von 35 min auf 100 % erhöht wurde. **Puffer A:** 20 mM Tris (pH = 8,3); **Puffer B:** 20 mM Tris, 1M NaCl (pH = 8,3). (B) Native PAGE Charakterisierung der FPLC Fraktionen F1, F2, F3 und F4. Als Referenzproben wurden die Edukte SH<sub>2</sub>D2 und STV aufgetragen. **Konditionen:** 12,5 % PA-Gel, 120 V; **Laufpuffer:** Tris-Glycin (pH = 8,3); **Reihenfolge der Färbung:** 1) SybrGold®, 2) Silber; **DM:** 10 kbp DNA-Marker

STVBL-4<sub>D3</sub>



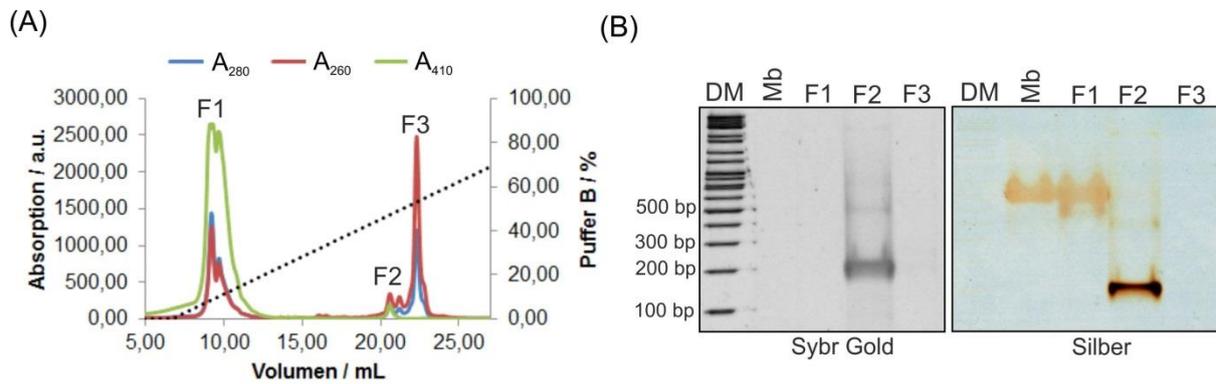
**Abbildung 106:** (A) FPLC Chromatogramm zur Aufreinigung des <sup>STV</sup>BL-4<sub>D3</sub> Konjugats mittels Anionenaustauschchromatographie. Detektiert wurden die Absorptionen der Probe bei 280 nm (blau) und 260 nm (rot). Die Salzkonzentration wurde graduell gesteigert, indem der Anteil des Anionenaustauschpuffers B (schwarz gepunktet) linear innerhalb von 35 min auf 100 % erhöht wurde. **Puffer A:** 20 mM Tris (pH = 8,3); **Puffer B:** 20 mM Tris, 1M NaCl (pH = 8,3). (B) Native PAGE Charakterisierung der FPLC Fraktionen F1, F2, F3 und F4. Als Referenzproben wurden die Edukte SH<sub>2</sub>D3 und STV aufgetragen. **Konditionen:** 12,5 % PA-Gel, 120 V; **Laufpuffer:** Tris-Glycin (pH = 8,3); **Reihenfolge der Färbung:** 1) SybrGold®, 2) Silber; **DM:** 10 kbp DNA-Marker

STVBL-5<sub>D3</sub>



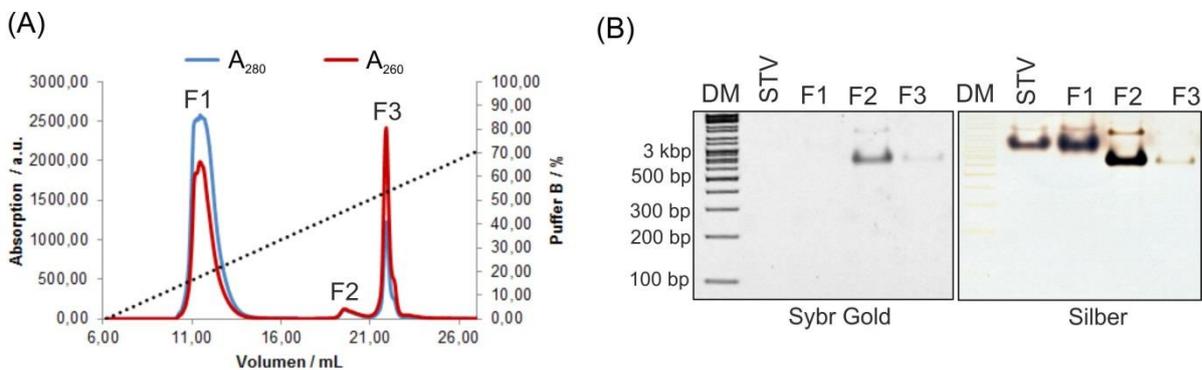
**Abbildung 107:** (A) FPLC Chromatogramm zur Aufreinigung des <sup>STV</sup>BL-5<sub>D3</sub> Konjugats mittels Anionenaustauschchromatographie. Detektiert wurden die Absorptionen der Probe bei 280 nm (blau) und 260 nm (rot). Die Salzkonzentration wurde graduell gesteigert, indem der Anteil des Anionenaustauschpuffers B (schwarz gepunktet) linear innerhalb von 35 min auf 100 % erhöht wurde. **Puffer A:** 20 mM Tris (pH = 8,3); **Puffer B:** 20 mM Tris, 1M NaCl (pH = 8,3). (B) Native PAGE Charakterisierung der FPLC Fraktionen F1, F2 und F3. Als Referenzproben wurden die Edukte AIKD3 und STV aufgetragen. **Konditionen:** 12,5 % PA-Gel, 120 V; **Laufpuffer:** Tris-Glycin (pH = 8,3); **Reihenfolge der Färbung:** 1) SybrGold®, 2) Silber; **DM:** 10 kbp DNA-Marker

MbBL-6<sub>D2</sub>



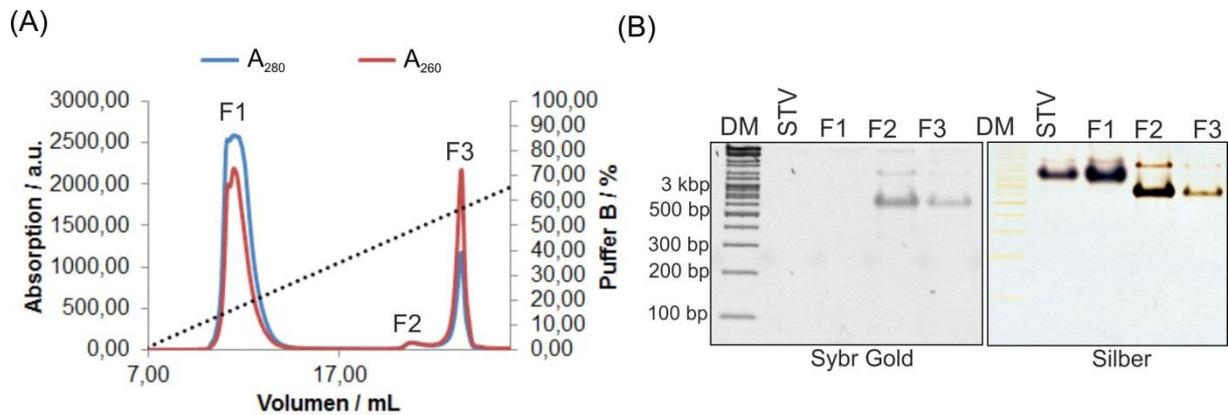
**Abbildung 108:** (A) FPLC Chromatogramm zur Reinigung des <sup>Mb</sup>BL-6<sub>D2</sub> Konjugats mittels Anionenaustauschchromatographie. Detektiert wurden die Absorptionen der Probe bei 280 nm (blau), 260 nm (rot) und 410 nm (grün). Die Salzkonzentration wurde graduell gesteigert, indem der Anteil des Anionenaustauschpuffers B (schwarz gepunktet) linear innerhalb von 35 min auf 100 % erhöht wurde. **Puffer A:** 20 mM Tris (pH = 8,3); **Puffer B:** 20 mM Tris, 1M NaCl (pH = 8,3). (B) Native PAGE Charakterisierung der FPLC Fraktionen F1, F2 und F3. Als Referenzproben wurde das native Mb aufgetragen. **Konditionen:** 12,5 % PA-Gel, 120 V; **Laufpuffer:** Tris-Glycin (pH = 8,3); **Reihenfolge der Färbung:** 1) SybrGold®, 2) Silber; **DM:** 10 kbp DNA-Marker

STVBL-6<sub>D2</sub>



**Abbildung 109:** (A) FPLC Chromatogramm zur Reinigung des <sup>STV</sup>BL-6<sub>D2</sub> Konjugats mittels Anionenaustauschchromatographie. Detektiert wurden die Absorptionen der Probe bei 280 nm (blau) und 260 nm (rot). Die Salzkonzentration wurde graduell gesteigert, indem der Anteil des Anionenaustauschpuffers B (schwarz gepunktet) linear innerhalb von 35 min auf 100 % erhöht wurde. **Puffer A:** 20 mM Tris (pH = 8,3); **Puffer B:** 20 mM Tris, 1M NaCl (pH = 8,3). (B) Native PAGE Charakterisierung der FPLC Fraktionen F1, F2 und F3. Als Referenzproben wurde natives STV aufgetragen. **Konditionen:** 12,5 % PA-Gel, 120 V; **Laufpuffer:** Tris-Glycin (pH = 8,3); **Reihenfolge der Färbung:** 1) SybrGold®, 2) Silber; **DM:** 10 kbp DNA-Marker.

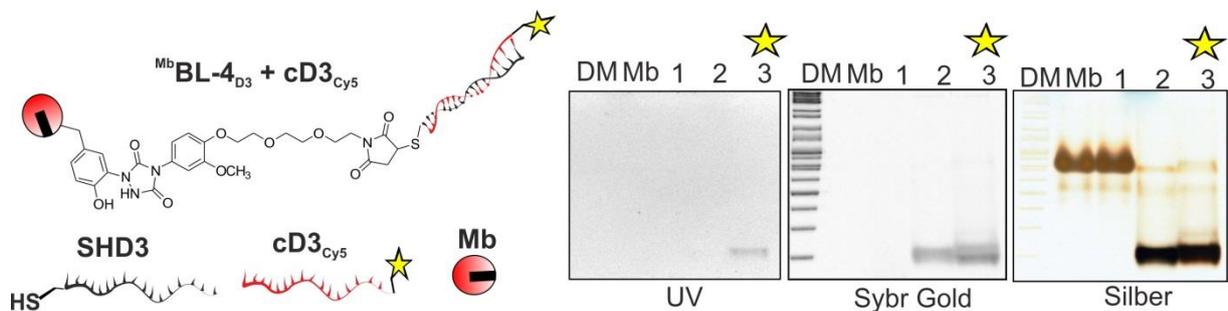
STV  
BL-6<sub>D3</sub>



**Abbildung 110:** (A) FPLC Chromatogramm zur Reinigung des <sup>STV</sup>BL-6<sub>D3</sub> Konjugats mittels Anionen-austauschchromatographie. Detektiert wurden die Absorptionen der Probe bei 280 nm (blau) und 260 nm (rot). Die Salzkonzentration wurde graduell gesteigert, indem der Anteil des Anionenaustauschpuffers B (schwarz gepunktet) linear innerhalb von 35 min auf 100 % erhöht wurde. **Puffer A:** 20 mM Tris (pH = 8,3); **Puffer B:** 20 mM Tris, 1M NaCl (pH = 8,3). (B) Native PAGE Charakterisierung der FPLC Fraktionen F1, F2 und F3. Als Referenzproben wurde natives STV aufgetragen. **Konditionen:** 12,5 % PA-Gel, 120 V; **Laufpuffer:** Tris-Glycin (pH = 8,3); **Reihenfolge der Färbung:** 1) SybrGold®, 2) Silber; **DM:** 10 kbp DNA-Marker.

