

**Entwicklung eines lichtschtbaren  
Restriktionsenzym**

-

**Kontrolle der enzymatischen Aktivität mit Licht**

**Inauguraldissertation**

Zur Erlangung des Grades

DOKTOR DER NATURWISSENSCHAFTEN

- Dr. rer. nat. -

Des Fachbereichs Biologie und Chemie  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

**Dipl. Biochem. Benno Schierling**

*Gießen, 2009*

*Meinen Eltern in Dankbarkeit gewidmet*

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen des Graduiertenkollegs „Enzymes and Multienzyme Complexes Acting on Nucleic Acids“ (GRK 1384) am Institut für Biochemie des Fachbereichs 08 (Biologie und Chemie) der Justus-Liebig-Universität Gießen in der Zeit von November 2006 bis Oktober 2009 unter der Leitung von Prof. Dr. Alfred Pingoud durchgeführt.

Erstgutachter: Prof. Dr. Alfred Pingoud  
Institut für Biochemie, FB08  
Justus-Liebig-Universität Gießen  
Heinrich-Buff-Ring 58, 35392 Gießen

Zweitgutachter: Prof. Dr. Roland Hartmann  
Institut für Pharmazeutische Chemie, FB16  
Philipps-Universität Marburg  
Marbacher Weg 6-10, 35037 Marburg

## **Erklärung**

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Benno Schierling

Gießen, den 13.10.09

## Danksagung

- An erster Stelle bedanke ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Alfred Pingoud für die direkte Betreuung, das immense Interesse an meiner Doktorarbeit, die stetige wissenschaftliche Unterstützung und das entgegengebrachte Vertrauen.
- Bei meinem *Co-Supervisor* Prof. Dr. Roland Hartmann bedanke ich mich sehr für die hilfreichen Diskussionen und die wissenschaftliche Unterstützung innerhalb des Graduiertenkollegs GRK1384 und die Übernahme des Zweitgutachtens.
- Bei Prof. Virginijus Siksnys bedanke ich mich für die Unterstützung als internationaler Mentor im Rahmen des Graduiertenkollegs GRK1384.
- Dr. Wolfgang Wende danke ich sehr für die Betreuung, die stetige Hilfe und wissenschaftliche Unterstützung und die zahlreichen hilfreichen Diskussionen und Anregungen für meine Doktorarbeit.
- Ich danke Dr. Ann-Josée Noël ganz besonders für die sehr gute und herzliche Zusammenarbeit (PAZ!), die vielen wertvollen Ratschläge und Diskussionen und die angenehme Arbeitsatmosphäre in unserer Denkwelle.
- Bei Prof. Dr. Peter Friedhoff bedanke ich mich für viele hilfreiche Diskussionen und motivierende wissenschaftliche Tipps.
- Ich danke Dr. Anja Drescher, Karina Urbach und Ina Stingel für die tatkräftige Unterstützung und Hilfe bei jeglichen organisatorischen und bürokratischen Angelegenheiten.
- Chun-Mei Li danke ich für die angenehme Zeit im Labor und die tatkräftige Hilfe bei meinen Experimenten.
- Bei Hien Le Thi bedanke ich mich für die gute Zusammenarbeit, die Hilfe bei meinem Aufenthalt in Moskau und die angenehme Zeit im Labor.
- Ich danke Prof. Tatiana Oretskaya und Prof. Elena Kubareva für die gute wissenschaftliche Kollaboration und die Möglichkeit meines Forschungsaufenthalts in Moskau.
- Ich bedanke mich bei Steffi Reh, Katja Stoll und Ines Fonfara und allen anderen Mitgliedern des Instituts für Biochemie für die angenehme Arbeitsatmosphäre und den Spaß im Labor.
- In danke den Mitgliedern des Graduiertenkollegs GRK1384 für den wissenschaftlichen Austausch und den Spaß bei den zahlreichen Events und Workshops.
- HD Dr. Christoph Forreiter danke ich für die freundliche Bereitstellung und Konstruktion einer Blaulicht-Quelle.
- Dr. Vera Pingoud danke ich für die Hilfe im Umgang mit *steady-state* Kinetiken.
- Ich danke Michael Kokkinidis für die Bereitstellung der strukturellen Information über scPvuII.

## Publikationen

- Le Thi Hien, Schierling B., Ryazanova A. Y., Zatsepin T. S., Volkov E. M., Kubareva E. A., Velichko T. I., Pingoud A. and Oretskaya T. S.; New Azobenzene Derivatives for Directed Modification of Proteins. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*. **35**, 549-55 (2009)
- Schierling B., Noël A. J., Wende W., Le Thi Hien, Volkov E. M., Kubareva E. A., Oretskaya T. S., Kokkinidis M. and Pingoud A.; Controlling the enzymatic activity of a restriction enzyme by light. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (in revision)

## Präsentationen: Poster

- 2007 (April), NACON VII: Recognition Studies in Nucleic Acids, Sheffield: *Design of a photoswitchable restriction enzyme*
- 2007 (September), GBM - Herbsttagung, Hamburg: *Design of a photoswitchable restriction enzyme*
- 2008 (Oktober), 1st GGL Conference on Life Sciences, Gießen: *Design of a photoswitchable restriction enzyme* (Poster award)
- 2008 (November), 2nd Workshop Asia Link "Human Resources Development in the Study of Nucleic Acids", Bremen: *Design of a photoswitchable restriction enzyme*
- 2008 (Dezember), EU-MC Workshop "Single-Molecule", York: *Design of a photoswitchable restriction enzyme*
- 2009 (Juli), 34th FEBS Congress, Prag: *Design of a photoswitchable restriction enzyme*

## Präsentationen: Vorträge

- 2007 (Juni), Workshop International Research Training Group "Enzymes and Multienzyme Complexes Acting on Nucleic Acids", Suzdal: *Development of a "photoswitchable" restriction enzyme*
- 2008 (März), Workshop International Research Training Group "Enzymes and Multienzyme Complexes Acting on Nucleic Acids", Gießen: *Development of a "photoswitchable" restriction enzyme*
- 2008 (Juni), 1st Workshop Asia Link "Human Resources Development in the Study of Nucleic Acids", Chania: *Development of a "photoswitchable" restriction enzyme*
- 2009 (Oktober), 2nd GGL Conference on Life Sciences, Gießen: *Controlling the enzymatic activity of a restriction enzyme by light*

# Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>01</b>
1.1	Regulation biologischer Prozesse mit Licht .....	01
1.2	Azobenzol als photosensitiver Schalter .....	02
1.2.1	Die Photoisomerisierung von Azobenzol .....	02
1.2.2	Regulation von Peptiden und Proteinen mittels Azobenzol.....	03
1.2.3	Kopplung von Azobenzol-Derivaten an Proteine durch chemische Modifikation .....	08
1.3	ScPvuII als Modellenzym zur Generation eines lichtschtbaren Restriktionsenzym ....	08
1.3.1	Das Restriktionsenzym PvuII .....	08
1.3.2	Das Restriktionsenzym scPvuII.....	11
1.3.3	ScPvuII und Lichtsteuerung .....	11
1.3.4	ScPvuII mit Lichtschalter und Gentherapie.....	12
1.4	Strategien zur Entwicklung eines lichtschtbaren Restriktionsenzym.....	14
1.4.1	<i>Photoswitch</i> -Strategie.....	14
1.4.2	<i>Photogate</i> -Strategie .....	15
1.5	Zielsetzung dieser Arbeit.....	16
<b>2.</b>	<b>Materialien und Methoden.....</b>	<b>18</b>
2.1	Materialien.....	18
2.1.1	Enzyme und Marker .....	18
2.1.2	Chemikalien.....	19
2.1.3	Radiochemikalien .....	20
2.1.4	Kits .....	20
2.1.5	Puffer und Medien .....	20
2.1.6	Chromatographie-Säulen.....	22
2.1.7	Primer/Oligonukleotide .....	22
2.1.8	Plasmide .....	23
2.1.9	Stämme.....	24
2.1.10	Lichtquellen.....	24
2.1.11	Azobenzol-Derivate.....	24
2.1.11.1	Bi-funktionelle Azobenzol-Derivate.....	24
2.1.11.2	Mono-funktionelle Azobenzol-Derivate.....	25
2.2	Mikrobiologische Methoden.....	26
2.2.1	Nährmedien zur Kultivierung von <i>E.coli</i> .....	27
2.2.2	DNA-Transformation von <i>E. coli</i> .....	27
2.2.2.1	Herstellung kompetenter Zellen für die Elektrotransformation .....	27
2.2.2.2	Elektrotransformation.....	27