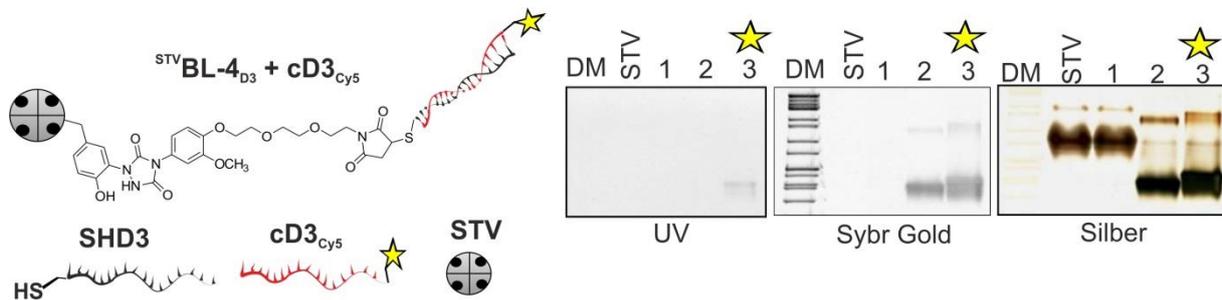
#### 11.2.4 Hybridisierungstests der gereinigten Protein-DNA Konjugate

Mb  
BL-4<sub>D3</sub>+cD3<sub>Cy5</sub>



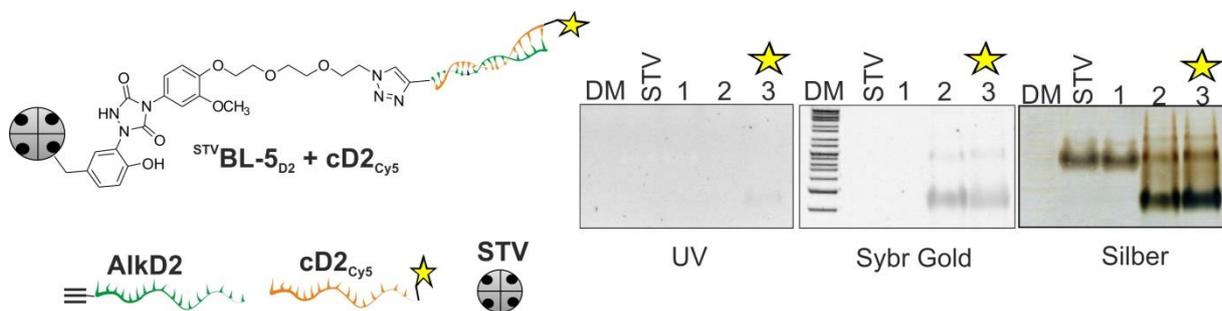
**Abbildung 111:** Hybridisierungstest des <sup>Mb</sup>BL-4<sub>D3</sub> Konjugats mit der komplementären ssDNA cD3<sub>Cy5</sub> und die Charakterisierung mittels nPAGE. **DM:** 10 kbp DNA-Marker; **Mb:** natives Myoglobin; **1:** Negativ Kontrolle, **Mb** inkubiert mit SHD3 und cD3<sub>Cy5</sub>; **2:** <sup>Mb</sup>BL-4<sub>D3</sub> Konjugat; **3:** <sup>Mb</sup>BL-4<sub>D3</sub> Konjugat inkubiert mit einem 10fachen Überschuss an cD3<sub>Cy5</sub>; **Konditionen:** 12,5 % PA-Gel, 120 V; **Laufpuffer:** Tris-Glycin; **Reihenfolge der Visualisierung:** 1) UV-Anregung 2) SybrGold®-Färbung, 2) Silberfärbung.

STV BL-4<sub>D3</sub>+cD3<sub>Cy5</sub>



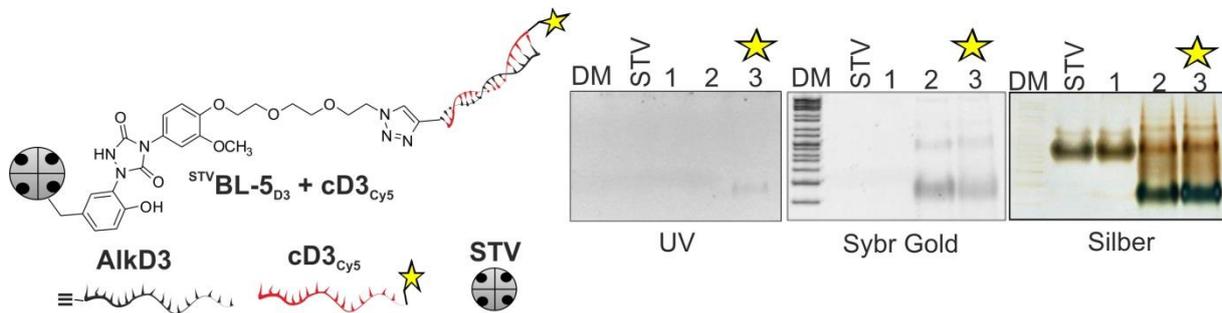
**Abbildung 112:** Hybridisierungstest des <sup>STV</sup>BL-4<sub>D3</sub> Konjugats mit der komplementären ssDNA cD3<sub>Cy5</sub> und die Charakterisierung mittels nPAGE. **DM:** 10 kbp DNA-Marker; **Mb:** natives Streptavidin; **1:** Negativ Kontrolle, **STV** inkubiert mit **SHD3** und **cD3<sub>Cy5</sub>**; **2:** <sup>STV</sup>BL-4<sub>D3</sub> Konjugat; **3:** <sup>STV</sup>BL-4<sub>D3</sub> Konjugat inkubiert mit einem 10fachen Überschuss an **cD3<sub>Cy5</sub>**; **Konditionen:** 12,5 % PA-Gel, 120 V; **Laufpuffer:** Tris-Glycin; **Reihenfolge der Visualisierung:** 1) UV-Anregung 2) SybrGold®-Färbung, 2) Silberfärbung.

STV BL-5<sub>D2</sub>+cD2<sub>Cy5</sub>



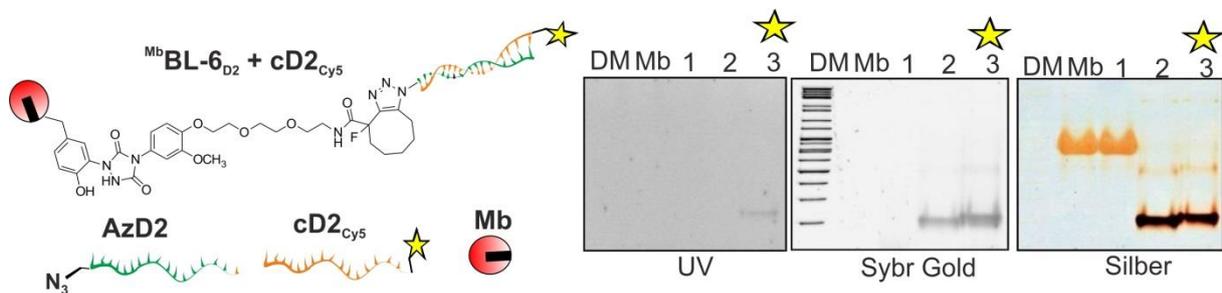
**Abbildung 113:** Hybridisierungstest des <sup>STV</sup>BL-5<sub>D2</sub> Konjugats mit der komplementären ssDNA cD2<sub>Cy5</sub> und die Charakterisierung mittels nPAGE. **DM:** 10 kbp DNA-Marker; **Mb:** natives Streptavidin; **1:** Negativ Kontrolle, **STV** inkubiert mit **AlkD2** und **cD2<sub>Cy5</sub>**; **2:** <sup>STV</sup>BL-5<sub>D2</sub> Konjugat; **3:** <sup>STV</sup>BL-5<sub>D2</sub> Konjugat inkubiert mit einem 10fachen Überschuss an **cD2<sub>Cy5</sub>**; **Konditionen:** 12,5 % PA-Gel, 120 V; **Laufpuffer:** Tris-Glycin; **Reihenfolge der Visualisierung:** 1) UV-Anregung 2) SybrGold®-Färbung, 2) Silberfärbung.

STVBL-5<sub>D3</sub>+cD3<sub>Cy5</sub>



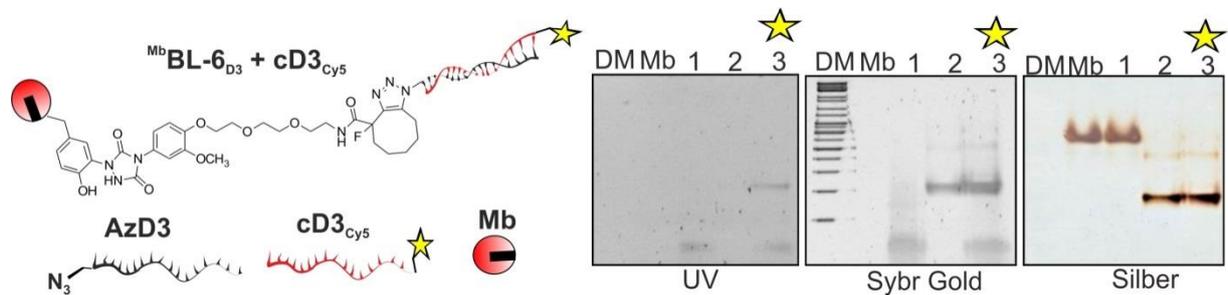
**Abbildung 114:** Hyridisierungstest des <sup>STV</sup>BL-5<sub>D3</sub> Konjugats mit der komplementären ssDNA cD3<sub>Cy5</sub> und die Charakterisierung mittels nPAGE. **DM:** 10 kbp DNA-Marker; **Mb:** natives Streptavidin; **1:** Negativ Kontrolle, **STV** inkubiert mit AlkD3 und cD3<sub>Cy5</sub>; **2:** <sup>STV</sup>BL-5<sub>D3</sub> Konjugat; **3:** <sup>STV</sup>BL-5<sub>D3</sub> Konjugat inkubiert mit einem 10fachen Überschuss an cD3<sub>Cy5</sub>; **Konditionen:** 12,5 % PA-Gel, 120 V; **Laufpuffer:** Tris-Glycin; **Reihenfolge der Visualisierung:** 1) UV-Anregung 2) SybrGold<sup>®</sup>-Färbung, 2) Silberfärbung.

MbBL-6<sub>D2</sub>+cD2<sub>Cy5</sub>



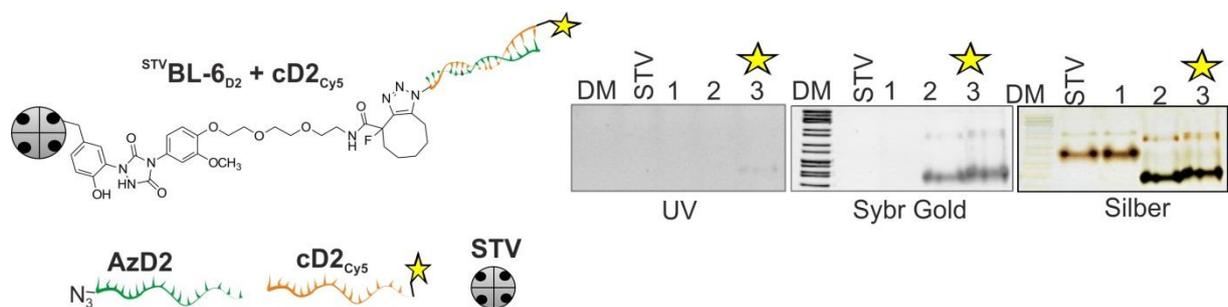
**Abbildung 115:** Hyridisierungstest des <sup>Mb</sup>BL-6<sub>D2</sub> Konjugats mit der komplementären ssDNA cD2<sub>Cy5</sub> und die Charakterisierung mittels nPAGE. **DM:** 10 kbp DNA-Marker; **Mb:** natives Myoglobin; **1:** Negativ Kontrolle, **Mb** inkubiert mit AzD2 und cD2<sub>Cy5</sub>; **2:** <sup>Mb</sup>BL-6<sub>D2</sub> Konjugat; **3:** <sup>Mb</sup>BL-6<sub>D2</sub> Konjugat inkubiert mit einem 10fachen Überschuss an cD2<sub>Cy5</sub>; **Konditionen:** 12,5 % PA-Gel, 120 V; **Laufpuffer:** Tris-Glycin; **Reihenfolge der Visualisierung:** 1) UV-Anregung 2) SybrGold<sup>®</sup>-Färbung, 2) Silberfärbung.