2.3	Molekularbiologische Methoden .....	28
2.3.1	Agarosegelelektrophorese.....	28
2.3.2	Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	28
2.3.3	Plasmid-DNA-Isolierung.....	28
2.3.4	Bestimmung der DNA-Konzentration .....	29
2.3.5	Restriktionsspaltung von DNA.....	29
2.3.6	Ligation von DNA - Fragmenten.....	29
2.3.7	Ethanol-Fällung von DNA.....	30
2.3.8	PCR .....	30
2.3.9	Mutagenese von scPvuII-Varianten.....	31
2.3.9.1	Zielgerichtete Mutagenese im WT PvuII.....	31
2.3.9.2	Klonieren der N-terminalen Hälfte von scPvuII.....	32
2.3.9.3	Klonieren der C-terminalen Hälfte von scPvuII .....	33
2.3.9.4	Klonieren von Linker-Variationen von scPvuII .....	33
2.4	Biochemische Methoden.....	34
2.4.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	34
2.4.1.1	Coomassie - Färbung .....	34
2.4.1.2	Silberfärbung .....	34
2.4.2	Expression und Aufreinigung von Proteinen.....	35
2.4.3	Bestimmung der Protein-Konzentration .....	35
2.4.4	Aktivitätstest von scPvuII.....	36
2.4.5	Chromatographische Trennverfahren .....	36
2.4.6	Modifikation von scPvuII mit Azobenzol-Derivaten.....	37
2.4.6.1	Modifikation mit bi-funktionellen Azobenzol-Derivaten .....	37
2.4.6.2	Modifikation mit mono-funktionellen Azobenzol-Derivaten .....	37
2.4.6.3	Quantifizierung der Modifikationsausbeute .....	38
2.4.7	Aufreinigung von Azobenzol-modifiziertem scPvuII.....	38
2.5	Methoden unter spezifischer Belichtung .....	39
2.5.1	Setup für die spezifische Belichtung .....	39
2.5.2	Aktivitätstests unter spezifischer Beleuchtung .....	40
2.5.2.1	Aktivitätstest unter Vor-Belichtung der modifizierten Probe .....	40
2.5.2.2	Aktivitätstest <i>in situ</i> unter spezifischer Belichtung.....	41
2.5.2.3	<i>Steady-State</i> kinetische Analyse unter spezifischer Belichtung.....	41
2.6	Organisch-Chemische Methoden.....	42
2.6.1	Synthese von Oligonukleotid-modifiziertem mono-funktionellem Azobenzol .....	42
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>43</b>
3.1	<i>Photoswitch</i> -Strategie von scPvuII.....	43
3.1.1	Varianten für die Modifikation mit bi-funktionellen Azobenzol-Derivaten .....	43
3.1.2	Lichtinduzierte Isomerisierung von Azobenzol.....	45