MbBL-6<sub>D3</sub>+cD3<sub>Cy5</sub>



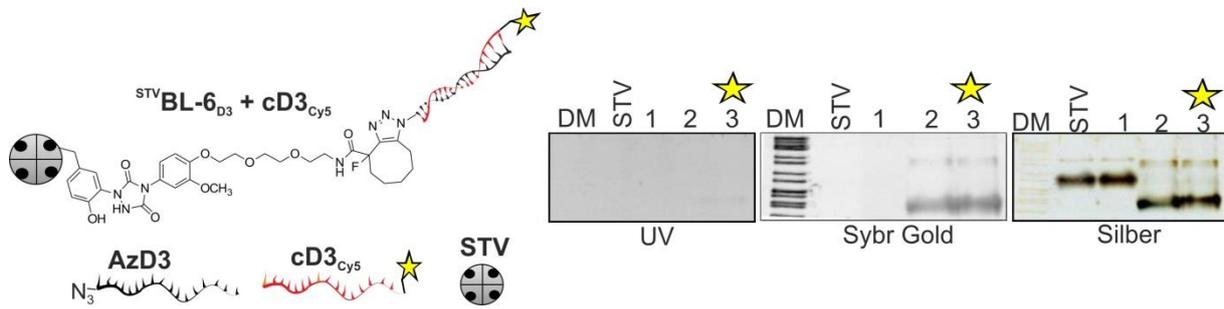
**Abbildung 116:** Hybridisierungstest des <sup>Mb</sup>BL-6<sub>D3</sub> Konjugats mit der komplementären ssDNA <sup>cD3</sup>Cy5 und die Charakterisierung mittels nPAGE. **DM:** 10 kbp DNA-Marker; **Mb:** natives Myoglobin; **1:** Negativ Kontrolle, **Mb** inkubiert mit **AzD3** und **cD3<sub>Cy5</sub>**; **2:** <sup>Mb</sup>BL-4<sub>D3</sub> Konjugat; **3:** <sup>Mb</sup>BL-6<sub>D3</sub> Konjugat inkubiert mit einem 10fachen Überschuss an **cD3<sub>Cy5</sub>**; **Konditionen:** 12,5 % PA-Gel, 120 V; **Laufpuffer:** Tris-Glycin; **Reihenfolge der Visualisierung:** 1) UV-Anregung 2) SybrGold®-Färbung, 2) Silberfärbung.

STVBL-6<sub>D2</sub>+cD2<sub>Cy5</sub>



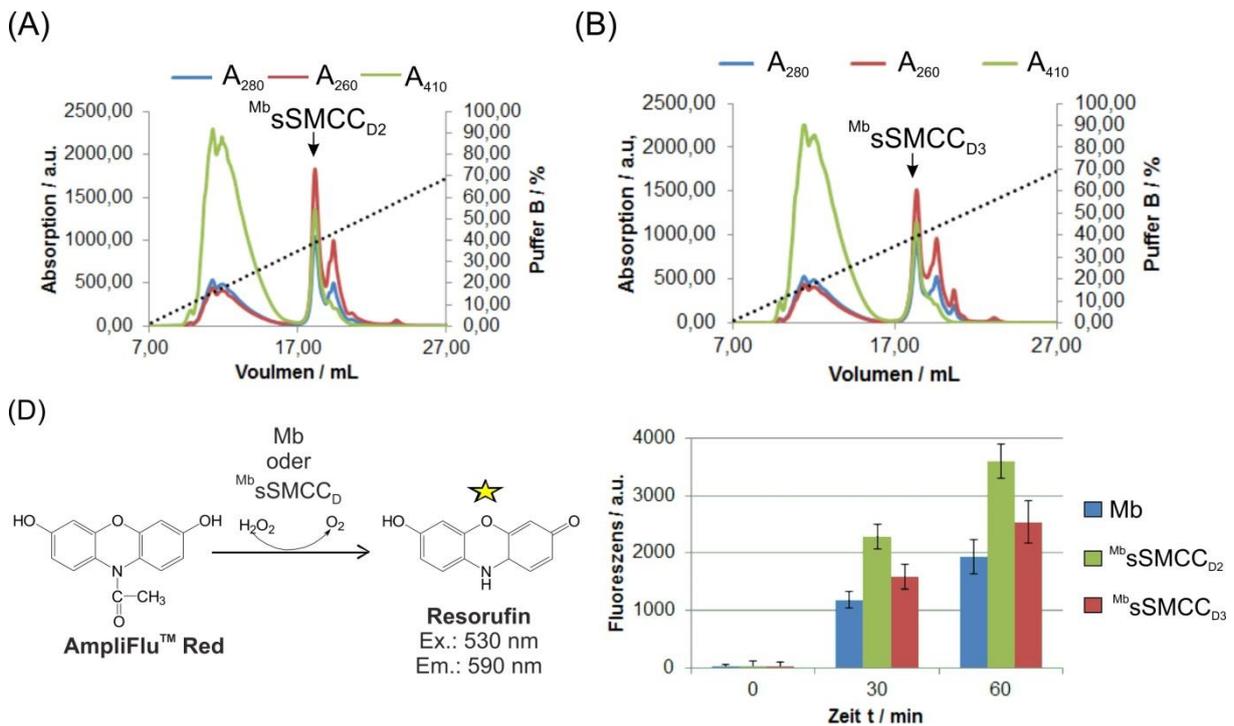
**Abbildung 117:** Hybridisierungstest des <sup>STV</sup>BL-6<sub>D2</sub> Konjugats mit der komplementären ssDNA <sup>cD2</sup>Cy5 und die Charakterisierung mittels nPAGE. **DM:** 10 kbp DNA-Marker; **Mb:** natives Streptavidin; **1:** Negativ Kontrolle, **STV** inkubiert mit **AzD2** und **cD2<sub>Cy5</sub>**; **2:** <sup>STV</sup>BL-6<sub>D2</sub> Konjugat; **3:** <sup>STV</sup>BL-6<sub>D2</sub> Konjugat inkubiert mit einem 10fachen Überschuss an **cD2<sub>Cy5</sub>**; **Konditionen:** 12,5 % PA-Gel, 120 V; **Laufpuffer:** Tris-Glycin; **Reihenfolge der Visualisierung:** 1) UV-Anregung 2) SybrGold®-Färbung, 2) Silberfärbung.

STV BL-6<sub>D3</sub>+cD3<sub>Cy5</sub>



**Abbildung 118:** Hyridisierungstest des <sup>STV</sup>BL-6<sub>D3</sub> Konjugats mit der komplementären ssDNA cD3<sub>Cy5</sub> und die Charakterisierung mittels nPAGE. **DM:** 10 kbp DNA-Marker; **Mb:** natives Streptavidin; **1:** Negativ Kontrolle, **STV** inkubiert mit **AzD3** und **cD3<sub>Cy5</sub>**; **2:** <sup>STV</sup>BL-5<sub>D3</sub> Konjugat; **3:** <sup>STV</sup>BL-6<sub>D3</sub> Konjugat inkubiert mit einem 10fachen Überschuss an **cD3<sub>Cy5</sub>**; **Konditionen:** 12,5 % PA-Gel, 120 V; **Laufpuffer:** Tris-Glycin; **Reihenfolge der Visualisierung:** 1) UV-Anregung 2) SybrGold®-Färbung, 2) Silberfärbung.

### 11.2.5 Reinigung und Aktivitätstest der <sup>Mb</sup>sSMCC<sub>D2</sub> und <sup>Mb</sup>sSMCC<sub>D3</sub> Konjugate



**Abbildung 119:** FPLC Chromatogramme zur Reinigung des <sup>Mb</sup>sSMCC<sub>D2</sub> (A) bzw. <sup>Mb</sup>sSMCC<sub>D3</sub> (B) Konjugats mittels Anionenaustauschchromatographie. Detektiert wurden die Absorptionen der Probe bei 280 nm (blau), 260 nm (rot) und 410 nm (grün). Die Salzkonzentration wurde graduell gesteigert, indem der Anteil des Anionenaustauschpuffers B (schwarz gepunktet) linear innerhalb von 35 min auf 100 % erhöht wurde. **Puffer A:** 20 mM Tris (pH = 8,3); **Puffer B:** 20 mM Tris, 1M NaCl (pH = 8,3). (C) AmpliFu™ Red Aktivitätstest der Konjugate <sup>Mb</sup>sSMCC<sub>D2</sub> (grün) bzw. <sup>Mb</sup>sSMCC<sub>D3</sub> (rot) im Vergleich zum nativen Myoglobin (**Mb**; **blau**).

## 11.3 Origami

### 11.3.1 Verwendete Helferstränge

**Tabelle 40:** Verwendete Helferstränge zur Faltung eines rechteckigen DNA Origamis (**Ori**). Die gelb markierten Helferstränge wurden zur Modifikation des Origamis mit Fängeroligonukleotiden mit den Helfersträngen aus Tabelle 41 ausgetauscht.

Name/Position	Sequenz (5' - 3')
B-18,214	GAATTTACTACCGCCACCCTCAGAACCGCCAC
B-18,246	CTTTTGATAATAGGTGTATCACCGTACTCAGG
B-18,278	GTTTTAACCCGTCGAGAGGGTTGATATAAGTA
B-18,310	GCCCGTATCGGGGTTTTGCTCAGTACCAGGCG
B-18,342	TTCGGAACCTGAGACTCCTCAAGAGAAGGATT
B-38,214	TGAAACCATGATATTCACAAACAACAGTCTCT
B-38,246	GCGACAGACAGGAGTTGAGGCAGATACATGG
B-38,278	CTGTAGCGAGAACCACCACCAGAGGGTAATAA
B-38,310	TAGCCCCCCCCTCAGAGCCACCACGTAACAGT
B-38,342	TAATCAAACCTCCCTCAGAGCCGCCCTGCCTAT
B-58,214	ACGCAATAGCCAGCAAAATCACCAGTCACCAA
B-58,246	GCATGATCCGTCACCGACTTGAGAATCAGTA
B-58,278	TAGCAAACGACGGAAATTATTCATGCGTCAGA
B-58,310	GCAACATATTCAACCGATTGAGGGTTCGGTCA
B-58,342	GAATAAGTGGTTTACCAGCGCCAATCTTTTCA
B-78,214	GAGCGTCTTTTTTAAGAAAAGTAACCGAGGAA
B-78,246	CAAAATAAATGAAATAGCAATAGCAAGAACTG
B-78,278	CAAATAAGTGAGTTAAGCCCAATACAGTATGT
B-78,310	AAATGAAAGCGCTAATATCAGAGATAAAGGTG
B-78,342	ACATAAAAGAACCCTGAACAAAACACCACG
B-98,214	GTTTATCATTAGTTGCTATTTTGCACGCTAAC
B-98,246	AAAATAATCTTGCGGGAGGTTTTGGCCAGTTA
B-98,278	TAGAAACCAAGAACGCGAGGCGTTTCCCAATC
B-98,310	TATCATTCAAATCAGATATAGAAGAACGTCAA
B-98,342	CCGCACTCCGTAGGAATCATTACCAGAGAATA
B-118,214	AACTTTTTAATTCTGTCCAGACGAACGCGCCT
B-118,246	CTTCTGACAGAGAATATAAAGTACGAACAAGA
B-118,278	GACCGTGTATTTAGGCAGAGGCATCGAGCATG
B-118,310	TAAACACCAGAATCGCCATATTTATCTTTCCT
B-118,342	CTGTTTAGTAAAGCCAACGCTCAAACCAAGTA
B-138,214	TTCATTCTATAACTATATGTAACGCGAGAA
B-138,246	TGAAACAATACCTTTTTAACCTCCAATTCAT
B-138,278	CATTTAACGTGAATTTATCAAAATGAAATACC
B-138,310	AATGGAAAAGCTTAGATTAAGACGAATAAGAA
B-138,342	GTGAATAATTTCCCTTAGAATCCGAAAAAGC
B-158,214	ATCCTTTGCGGATTGCGCTGATTGGCGAATTA