3.1.3	Modifikation und Aufreinigung Azobenzol-modifizierter Varianten .....	46
3.1.3.1	Optimierung der Azobenzol-Modifikation .....	46
3.1.3.2	Optimierung der Aufreinigung Azobenzol-modifizierter Varianten .....	47
3.1.4	Stufenweise Entwicklung eines photosensitiven Restriktionsenzym .....	50
3.1.4.1	Varianten mit einem Azobenzol-Schalter .....	50
3.1.4.2	Varianten mit zwei Azobenzol-Schaltern .....	50
3.1.4.3	Varianten mit vier Azobenzol-Schaltern .....	52
3.1.4.4	Varianten mit zwei Azobenzol-Schaltern und zusätzlichen Mutationen .....	52
3.1.4.5	Varianten mit Azobenzol-Schaltern in der Linker-Region .....	54
3.1.4.6	Vergleich der entsprechenden Azobenzol-Schalter in scPvuII und WT PvuII .....	56
3.1.5	Charakterisierung der lichtschtbaren Varianten von scPvuII .....	57
3.1.5.1	Reversible lichtsteuerbare Kontrolle der Enzymaktivität .....	57
3.1.5.2	Thermische Relaxation der über die Azobenzol-Schalter lichtgesteuerten Enzymaktivität .....	59
3.1.5.3	Mechanistische Analyse des Lichtschalter-Effekts .....	60
3.1.6	Übersicht der <i>Photoswitch</i> -Effekte .....	61
3.2	<i>Photogate</i> -Strategie von PvuII .....	62
3.2.1	Varianten für die Modifikation mit mono-funktionellen Azobenzol-Derivaten .....	62
3.2.2	Modifikation und Aufreinigung Azobenzol-modifizierter Varianten .....	63
3.2.3	Lichtinduzierte Isomerisierung von Protein gebundenem, mono-funktionellen Azobenzol .....	64
3.2.4	Aktivitätstests unter spezifischer Belichtung .....	65
3.2.4.1	„ <i>Cis/trans</i> “-Effekte der modifizierten Varianten .....	65
3.2.4.2	<i>Star</i> -Aktivität der modifizierten Variante sc(C135) <sub>2</sub> (C137) <sub>2</sub> _AzoOH/COOH .....	66
<b>4.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>68</b>
4.1	<i>Photoswitch</i> -Strategie von scPvuII .....	68
4.1.1	Auswahl der Positionen .....	68
4.1.2	Modifikation und Aufreinigung .....	69
4.1.3	Schritte zur Entwicklung eines lichtschtbaren Restriktionsenzym .....	71
4.1.4	Charakterisierung von lichtschtbaren scPvuII - Varianten .....	74
4.2	<i>Photogate</i> -Strategie von scPvuII .....	78
4.2.1	Auswahl der Positionen .....	78
4.2.2	Analyse der Schalt-Effekte .....	79
4.3	Lichtschtbares scPvuII - Fazit und Grenzen .....	82
4.4	Lichtschtbares scPvuII - Anwendung in der Zelle und in der Gentherapie .....	84
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>87</b>
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>89</b>
	<b>Addendum .....</b>	<b>99</b>

## Abkürzungsverzeichnis

% (v/v)	Volumenprozent pro Volumen	k	kilo- ( $10^3$ )
% (w/v)	Gewichtsprozent pro Volumen	KPi	Kaliumphosphat-Puffer
'	Minuten		
°C	Grad Celsius	l	Liter
μ	mikro- ( $10^{-6}$ )	LED	Lichtemittierende Diode
A	Adenin	m	milli- ( $10^{-3}$ )
Å	Angström ( $10^{-10}$ m)	M	Molar
Abb.	Abbildung	Me <sup>2+</sup>	zweiwertiges Metallion
AFM	<i>atomic force</i> - Mikroskopie	MG	Molekulargewicht
ATP	Adenosin-5'-triphosphat	min	Minute
bp	Basenpaare	n	nano- ( $10^{-9}$ )
BSA	<i>bovine serum albumin</i>	N	Newton
bzw.	beziehungsweise		
		OD	optische Dichte
C	Cytosin		
cm	Zentimeter	p	pico- ( $10^{-12}$ )
cv	Säulenvolumen	PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
		PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
d	Tag	PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Da	Dalton		
DMSO	Dimethylsulfoxid	rev	rückwärts
DNA	Desoxyribonukleinsäure	RT	Raumtemperatur
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat		
DTE	1,4-Dithioerythrol	sc	<i>single-chain</i>
DTT	1,4-Dithiothreitol	S.D.	<i>standard deviation</i> (Standardabweichung)
		SDS	Natriumdodecylsulfat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	sek	Sekunde
<i>et al.</i>	und andere		
EtOH	Ethanol	T	Thymin
		Tab.	Tabelle
F	Farad	TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
FPLC	<i>fast protein liquid chromatography</i>	TFO	Tripel-Helix bildendes Oligonukleotid
fwd	vorwärts	Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
G	Guanin	ü.N.	über Nacht
g	Gramm	UV	Ultraviolett
h	Stunde	V	Volt
HIC	Hydrophobe Interaktionschromatographie	Vol.	Volumen
IDA	Iminodiessigsäure	W	Watt
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid	WT	Wildtyp
J	Joule	x g	x Erdbeschleunigung

## Vorbemerkungen

- Als Dezimaltrennzeichen wurde in dieser Arbeit das Komma verwendet.
- Aminosäuren werden gemäß dem international üblichen „Ein Buchstaben-Code“ abgekürzt.
- Die Konfigurationsisomere von Azobenzol werden in dieser Arbeit anstelle der Bezeichnung nach IUPAC „(Z)- bzw. (E)-Isomer“ mit den anschaulicheren Begriffen „*cis*- bzw. *trans*-Isomer“ bezeichnet.
- Der Ausdruck „*cis*-Zustand“ bedeutet in dieser Arbeit der Zustand eines mit Azobenzol modifizierten Proteins unter Belichtung mit UV-Licht; der Ausdruck „*trans*-Zustand“ bedeutet der Zustand eines mit Azobenzol modifizierten Proteins unter Belichtung mit blauem Licht.