- Anhang -

---

B-158,246	TTTGAGTAAACAGTACCTTTTACAGAAGATGA
B-158,278	AAACCACCTTTTCAGGTTTAACGTATTAATTA
B-158,310	TTCCTGATCACGTAACAGAAATCCTTTTTT
B-158,342	TATAATCCAGGGTTAGAACCTACCATATGTGA
B-178,214	TTAATGCGACATTTGAGGATTTAGCGTATTA
B-178,246	CCATTAAACAATAATAGATTAGATTTAAAAG
B-178,278	AGATAAAAAAGGTTATCTAAAATAGAACAAAG
B-178,310	CACCGCCTGTTGGCAAATCAACAGTCATCATA
B-178,342	GCAGCAAACAAATATCAAACCCTCTTCATCAA
B-198,214	TCAGTGAGACCTGAAAGCGTAAGAATTAGTCT
B-198,246	ATCACGCAACATTCTGGCCAACAGAAACATCG
B-198,278	TTTGATTAATTCACCAGTCACACGCCAGCAGA
B-198,310	GAAGAATAATCGTCTGAAATGGAAGTATTAA
B-198,342	ATCCAGAAACGCTCATGGAAATACGAGAGCCA
G-12,197	CCTCAGAACCGCCACCCTCAGAGCCACCACCC
G-18,182	CTTTCGAGGCCAGAATGGAAAGCGATAAATCC
G-32,197	TCATTAAAGTGAATTTCTTAAACATCAGCTTG
G-38,182	CGGAGATTTAGCAAGGCCGAAACGTAGCACC
G-52,197	ATTACCATTGTATCATCGCCTGATAAGTACAA
G-58,182	CTCATTATAGTTACCAGAAGGAAAGCAGATAG
G-72,197	CCGAACAAACCAGTCAGGACGTTGAGAACTGG
G-78,182	GAGAATGAATCCTGAATCTTACCAACCCAGCT
G-92,197	ACAATTTTCATAAATCAAAAAATCCAGAAAAC
G-98,182	GACCATTAGTTCAGCTAATGCAGACGACAATA
G-112,197	AACAACATGATACATTTTCGCAAATTTTAGTTT
G-118,182	ATCAATATATCGCAAGACAAAGAATGCTGATG
G-132,197	CAAATCCAGATATTCAACCGTTCTAAATCACC
G-138,182	ATGTGAGCACAAAATCGCGCAGAGCTTTGAAT
G-152,197	ACCAAGTTGAGTAACAACCCGTCGAACATTAA
G-158,182	GACGGCCAAAACAATTTCGACAACTAAGTATTA
G-172,197	GACTTTACGTGCCAAGCTTGCATGTGTAAC
G-178,182	CCGCCTGGATATTTTTGAATGGCTATACGTGG
G-192,197	CACAGACACCCTGAGAGAGTTGCAGCCCTTCA
G-198,182	GAAGGGAAGAATCCTGAGAAGTGTTTTATAA
<b>G-8,365</b>	<b>TGAAAGTATTAAGAGGCTATTATTCTGAAACATTTTTCCACCACC</b>
<b>G-12,229</b>	<b>AGGTTTAGCGTTCAGTAAGCGTCGTCAGACG</b>
G-12,261	TAGCCCGGGATACAGGAGTGTACTCCGCCGCC
<b>G-12,293</b>	<b>GATAAGTGGGGGTCAGTGCCTTGACCTCAGAG</b>
G-12,325	AGGATTAGAAACAGTTAATGCCCCACCCTCAG
G-32,229	ATTGGCCTTCGATAGCAGCACCGTCCATTTGG
G-32,261	AGCATTGAATCAAGTTTGCCTTTATAAAGGTG
G-32,293	CCGCCACCCGTTTTTCATCGGCATTAGGGAAGG
G-32,325	AACCGCCATTATTAGCGTTTGCCAAGACAAAA
G-32,357	GGAACCGCATCACCGGAACCAGAGTTTTTAATAGAAA

- Anhang -

---

G-52,229	GAATTAGAATAACGGAATACCCAATATCTTAC
G-52,261	AATTATCAAAGACTCCTTATTACGATAAGAGC
G-52,293	TAAATATTGTAGAAAATACATACAGATAACCC
G-52,325	GGGCGACATAAAAAGAAACGCAAAGGTCAGAGG
G-52,357	ATTCATATTTATTTTGTGACAATCTTTTTGACGGGAG
G-72,229	CGAAGCCCTCCAGAGCCTAATTTAAGCCTTA
G-72,261	AAGAAACAACAGCCATATTATTTATTAGCGAA
G-72,293	ACAAGAATAAACGATTTTTTGTGTTGCTTATCC
G-72,325	GTAATTGAATAGCAGCCTTTACAGGCGCCCAA
G-72,357	AATTAACTACAGGAAGCGCATTATTTTCCGTTTTT
G-92,229	AATCAAGAACAATAGATAAGTCCTCGACAAAA
G-92,261	CCTCCCGAATCCCATCCTAATTTATTCGAGC
G-92,293	GGTATTCTAATCAATAATCGGCTGACAACGCC
G-92,325	TAGCAAGCCAAGAACGGGTATTAACAGTAGGG
G-92,357	ATTTTCATATCGAGAACAAGCAAGTTTTTCAAATCT
G-112,229	GGTAAAGTCAAATATATTTTAGTTGGCTTAGG
G-112,261	CAGTAATACTAAATTTAATGGTTTCATAGGTC
G-112,293	AACATGTAGATAAATAAGGCGTACTGAGAAG
G-112,325	CTTAATTGGGAATCATAATTACTATTGAAAAC
G-112,357	TACCAGTATATCATATGCGTTATATTTTCGTCGCTA
G-132,229	TTGGGTTAAATTACCTGAGCAAAAATCGGGAGA
G-132,261	TGAGAGACACATCAAGAAAAACAAACAGATGAA
G-132,293	AGTCAATAAATTTTCATTTGAATTTAAAAGAAAT
G-132,325	ATAGCGATCAGTACATAAATCAATATATCAAA
G-132,357	TTAATTAACCTTGCTTCTGTAAATTTTTACTTCTGA
G-152,229	AACAATAACCCGAACGTTATTAATGCCGTCAA
G-152,261	TATACAGTACATTATCATTGCGTCTTTAGG
G-152,293	TGCGTAGAAGAAGGAGCGGAATTATTGAAAAGG
G-152,325	ATTATTTGTATCAGATGATGGCAAAATCAATA
G-152,357	ATAATGGATGATTGTTTGGATTATTTTTTTCACCTTG
G-172,229	TAGATAATCGAACTGATAGCCCTAAGATAGAA
G-172,261	AGCACTAAAATACCGAACGAACCAACCGTAA
G-172,293	AATTGAGGCAGAGGTGAGGCGGTCTTATTAC
G-172,325	TCTGGTCAGCAACAGTGCCACGCTCTACATTT
G-172,357	CTGAACCTTGAAAAATCTAAAGCATTTTTTCATTGCAA
G-192,229	CCCTTCTGCCACCGAGTAAAAGAGTCTGTCC
G-192,261	TAAAAGGGAATTAACCGTTGTAGCAATACTTC
G-192,293	ATTGGCAGGTAATAACATCACTGCCTGAGTA
G-192,325	TGACGCTCCAAACTATCGGCCTTGCTGGTAAT
G-192,357	CAGGAAAACAATATTACCGCCAGC
G-18,22	TTTCTGTACTTTCCAGACGTTAGT
G-18,54	ACAGTTTCATAGTTAGCGTAACGATCTAAAGT
G-18,86	AACTAAAGACAACGCCTGTAGCATTCCACAGA
G-18,118	CGTTGAAACGTAACACTGAGTTTCGTCACCAG

- Anhang -

---

G-18,150	GGAGCCTTAGGGATAGCAAGCCCAATAGGAAC
G-38,22	TGAGGACTGGGTAGCAACGGCTACTTTTTAAATGAAT
G-38,54	CCATTA AAAACCCTCAGCAGCGAAAAACTTTCA
G-38,86	CGAAGGCAAGGGAGTTAAAGGCCGAAAGGAAC
G-38,118	AGAATACACATAACCGATATATTCTTTTTTCA
G-38,150	AGCGATTATGCGCCGACAATGACACTCCAAAA
G-58,22	ACCGGATATCATCAAGAGTAATCTTTTTTAGAGGCTT
G-58,54	AAGCTGCTTGTACAGACCAGGCGCGAAGTTT
G-58,86	GACGAGA ACTGACCAACTTTGAAATGCCACTA
G-58,118	GCTTGAGAAGGCGCAGACGGTCAAGAGGCAAA
G-58,150	TGTGAATTCGCGACCTGCTCCATGTGACCCCC
G-78,22	CAGACGACAACACTATCATAACCCTTTTTGACAAGA
G-78,54	CTTTTGCACGCCAAAAGGAATTACACGTAACA
G-78,86	ATAGTAAAGAATACCACATTCAACCTTGCCCT
G-78,118	TACTGCGGACAGGTAGAAAAGATTCTAAATTGG
G-78,150	CCCCCTCATTAAATAAACGAACTATTAATCAT
G-98,22	TTTTGATATTAGAGAGTACCTTTATTTTTTCGTTTAC
G-98,54	AGAGCTTACCAGACCGGAAGCAAAGCGAGAGG
G-98,86	CAACATGTATATCGCGTTTTAATTAGGGGGTA
G-98,118	TGTCTGGAAAAAGATTAAGAGGAAGCGTCCAA
G-98,150	TTCCCAATTATTATAGTCAGAAGCCATTGAAT
G-118,22	CAAAAACAAGCATAAAGCTAAATCTTTTTATTGCTCC
G-118,54	GGAGAAGCAGAATTAGCAAAATTAGATGGCTT
G-118,86	ATTTTTAGTTAACATCCAATAAATCTGTAGCT
G-118,118	TGCCTGAGAGGTGGCATCAATTCTAAGTACGG
G-118,150	GGGTGAGAAGCTATATTTTCATTTACAGTTGA
G-138,22	CAGGAAGATGATAATCAGAAAAGCTTTTTGGTTGTAC
G-138,54	TAAACGT TAAA ACTAGCATGTCAACTTTTGCG
G-138,86	AATTTTTGAGCAAACAAGAGAATCGGATAAAA
G-138,118	ATAGGAACAAAGGCTATCAGGTCAAAATGCAA
G-138,150	GCCTTCCTCCGGAGAGGGTAGCTAATTCAAAA
G-158,22	ACCAGGCACCGGCACCGCTTCTGGTTTTTCCAAAAA
G-158,54	CGCAACTGGGCCTCAGGAAGATCGTTAAATTG
G-158,86	CTCTTCGCATCTGCCAGTTTGAGGTGCGATTA
G-158,118	GATGTGCTCGTTGGTGTAGATGGGTTTAACCA
G-158,150	CCAGGGTTAAACGCGGATTGACCCGCTCTG
G-178,22	TAATTGCGCCTAATGAGTGAGCTATTTTTGCCGGAA
G-178,54	TCGGGAAAAGCCGGAAGCATAAAGTCAGGCTG
G-178,86	AATCGGCCTGTTATCCGCTCACAAGTGCGGGC
G-178,118	GTATTGGGAATCATGGTCATAGCTGAAAGGGG
G-178,150	CAGTGAGAAGAGGATCCCCGGTAGGGTAACG
G-198,54	CACTACGTGTTGTTCCAGTTTGACTTTCCAG
G-198,86	TTGGGGTCAATCAAAAAGAATAGCCCATTAATG
G-198,118	GAACCCTATGGTGGTTCCGAAAATCCGGTTTGC