## Nomenklatur scPvuII

Da die *single-chain* Variante von PvuII (scPvuII) durch das Aneinanderfügen zweier identischer PvuII Monomere, welche durch eine kurze Linkersequenz verbunden wurde, entstanden ist, kann scPvuII in die N-terminale Hälfte (Aminosäure #2 - #157), die Linker-Region (#158 - #161 für einen 4 Aminosäuren-Linker bzw. #158 - #165 für einen 8 Aminosäuren-Linker) und die C-terminale Hälfte (#162 - #319 bei einem 4 Aminosäuren-Linker und entsprechend #166 - #323 bei einem 8 Aminosäuren-Linker) untergliedert werden. Zur übersichtlicheren Darstellung werden in dieser Arbeit die Aminosäuren der C-terminalen Hälfte mit der entsprechenden Positionsnummer von WT PvuII bezeichnet und mit „\*“ markiert. Bei der Nomenklatur von scPvuII-Varianten bezeichnet jeweils der Terminus in Klammern („sc(...)“) die jeweilige Azobenzol Crosslink-Stelle oder Mutation in der N-terminalen Hälfte von scPvuII. Der Ausdruck „sc(...)“<sub>2</sub> bedeutet, dass diese Crosslink-Stelle oder Mutation in beiden Hälften symmetrisch eingeführt wurde. Der Appendix „\_Azo“ („sc(...)“<sub>2</sub>\_Azo“) bedeutet, dass diese Variante mit AzoMal modifiziert wurde.

Beispiele:

- sc(C49 C62)<sub>2</sub>(F94)<sub>2</sub>\_Azo entspricht der Variante von scPvuII, die jeweils die Azobenzol-Crosslink-Stelle C49-C62 und die zusätzliche Mutation F94 in beiden Hälften des Enzyms besitzt und mit AzoMal modifiziert wurde.
- sc(C61 L<sub>4</sub>)(C49\* C62\*) entspricht der Variante von scPvuII, die zum einen die Azobenzol-Crosslink-Stelle aus C61 (aus der N-terminalen Hälfte) und dem Cystein des Linkers L<sub>4</sub> und zum anderen die Crosslink-Stelle C49\*-C62\* in der C-terminalen Hälfte trägt.

## 1. Einleitung

### 1.1 Regulation biologischer Prozesse mit Licht

Die Steuerung biologischer Prozesse durch Licht stellt in der Natur ein weit verbreitetes und bedeutendes Konzept dar, beispielsweise erwähnt seien die Photosynthese oder der Sehvorgang. Dabei erhalten Proteine durch den Einbau von Chromophoren licht-sensitive Eigenschaften. Eines der am besten untersuchten Beispiele ist Rhodopsin, das über die *cis/trans*-Isomerisierung seines Co-Faktors Retinal reguliert wird (1). Insgesamt gesehen bietet die Verwendung von Licht als externes Trigger-Signal zahlreiche Vorteile, die nur sehr schwer durch andere Konzepte ermöglicht werden können. Die Bestrahlung mit Licht ist überaus schnell und kann unter einer exakten Kontrolle von Raum, Zeit und Dosis der Belichtung erfolgen (2). Da die meisten Zellen nicht spezifisch auf Lichteinstrahlung reagieren, können biologische Prozesse prinzipiell auch *in vivo* durch Licht kontrolliert werden.

Für viele biologische Anwendungen bietet die Aussicht, Biomoleküle und Proteine durch Licht künstlich regulieren zu können, enormes Potential und steht somit im Fokus photochemischer, aber auch biotechnologischer und biomedizinischer Forschung (3-8).

Eine Möglichkeit der Lichtaktivierung von Enzymen bietet das „*caging*“, wobei Proteine mit einer photolabilen Schutzgruppe unter Verlust ihrer enzymatischen Aktivität versehen werden (9-11). Eine lichtinduzierte Abspaltung dieser Gruppe kann die Aktivität anschließend wiederherstellen.