- Anhang -

G-198,150	GACGGGGAGGTTTGCCTCCAGCAGGCTTTTCAC
G-202,14	AACGTCAAAGGGCGAAAAAGAACGTGGACTCCTTTTTACTCACAT
<b>B-12,37</b>	<b>TTTGTCGTTGGGATTTTGCTAAACGACAGCAT</b>
B-12,69	CAGCCCTCAGCGGAGTGAGAATAGCTTTTGCG
<b>B-12,101</b>	<b>TACAAACTGAATTGCGAATAATAAGGTCGCTG</b>
B-12,133	CCATGTACATCTCCAAAAAAGGACAACCAT
<b>B-12,165</b>	<b>TCATTTTCTAATTGTATCGGTTTAGCTTGATA</b>
B-32,37	CGGAACGAAAAGACTTTTTTCATGAATAGGCTG
B-32,69	GGATCGTCCGGTAAAATACGTAAGAGGACAG
B-32,101	AGGCTTGCCCAACCTAAAACGAAATCATAAGG
B-32,133	CGCCACGCTAAAACACTCATCTTTTACTTAG
B-32,165	CCGATAGTTACCAAGCGCGAAACAAAATTGTG
<b>B-52,37</b>	<b>GCTGACCTTTCATTACCCAAATCAGAGGCATA</b>
B-52,69	ATGAACGGCATTTCAGTGAATAAGGTAATGCAG
<b>B-52,101</b>	<b>GAACCGAAAACACCAGAACGAGTAGATCAGTTG</b>
B-52,133	CCGGAACGTGGTTAATTTCAACTACGGAACA
<b>B-52,165</b>	<b>TCGAAATCACCTTATGCGATTTTAGGAAGAAA</b>
B-72,37	GTAAGAGCGATAAAAAACCAAATACTCCAACA
B-72,69	ATACATAAAAAGAAGTTTGGCCAGCGAGCTTC
B-72,101	AGATTTAGATGTTTAGACTGGATAGCCCGAAA
B-72,133	ACATTATTAATCGTCATAAATATTAAGCGGA
B-72,165	AATCTACGAATGCTTTAAACAGTTAGGTCITT
<b>B-92,37</b>	<b>GGTCAGGAAGAGGTCATTTTTGCGAGCAATAA</b>
B-92,69	AAAGCGAAATTGCTGAATATAATGCATACAGG
<b>B-92,101</b>	<b>GACTTCAATTTAAATATGCAACTAACTAATAG</b>
B-92,133	TTGCATCAAGTTTCATTCCATATAGGGGCGCG
<b>B-92,165</b>	<b>ACCCTGACTCTGCGAACGAGTAGAGGTCAATA</b>
B-112,37	AGCCTCAGTTATGACCCTGTAATATCATATGT
B-112,69	CAAGGCAACTTTATTTCACGCAAGATGAACG
B-112,101	TAGTAGCAAACCCTCATATATTTTTGCCTGA
B-112,133	AGCTGAAATAATGTGTAGGTAAAGTTTTTGAG
B-112,165	ACCTGTTAAGGCCGAGACAGTCAGCTGATA
<b>B-132,37</b>	<b>ACCCCGGTTTGTATAAGCAAATATCACTCCAG</b>
B-132,69	GTAATCGTAATATTTTGTAAAATGGACGACG
<b>B-132,101</b>	<b>GAGTCTGGTTAAATCAGCTCATTTCCGATCGT</b>
B-132,133	AGATCTACCCATCAAAAATAATTGTAATGGG
<b>B-132,165</b>	<b>AATTAATGGTAGCCAGCTTTCATCGATTCTCC</b>
B-152,37	CCAGCTTTAAGCGCCATTCGCCATTGTAAAGC
B-152,69	ACAGTATCTGGGAAGGGCGATCGTTCACAC
B-152,101	AACCGTGCTATTACGCCAGCTGGCGTTTCCTG
B-152,133	ATAGGTCAGCAAGGCGATTAAGTTCCGAGCTC
B-152,165	GTGGGAACCTCCAGTCACGACGTCCTGCAGG
<b>B-172,37</b>	<b>CTGGGGTGTTCGCTCACTGCCCGACAAGAGT</b>
B-172,69	AACATACGCCTGTCGTGCCAGCTGCGAGATAG

B-172,101	TGTGAAATAACGCGCGGGGAGAGGGGCAAAT
B-172,133	GAATTCGTCGCCAGGGTGGTTTTTCGAAAATC
B-172,165	TCGACTCTCGGGCAACAGCTGATTGCAAGCGG
B-192,37	CCACTATTAACCGTCTATCAGGGCGATGGCC
B-192,69	GGTTGAGTGAACCATCACCCAAATCAAGTTTT
B-192,101	CCCTTATAGAGGTGCCGTAAAGCACTAAATCG
B-192,133	CTGTTTCAAAGGGAGCCCCGATTAGAGCTT
B-192,165	TCCACGCTAAGCCGGCGAACGTGGCGAGAAAG

**Tabelle 41:** Helferstränge zur Assemblierung des mit Fängeroligonukleotiden beschichteten Origamis **Ori<sub>Mod</sub>**.

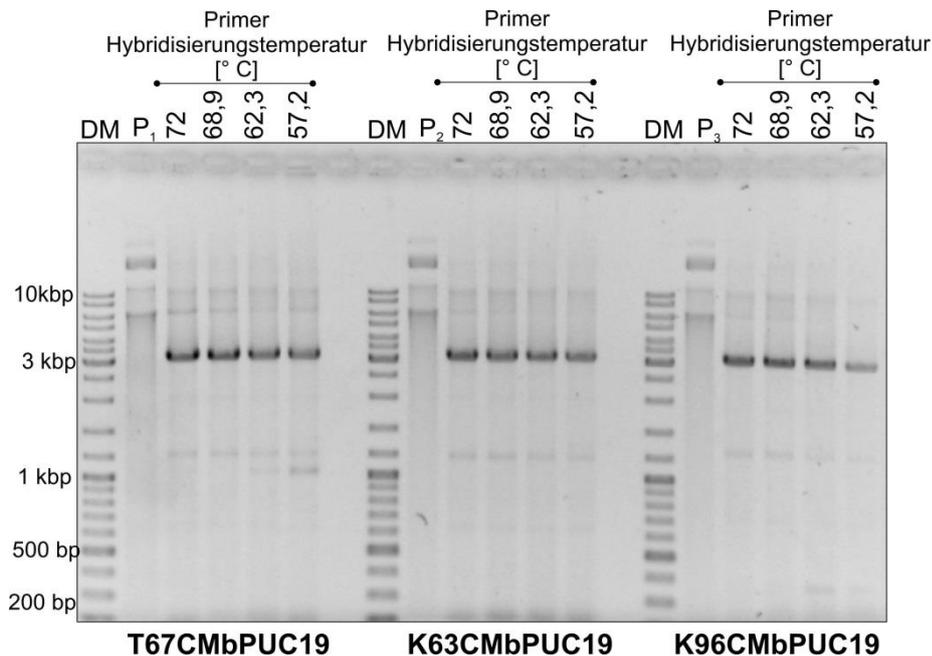
Bezeichnung	Sequenz (5'-3')
m 172.37_cD3_3'	CTGGGGTGTGCGCTCACTGCCCGACAAGAGTCTTCACGATTGCCACTTTCCAC
m 132.37_cD3_3'	ACCCCGGTTTGATAAGCAAATATCACTCCAGCTTCACGATTGCCACTTTCCAC
m 92.37_cD3_3'	GGTCAGGAAGAGGTCATTTTTGCGAGCAATAACTTCACGATTGCCACTTTCCAC
m 52.37_cD3_3'	GCTGACCTTTCATTACCCAAATCAGAGGCATACTTCACGATTGCCACTTTCCAC
m 12.37_cD3_3'	TTTGTCGTTGGGATTTTGCTAAACGACAGCATCTTCACGATTGCCACTTTCCAC
m 172.101_cD2_3'	TGTGAAATAACGCGCGGGGAGAGGGGCAAATCGTGTAGCCTTTGTATTTCGTC
m 132.101_cD2_3'	GAGTCTGGTTAAATCAGCTCATTTTCGCATCGTCGTAGCCTTTGTATTTCGTC
m 92.101_cD2_3'	GACTTCAATTTAAATATGCAACTAACTAATAGCGTGTAGCCTTTGTATTTCGTC
m 52.101_cD2_3'	GAACCGAAACACCAGAACGAGTAGATCAGTTGCGTGTAGCCTTTGTATTTCGTC
m 12.101_cD2_3'	TACAACTGAATTGCGAATAATAAGGTCGCTGCGTGTAGCCTTTGTATTTCGTC
m 172.165_cD3_3'	TCGACTCTCGGGCAACAGCTGATTGCAAGCGGCTTCACGATTGCCACTTTCCAC
m 132.165_cD3_3'	AATTAATGGTAGCCAGCTTTCATCGATTCTCCCTTCACGATTGCCACTTTCCAC
m 92.165_cD3_3'	ACCCTGACTCTGCGAACGAGTAGAGGTCAATACTTCACGATTGCCACTTTCCAC
m 52.165_cD3_3'	TCGAAATCACCTTATGCGATTTTAGGAAGAACTTCACGATTGCCACTTTCCAC
m 12.165_cD3_3'	TCATTTTCTAATTGTATCGGTTTAGCTTGATACTTCACGATTGCCACTTTCCAC
m 172.229_cD2_3'	TAGATAATCGAACTGATAGCCCTAAGATAGAACGTGTAGCCTTTGTATTTCGTC
m 132.229_cD2_3'	TTGGGTAAATTACCTGAGCAAAATCGGGAGACGTGTAGCCTTTGTATTTCGTC
m 92.229_cD2_3'	AATCAAGAACAATAGATAAGTCTCGACAAAACGTGTAGCCTTTGTATTTCGTC
m 52.229_cD2_3'	GAATTAGAATAACGGAATACCCAATATCTTACCGTGTAGCCTTTGTATTTCGTC
m 12.229_cD2_3'	AGGTTTAGCGTTCAGTAAGCGTCGTCAGACGCGTGTAGCCTTTGTATTTCGTC
m 172.293_cD3_3'	AATTGAGGCAGAGGTGAGGCGGTCTTATTTACCTTCACGATTGCCACTTTCCAC
m 132.293_cD3_3'	AGTCAATAAATTTTCATTGAATTAAGAAATCTTCACGATTGCCACTTTCCAC
m 92.293_cD3_3'	GGTATTCTAATCAATAATCGGCTGACAACGCCCTTCACGATTGCCACTTTCCAC
m 52.293_cD3_3'	TAAATATTGTAGAAAATACATACAGATAACCCCTTCACGATTGCCACTTTCCAC
m 12.293_cD3_3'	GATAAGTGGGGTTCAGTGCCTTGACCTCAGAGCTTCACGATTGCCACTTTCCAC
m 172.357_cD2_3'	CTGAACCTGAAAAATCTAAAGCATTTCATTGCAACGTGTAGCCTTTGTATTTCGTC
m 132.357_cD2_3'	TTAATTAACCTTGCTTCTGTAAATTTTTACTTCTGACGTGTAGCCTTTGTATTTCGTC
m 92.357_cD2_3'	ATTTTCATATCGAGAACAAGCAAGTTTTTCAAATTCCTGCTGTAGCCTTTGTATTTCGTC
m 52.357_cD2_3'	ATTCATATTTATTTGTCAATCTTTTTGACGGGAGCGTGTAGCCTTTGTATTTCGTC
m 8.365_cD2_3'	TGAAAGTATTAAGAGGCTATTATTCTGAAACATTTTTCCACCACCCGTGTAGCCTTTGTATTTCGTC

## 11.4 Klonierung von rekombinanten Myoglobin

### 11.4.1 Daten und Analysen der mMbpUC19 PCR Produkte

**Tabelle 42:** Verwendete Primerpaare zur Amplifizierung der PCR Produkte **T67CMbpUC19**, **K63CMbpUC19**, **K96CMbpUC19** und **D60CMbpUC19** und die erwarteten Längen der PCR Produkte. Die Tripletts Kodierungen für die Aminosäure Cystein sind gelb hervorgehoben und die dichgedruckten Bereiche spiegeln die komplementären Primersequenzen wider.