Für einige Anwendungen ist diese Ein-Schritt-Aktivierung ausreichend, jedoch wäre ein erneutes Ausschalten insbesondere für *in vivo*-Applikationen wünschenswert. Hierzu können Proteine mit einer photosensitiven Komponente gekoppelt werden, welche in einer reversiblen Art und Weise durch Licht geschaltet werden kann. Als lichtsteuerbare Komponenten kommen dabei zum einen photosensitive Proteindomänen bestimmter Lichtrezeptoren, wie z.B. die LOV2-Domäne, zum Einsatz, die mit dem zu regulierenden Protein fusioniert werden (12-14). Zum anderen kann die Kopplung mit Schalter-Molekülen, wie z.B. Azobenzol erfolgen, die einer spezifischen lichtinduzierten Photoisomerisierung unterliegen (6, 15, 16).

## 1.2 Azobenzol als photosensitiver Schalter

In dieser Arbeit wird das gut charakterisierte Schalter-Molekül Azobenzol verwendet.

### 1.2.1 Die Photoisomerisierung von Azobenzol

Das Schalter-Molekül Azobenzol („Di(phenyl)diazen“) besteht aus zwei Phenylgruppen, die über eine Azobridge miteinander verbunden sind. Dementsprechend existiert Azobenzol in

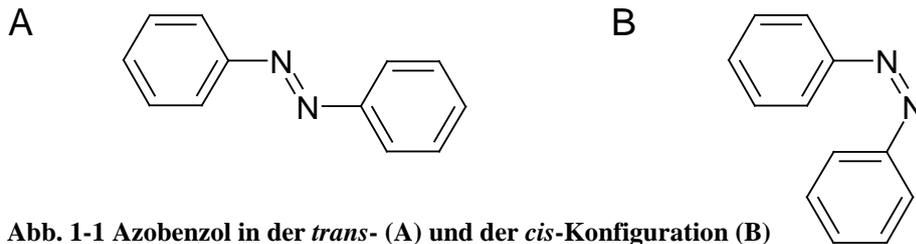


Abb. 1-1 Azobenzol in der *trans*- (A) und der *cis*-Konfiguration (B)

zwei Konfigurationen: der ausgedehnten *trans*-Konfiguration ((E)-Azobenzol) und der kompakteren *cis*-Konfiguration ((Z)-Azobenzol) (Abb. 1-1), wobei die beiden Konfigurationen in einer lichtinduzierten *cis/trans*-Isomerie ineinander umgewandelt werden können (Abb. 1-2) (17, 18). Die Bestrahlung mit UV-Licht von 366 nm Wellenlänge führt dabei zu der Isomerisierung von der *trans*- zu der energiereicheren *cis*-Konfiguration der

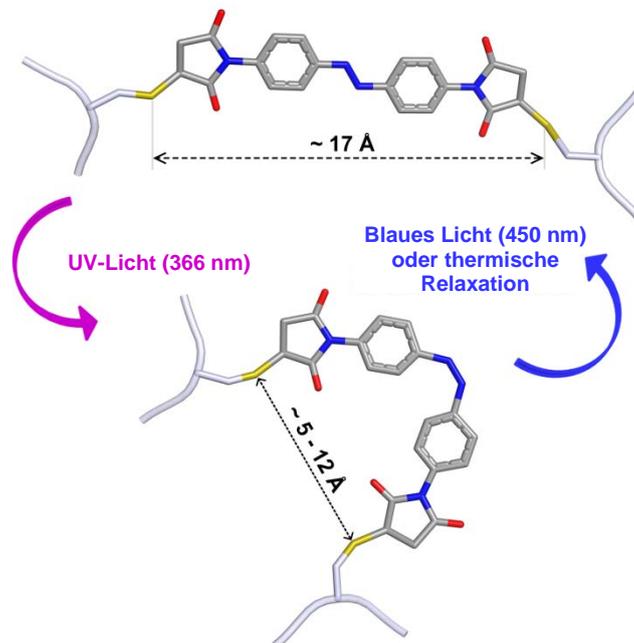


Abb. 1-2 Schema der *trans* → *cis* Isomerisierung von AzoMal modifiziert mit Cystein-Resten durch Belichtung mit UV-Licht und der *cis* → *trans* Isomerisierung mit blauem Licht. Dabei ist der S-S - Abstand in der *trans*-Konfiguration deutlich größer als in der *cis*-Konfiguration.