Primer	Sequenz (5'-3')	Länge der PCR Produkte
BW-T67C	CAGTTAACAC <b>GCA</b> AACACCATGTTTTTCAGATCTTCAGAA	3178
FW-T67C	ACATGGTGTT <b>TGCC</b> GTGTTAACTGCCCTAGG	
BW-K63C	TAACACCATG <b>GCA</b> TTTCAGATCTTCAGAAGCTTTCATTCAGC	3178
FW-K63C	AGATCTGAAA <b>TGCC</b> CATGGTGTACCGTGTTAACTGCC	
BW-K96C	GGATCTTATG <b>GCA</b> AGTAGCATGCGATTGCGCAAG	3177
FW-K96C	GCATGCTACT <b>TGCC</b> CATAAGATCCCGATCAAATACCTGG	
BW-D60C	CGGTAACACCATGTTTTTTTCAG <b>ACA</b> TTTCAGAAGCTTTCAT	3177
FW-D60C	CTGAAAAAACATGGTGTACCGTGTTAACTGCCCTA	

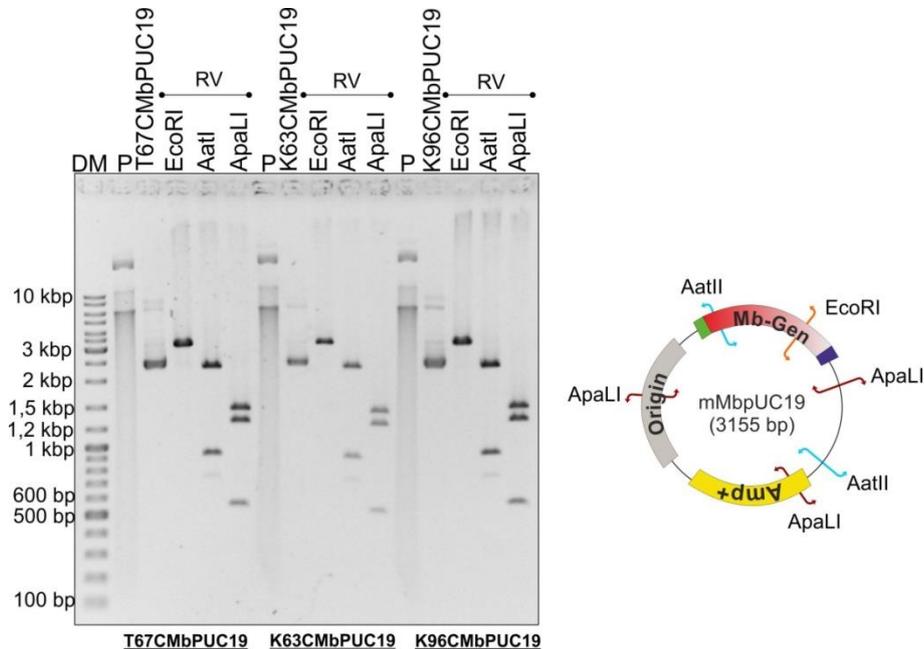


**Abbildung 120:** Ergebnis der analytischen Agarose-Gelelektrophorese zur Charakterisierung der linearen und ca. 3170 bp langen PCR-Produkte **T67CMbpUC19**, **K63CMbpUC19** und **K96CMbpUC19**, welche mittels der Primerpaare aus Tabelle 42 bei unterschiedlichen Primerhybridisierungstemperaturen amplifiziert wurden. **DM:** 10 kbp Marker, **P<sub>1</sub>-P<sub>3</sub>:** Plasmid **MbpUC19**; **Konditionen:** 1 % Agarose, 200 V; **Laufpuffer:** 1x TBE-Puffer; **Färbung:** Ethidiumbromid.

### 11.4.2 Restriktionsverdau der isolierten mMbpUC19 Expressionsvektoren

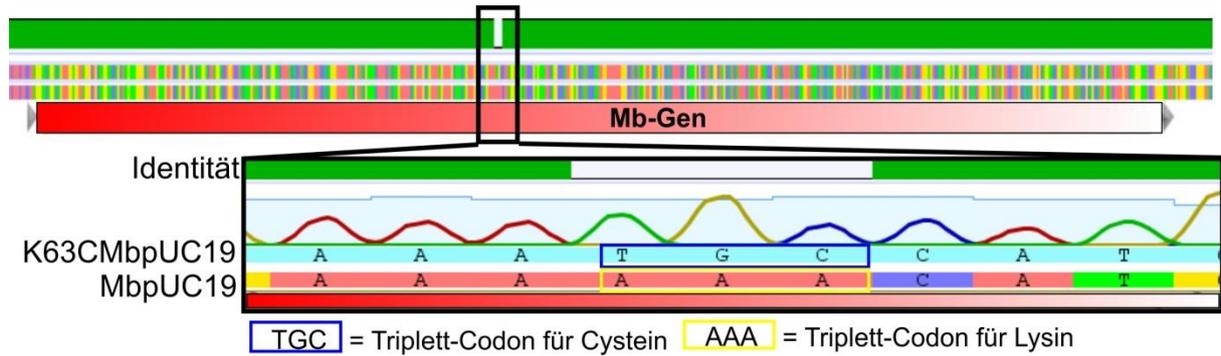
**Tabelle 43:** Verwendete Restriktionsenzyme zum Verdau der isolierten Expressionsvektoren T67CMbpUC19, K63MbpUC19 und K96CMbpUC19. Angegeben sind die einzelnen Schnittstellenmengen und die erwarteten Fragmentgrößen in Basenpaare (bp).

Expressionsvektor	Restriktionsenzym	Schnittstellen	Erwartete Fragmentgrößen [bp]	Detektion
T67CMbpUC19	EcoRI	1	3155	✓
	AatI	2	2268 / 887	✓
	ApaLI	3	1412 / 1246 / 497	✓
K63CMbpUC19	EcoRI	1	3155	✓
	AatI	2	2268 / 887	✓
	ApaLI	3	1412 / 1246 / 497	✓
K96CMbpUC19	EcoRI	1	3155	✓
	AatI	2	2268 / 887	✓
	ApaLI	3	1412 / 1246 / 497	✓

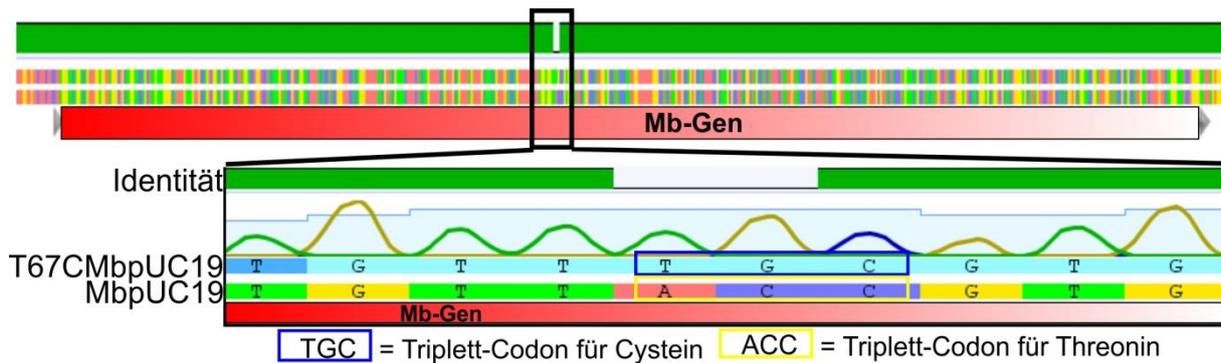


**Abbildung 121:** Analytisches Agarosegel der verdauten T67CMbpUC19, K63CMbpUC19 und K96CMbpUC19 Expressionsvektoren mittels der Restriktionsenzyme EcoRV, AatI und ApaLI. **DM:** 10 kbp DNA Marker; **P:** Isoliertes MbUC19 Plasmid; **RV:** Restriktionsverdau nach Inkubation mit EcoR, AatI und ApaLI; **Konditionen:** 1 % Agarose, 200 V; **Laufpuffer:** 1x TBE-Puffer; **Färbung:** Ethidiumbromid.

### 11.4.3 Sequenzierungsdaten der mMbpUC19 Expressionsvektoren



**Abbildung 122:** (A) Vergleich der Sequenzierungsdaten des isolierten K63CMbpUC19 Vektors mit der Sequenz des Mb-Gen-Templats unter Verwendung des Computerprogramms *Genious*. Eine hundertprozentige Übereinstimmung der Sequenzen ist mit einem grünen Balkenidentitätsdiagramm dargestellt, während eine Lücke innerhalb der Identität eine vorhandene Mutation widerspiegelt (schwarze Markierung). (B) Nähere Betrachtung der sequenzierten Mutationen innerhalb des Mb-Gens. Das eingefügte Triplet-Codon für den Cysteinrest ist blau markiert worden, während der ursprüngliche Triplet-Code für Lysin gelb gekennzeichnet wurde.

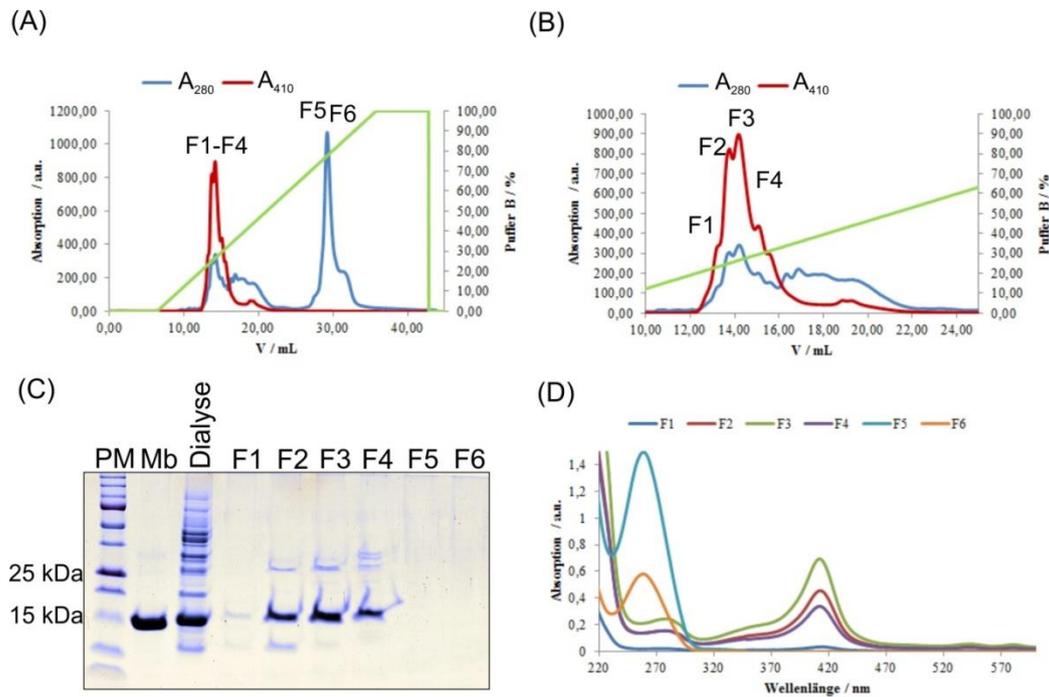


**Abbildung 123:** (A) Vergleich der Sequenzierungsdaten des isolierten T67CMbpUC19 Vektors mit der Sequenz des Mb-Gen-Templats unter Verwendung des Computerprogramms *Genious*. Eine hundertprozentige Übereinstimmung der Sequenzen ist mit einem grünen Balkenidentitätsdiagramm dargestellt, während eine Lücke innerhalb der Identität eine vorhandene Mutation widerspiegelt (schwarze Markierung). (B) Nähere Betrachtung der sequenzierten Mutationen innerhalb des Mb-Gens. Das eingefügte Triplet-Codon für den Cysteinrest ist blau markiert worden, während der ursprüngliche Triplet-Code für Threonin gelb gekennzeichnet wurde.



### 11.4.4 Reinigung der rekombinanten mMb Proteine

#### K63CMb

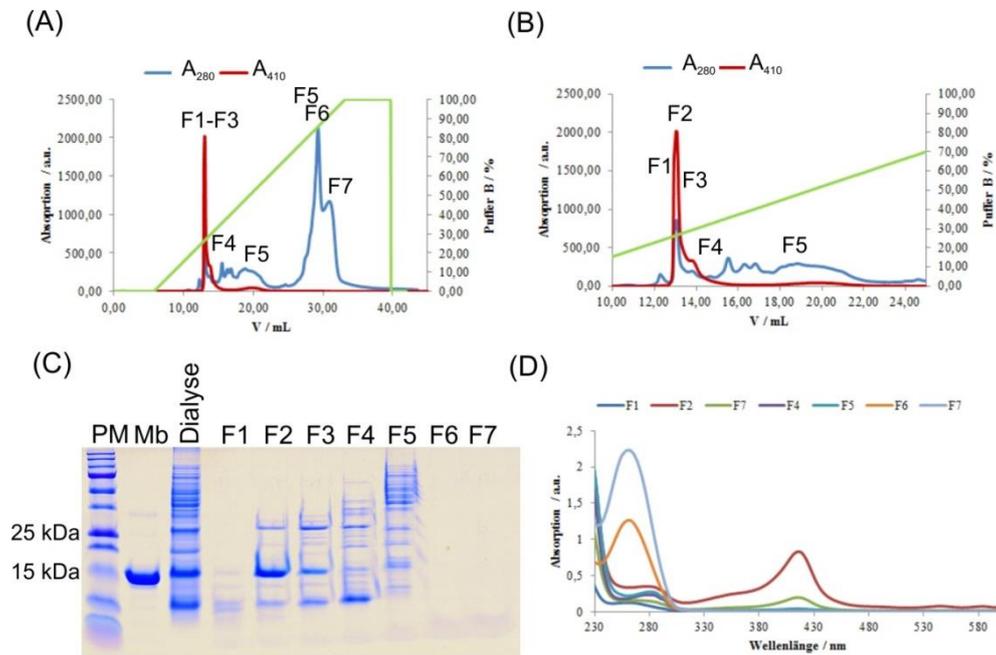


**Abbildung 125:** (A) Anionenaustauschchromatographie zur Reinigung des **K63CMb** Proteins mittels einer Mono Q 5/50 Säule. Die Salzkonzentration wurde innerhalb von 30 min von 0 M auf 1 M graduell erhöht (grüne Linie). Detektiert wurden die Absorptionen bei 280 nm (blauer Verlauf) und 410 nm (roter Verlauf). **Puffer A:** 20 mM Ethanolamin; **Puffer B:** 20 mM Ethanolamin, 1M NaCl. (B) Gesammelte Fraktionen zwischen einem Elutionsvolumen von 10 mL und 25 mL. (C) SDS-PAGE Charakterisierung der Fraktionen F1 bis F6. Als Vergleichsproben wurden das native Myoglobin (**Mb**) und das Lysat nach der Dialyse (**Dialyse**) aufgetragen. **Konditionen:** 12 %iges SDS-PA-Gel; **Spannung:** 120 V; **Laufpuffer:** 1x SDS Laufpuffer; **Färbung:** Coomassie-Blau. **PM:** Proteinmarker. (D) UV-Vis spektrometrische Analyse der Fraktionen F1-F6.

**Tabelle 44:** Ermittelte Absorption der isolierten **K63CMb** FPLC Fraktionen F1-F6 bei 410 nm bzw. 280 nm und die daraus berechneten  $A_{410}/A_{280}$  Verhältnisse. Für die Reinheitsberechnung wurde ein Vergleich der Verhältnisse mit kommerziell erwerblichem Myoglobin durchgeführt.

Fraktion	$A_{410}$	$A_{280}$	$A_{410}/A_{280}$	Reinheit [%]
F1	0,03	0,02	1,6	40
F2	0,45	0,15	2,9	72
F3	0,68	0,24	2,8	70
F4	0,33	0,15	2,2	55
F5	0,01	0,77	$5,2 \cdot 10^{-3}$	/
F6	0,01	0,28	$3,6 \cdot 10^{-3}$	/
Kommerziell natives Mb	0,88	0,22	4,0	

D60CMb

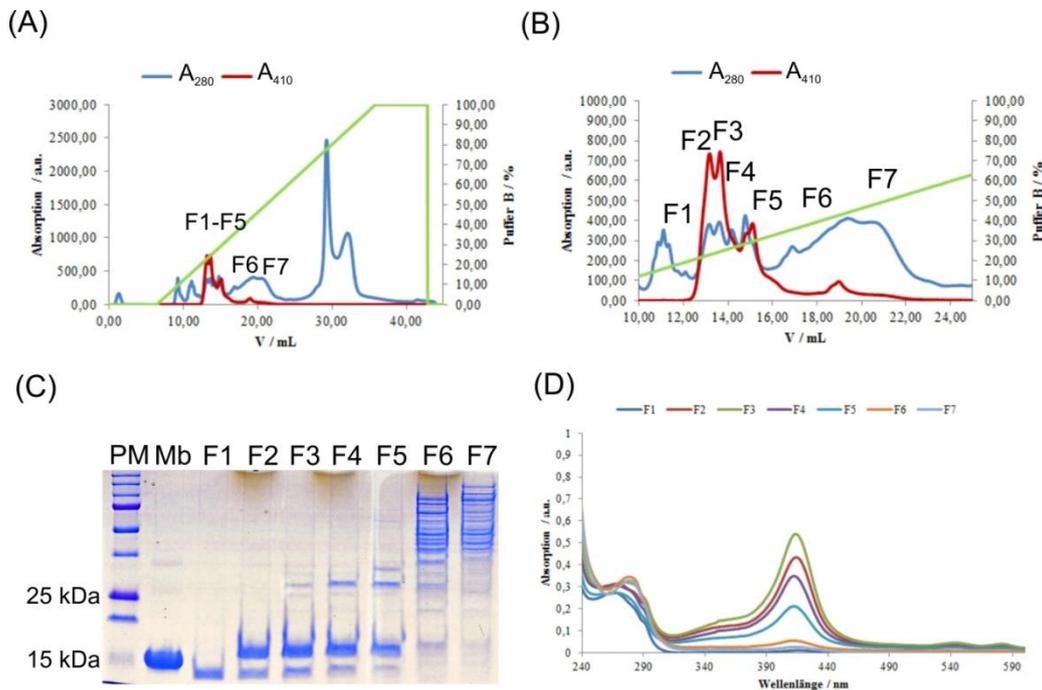


**Abbildung 126:** (A) Anionenaustauschchromatographie zur Reinigung des **D60CMb** Proteins mittels einer Mono Q 5/50 Säule. Die Salzkonzentration wurde innerhalb von 30 min von 0 M auf 1 M graduell erhöht (grüne Linie). Detektiert wurden die Absorptionen bei 280 nm (blauer Verlauf) und 410 nm (roter Verlauf). **Puffer A:** 20 mM Ethanolamin; **Puffer B:** 20 mM Ethanolamin, 1M NaCl. (B) Gesammelte Fraktionen zwischen einem Elutionsvolumen von 10 mL und 25 mL. (C) SDS-PAGE Charakterisierung der Fraktionen F1 bis F7. Als Vergleichsproben wurden das native Myoglobin (**Mb**) und das Lysat nach der Dialyse (**Dialyse**) aufgetragen. **Konditionen:** 12 %iges SDS-PA-Gel; **Spannung:** 120 V; **Laufpuffer:** 1x SDS Laufpuffer; **Färbung:** Coomassie-Blau. **PM:** Proteinmarker. (D) UV-Vis spektrometrische Analyse der Fraktionen F1-F7.

**Tabelle 45:** Ermittelte Absorption der isolierten **D60CMb** FPLC Fraktionen F1-F7 bei 410 nm bzw. 280 nm und die daraus berechneten  $A_{410}/A_{280}$  Verhältnisse. Für die Reinheitsberechnung wurde ein Vergleich der Verhältnisse mit kommerziell erwerblichem Myoglobin durchgeführt.

Fraktion	$A_{410}$	$A_{280}$	$A_{410}/A_{280}$	Reinheit [%]
F1	0,02	0,08	0,2	5
F2	0,77	0,35	2,2	55
F3	0,18	0,15	1,2	30
F4	0,03	0,23	0,2	5
F5	0,04	0,26	0,1	2,5
F6	0,01	0,74	$0,1 \cdot 10^{-1}$	/
F7	0,001	1,38	$7,2 \cdot 10^{-4}$	/
Kommerziell natives Mb	0,88	0,22	4,0	

T67CMb

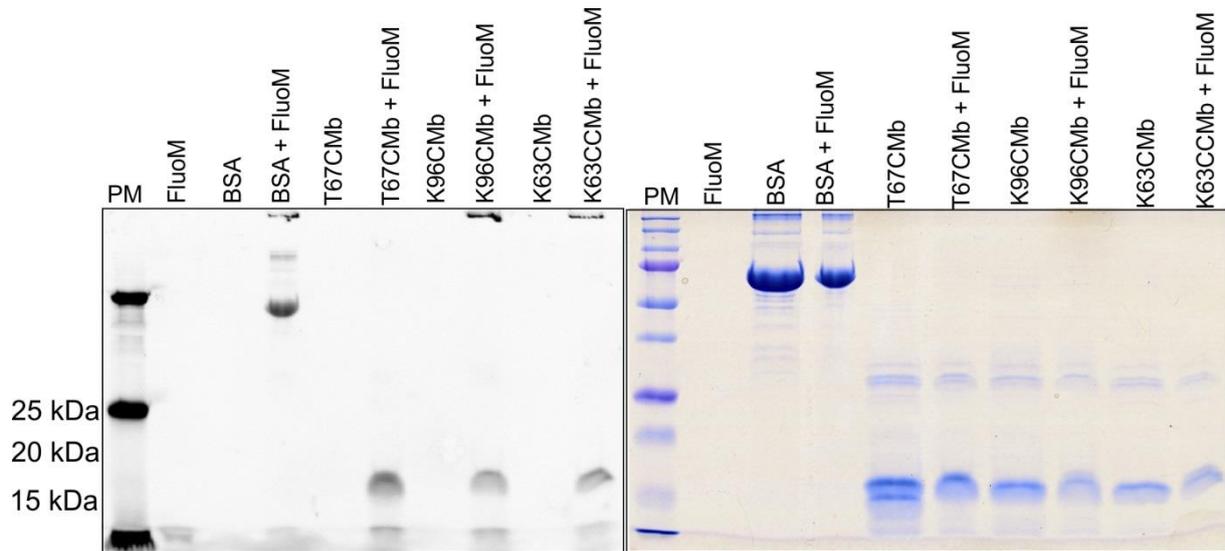


**Abbildung 127:** (A) Anionenaustauschchromatographie zur Reinigung des **T67CMb** Proteins mittels einer Mono Q 5/50 Säule. Die Salzkonzentration wurde innerhalb von 30 min von 0 M auf 1 M graduell erhöht (grüne Linie). Detektiert wurden die Absorptionen bei 280 nm (blauer Verlauf) und 410 nm (roter Verlauf). **Puffer A:** 20 mM Ethanolamin; **Puffer B:** 20 mM Ethanolamin, 1M NaCl. (B) Gesammelte Fraktionen zwischen einem Elutionsvolumen von 10 mL und 25 mL. (C) SDS-PAGE Charakterisierung der Fraktionen F1 bis F7. Als Vergleichsproben wurden das native Myoglobin (**Mb**) aufgetragen. **Konditionen:** 12 %iges SDS-PA-Gel; **Spannung:** 120 V; **Laufpuffer:** 1x SDS Laufpuffer; **Färbung:** Coomassie-Blau. **PM:** Proteinmarker. (D) UV-Vis spektrometrische Analyse der Fraktionen F1-F7.

**Tabelle 46:** Ermittelte Absorption der isolierten **T67CMb** FPLC Fraktionen F1-F7 bei 410 nm bzw. 280 nm und die daraus berechneten  $A_{410}/A_{280}$  Verhältnisse. Für die Reinheitsberechnung wurde ein Vergleich der Verhältnisse mit kommerziell erwerblichem Myoglobin durchgeführt.

Fraktion	$A_{410}$	$A_{280}$	$A_{410}/A_{280}$	Reinheit [%]
F1	0,01	0,23	$0,4 \cdot 10^{-1}$	/
F2	0,42	0,28	1,5	37
F3	0,53	0,32	1,7	42
F4	0,34	0,28	1,2	30
F5	0,21	0,24	0,9	22
F6	0,05	0,34	0,2	5
F7	0,03	0,33	0,1	2,5
Kommerziell natives Mb	0,88	0,22	4,0	

### 11.4.5 Fluorophormodifizierung der rekombinanten mMb Proteine

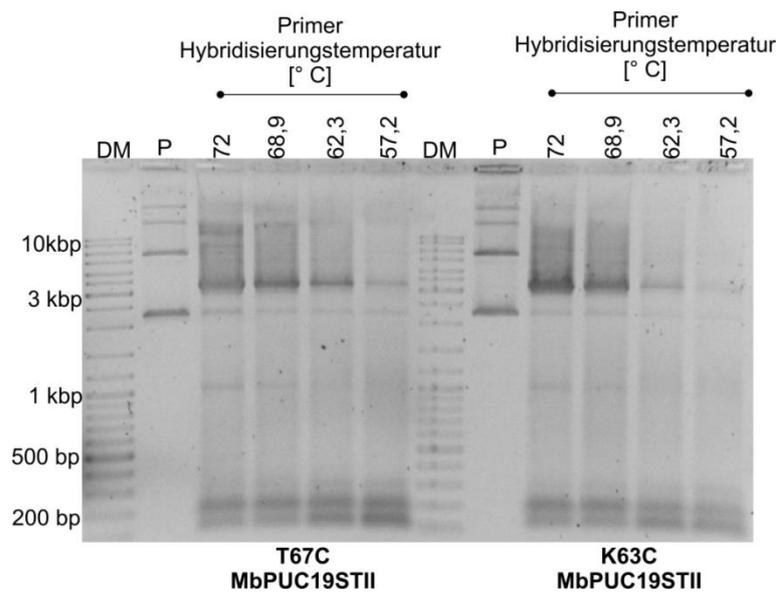


**Abbildung 128:** SDS-PAGE Charakterisierung der Kupplung des Fluorophors Fluoresceinmaleimid (**FluoM**) auf die Oberfläche des Rinderserumalbumins (**BSA**) als Positivkontrolle und der Mutanten **T67C**, **K96C** und **K63C**. **PM**: Protein Marker. Das Gel wurde zunächst unter UV Bestrahlung und anschließend mittels Coomassie Färbung visualisiert.