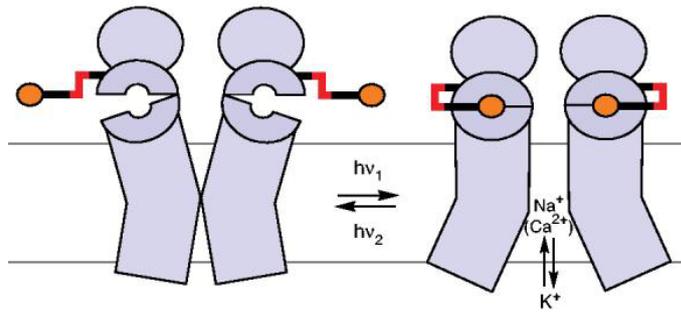
zentralen Diazen-Bindung. Eine Rückisomerisierung in den *trans*-Zustand erfolgt durch Belichtung mit sichtbarem Licht der Wellenlänge 450 nm. Daneben findet ebenfalls thermische Relaxation in den energetisch stabileren *trans*-Zustand statt, wobei die räumliche Umgebung der zentralen Azobenzol-Gruppe entsprechender Derivate die Halbwertszeit der *cis*-Konfiguration beeinflusst (19). Der detaillierte Mechanismus der Photoisomerisierung bleibt Gegenstand aktueller Forschung, wobei neuere Studien für eine Rotation um die zentrale Diazen-Doppelbindung und gegen eine Inversion in der Ebene sprechen (17, 20, 21).

Azobenzol besitzt mehrere vorteilhafte Eigenschaften, die es als Schalter-Molekül prädestinieren. Azobenzol unterliegt nur geringfügig einem *photobleaching*, und das Umfeld der Azobenzol-Gruppe hat nur einen sehr kleinen Einfluss auf das Absorptionsprofil und den Isomerisierungsprozess. Des Weiteren können hohe Ausbeuten an Übergängen zwischen beiden Konfigurationen und somit auch eine hohe Populationsdifferenz zwischen *cis* und *trans* erhalten werden (6). Nicht zuletzt findet die Isomerisierung sehr schnell innerhalb von Picosekunden statt (22, 23). Dies alles macht Azobenzol zu einem verlässlichen Chromophor und zu einem effektiven photoinduzierbaren Schalter.

### 1.2.2 Regulation von Peptiden und Proteinen mittels Azobenzol

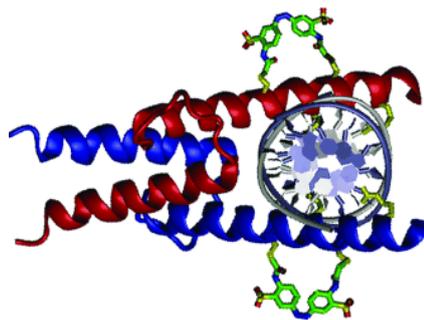
Zum Einbau von Azobenzol in Peptide und Proteine kommen vor allem vier allgemeine Vorgehensweisen zum Einsatz: (i.) Der Einbau über Peptidsynthese (24-27); (ii.) der Einbau über *in vitro* - Translation (28, 29); (iii.) der Einbau *in vivo* über ein orthogonales tRNA / Aminoacyl-tRNA-Synthetase Paar spezifisch für Azophenyl-Alanin (30); und (iv.) chemische Modifikation von Peptiden und Proteinen (31, 32). Daneben konnte in spezifischeren Ansätzen über die Verwendung von Azobenzol-modifizierten Liganden oder DNA-Substratsequenzen indirekt Einfluss auf die Aktivität von Proteinen genommen werden (33-36).

Die chemische Modifikation stellt dabei den am weitesten verbreiteten Ansatz dar und kann mit mono- oder bi-funktionellen Azobenzol-Derivaten erfolgen. Der Modifikationsansatz mit mono-funktionellen Azobenzol-Derivaten beruht vor allem auf sterischen Effekten (37, 38) oder auf Beeinflussung von Liganden-Bindungen durch das angehängte Azobenzol, wie zum Beispiel in Arbeiten über das lichtinduzierte Öffnen von Ionenkanälen (vgl. Abb. 1-3) (39-41). Dagegen beruhen die durch Modifikation mit bi-funktionellen Azobenzol-Derivaten hervorgerufenen Effekte auf einer lichtbedingten Konformationsänderung des Zielobjekts und der damit verbundenen Regulation von dessen Aktivität (32, 42, 43). Hierfür kann als Beispiel die lichtinduzierte DNA-Bindung von modifizierten, kleinen helikalen Transkriptionsfaktoren