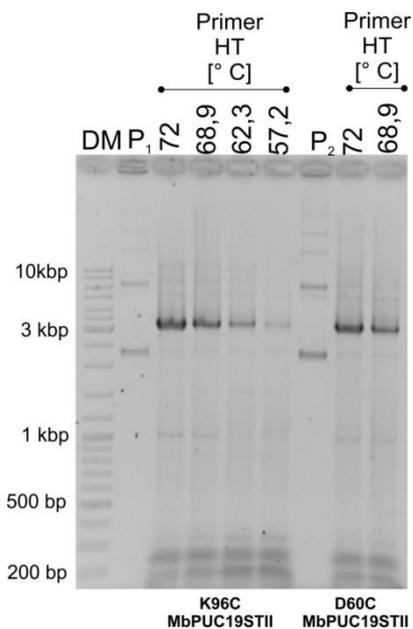
### 11.4.6 Daten und Analysen der mMbpUC19STII PCR Produkte

**Tabelle 47:** Verwendete Primer zur Herstellung der mMbpUC19STII PCR Produkte.

Primer	Sequenz (5'-3')	Länge der PCR Produkte
BW-STII	<u>TTTTCAA</u> ACTGCGGATGGCTCCA <u>CAT</u> TGTTGTTGTTCTCCTT <u>AGTTAGTTATCTGCAGA</u>	3203
FW-STII	<u>TGGAGCCATCCGCAGTTTGAAAAA</u> GTTCTGTCTGAAGGTGAATGGCAGC	

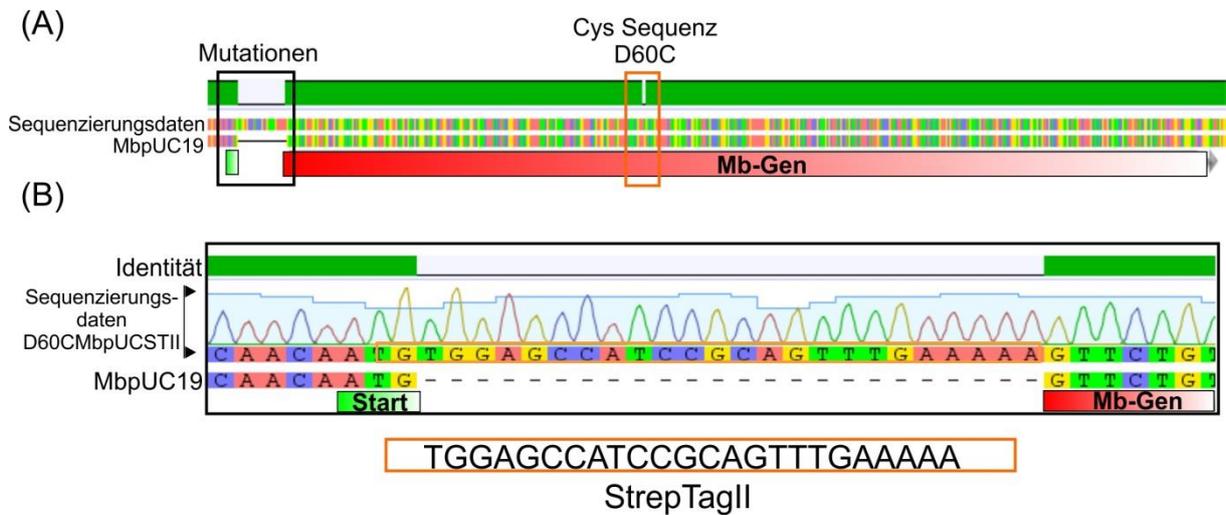


**Abbildung 129:** Ergebnis der analytischen Agarosegelelektrophorese zur Charakterisierung der linearen und 3203 bp langen PCR-Produkte **T67CMbPUC19STII** und **K63CMbPUC19STII**, welche mittels der Primerpaare **FW-STII** und **BW-STII** bei unterschiedlichen Primerhybridisierungstemperaturen amplifiziert wurden. **DM:** 10 kbp Marker, **P:** Plasmid **MbPUC19**; **Konditionen:** 1 % Agarose, 200 V; **Laufpuffer:** 1x TBE-Puffer; **Färbung:** Ethidiumbromid.

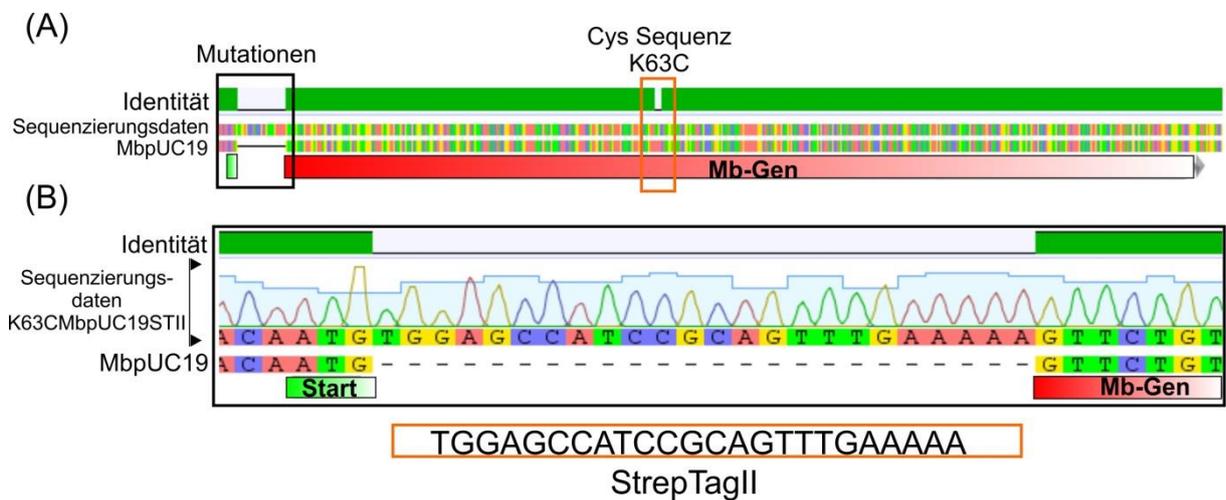


**Abbildung 130:** Ergebnis der analytischen Agarosegelelektrophorese zur Charakterisierung der linearen und 3203 bp langen PCR-Produkte **K96CMbPUC19STII** und **D60CMbPUC19STII**, welche mittels der Primerpaare **FW-STII** und **BW-STII** bei unterschiedlichen Primerhybridisierungstemperaturen amplifiziert wurden. **DM:** 10 kbp Marker, **P:** Plasmid **MbPUC19**; **Konditionen:** 1 % Agarose, 200 V; **Laufpuffer:** 1x TBE-Puffer; **Färbung:** Ethidiumbromid.

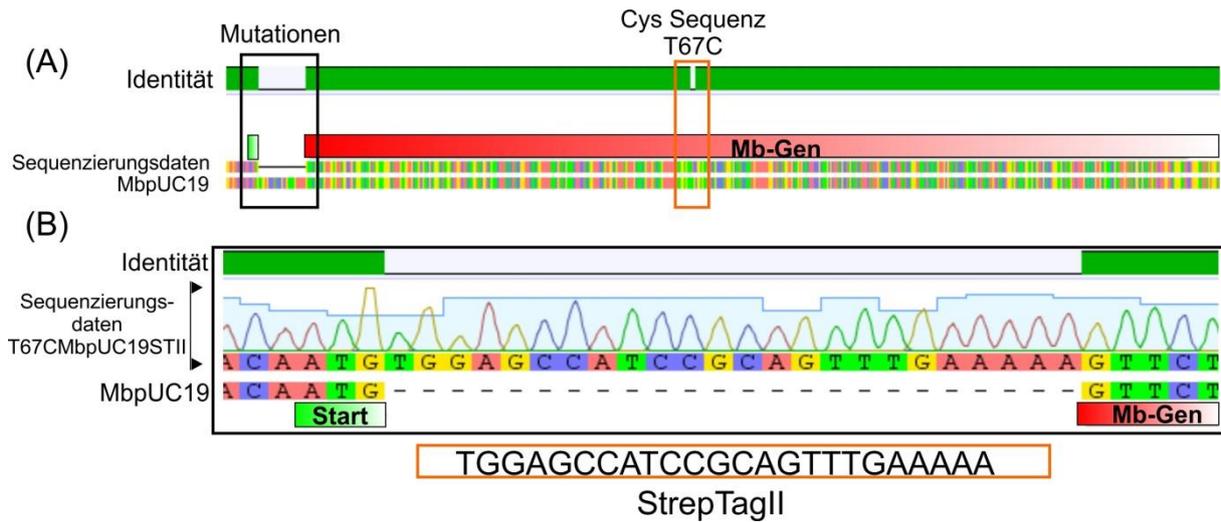
### 11.4.7 Sequenzierungsdaten der mMbpUC19STII Expressionsvektoren



**Abbildung 131:** (A) Vergleich der Sequenzierungsdaten des isolierten **D60CMbpUC19STII** Vektors mit den Daten des **MbUC19** Templats unter Verwendung des Computerprogramms *Genious*. Die orange markierte Mutationsposition stellt das erfolgreich eingeführte Cystein Triplet Codon dar. Eine hundertprozentige Übereinstimmung der Sequenzen ist mit einem grünen Balkenidentitätsdiagramm dargestellt, während eine Lücke innerhalb der Identität eine vorhandene Mutation widerspiegelt (schwarze Markierung). (B) Nähere Betrachtung der sequenzierten Mutationen (schwarze Markierung von Abbildung A). Direkt nach dem Start-Codon ATG kann die Gensequenz eines **STII Tags** erkannt werden.



**Abbildung 132:** (A) Vergleich der Sequenzierungsdaten des isolierten **K63CMbpUC19STII** Vektors mit den Daten des **MbUC19** Templats unter Verwendung des Computerprogramms *Genious*. Die orange markierte Mutationsposition stellt das erfolgreich eingeführte Cystein Triplet Codon dar. Eine hundertprozentige Übereinstimmung der Sequenzen ist mit einem grünen Balkenidentitätsdiagramm dargestellt, während eine Lücke innerhalb der Identität eine vorhandene Mutation widerspiegelt (schwarze Markierung). (B) Nähere Betrachtung der sequenzierten Mutationen (schwarze Markierung von Abbildung A). Direkt nach dem Start-Codon ATG kann die Gensequenz eines **STII Tags** erkannt werden.



**Abbildung 133:** (A) Vergleich der Sequenzierungsdaten des isolierten **T67CMbpUC19STII** Vektors mit den Daten des **MbpUC19** Templates unter Verwendung des Computerprogramms *Genious*. Die orange markierte Mutationsposition stellt das erfolgreich eingeführte Cystein Triplet Codon dar. Eine hundertprozentige Übereinstimmung der Sequenzen ist mit einem grünen Balkenidentitätsdiagramm dargestellt, während eine Lücke innerhalb der Identität eine vorhandene Mutation widerspiegelt (schwarze Markierung). (B) Nähere Betrachtung der sequenzierten Mutationen (schwarze Markierung von Abbildung A). Direkt nach dem Start-Codon ATG kann die Gensequenz eines **STII Tags** erkannt werden.