**Abb. 1-3** Lichtinduziertes Öffnen eines ionotropen Glutamatrezeptors über ein angehängtes Azobenzol-Glutamat-Konstrukt (nach Volgraf *et al.*, 2006).

wie GCN4-bZIP oder MyoD (Abb. 1-4) aufgrund der photosensitiven Integrität der helikalen Struktur (vgl. Abb. 1-9 B), angeführt werden (44, 45). Die chemische Modifikation von Proteinen mit Azobenzol-Derivaten stellt somit den vielversprechendsten Ansatz für ein verallgemeinerbares Konzept zur Generation von lichtsteuerbaren Proteinen dar, insbesondere wenn strukturelle Information über das Protein vorhanden ist (46). Bisher konnte gezeigt werden, dass die Funktion einiger Proteine sowohl *in vitro* (47-49) als auch *in vivo* (50-52) durch Belichtung gesteuert werden kann. Jedoch sind bisher nur wenige Beispiele bekannt, bei denen konkret die enzymatische Aktivität zu einem gewissen Maße durch Modifikation mit mono-funktionellen Azobenzol-Derivaten oder den Einbau einer Azobenzol-tragende Aminosäure durch spezifische Belichtung reguliert werden konnte (28, 38, 53, 54). Die reversible lichtsensitive Kontrolle enzymatischer Aktivität durch bi-funktionelle Azobenzol-Derivate ist nach meinem Wissen bisher noch nicht erreicht worden.



**Abb. 1-4** Schematische Darstellung der Modifikation des helikalen Transkriptionsfaktors MyoD mit Azobenzol-Schaltern (nach Guerrero *et al.*, 2005).

Eine Liste sämtlicher Publikationen, bei denen bi-funktionelle (Tab. 1-1) oder mono-funktionelle (Tab. 1-2) Azobenzol-Derivate zur Licht-Regulation von Peptiden und Proteinen und bei denen Azobenzol-Derivate zur Inkorporation in Peptide, Proteine oder DNA eingesetzt wurden (Tab. 1-3), ist im folgenden unter Angabe des jeweiligen Zielobjekts, des erreichten Effekts, des verwendeten Azobenzol-Derivats und der jeweiligen Kopplungsart tabellarisch zusammengefasst.

## 1. Einleitung

**Tab. 1-1 Publikationen zur chemischen Modifikation mit bi-funktionellen Azobenzol-Derivaten**

<i>Publikation</i>	<i>Jahr</i>	<i>Zielobjekt</i>	<i>lichtinduzierter Effekt</i>	<i>Azobenzol-Derivat</i>	<i>Azobenzol-Modifikation</i>
Kumita (55)	2000	helikales Peptid	Störung der helikalen Struktur	AzoIod	nach Peptidsynthese
Flint (56)	2002	helikales Peptid	Störung der helikalen Struktur	AzoIod	nach Peptidsynthese
Kumita (57)	2002	helikales Peptid	Störung der helikalen Struktur	AzoIod	nach Peptidsynthese
Kumita (58)	2002	Leucin Zipper Peptid GCN4-p1	Störung der helikalen Struktur & <i>coiled coil</i> Interaktion	AzoIod	nach Peptidsynthese
Zhang (59)	2003	helikales Peptid	Störung der helikalen Struktur	AzoCl	nach Peptidsynthese
Burns (60)	2004	helikales Peptid	Störung der helikalen Struktur	AzoIod	nach Peptidsynthese
Pozhidaeva (19)	2004	helikales Peptid	Störung der helikalen Struktur	MTS-Azobenzol Cross-linker	nach Peptidsynthese
Umeki (43)	2004	Myosin	kleine Bewegung des Hebelarms des Myosinkopfs	AzoMal	posttranslational <i>in vitro</i>
Guerrero (44)	2005	Transkriptionsfaktor MyoD	lichtinduzierte DNA Bindung (10 <sup>2</sup> - fach)	AzoCl	posttranslational <i>in vitro</i>
Guerrero (61)	2005	helikale Homeodomäne von HDH-3	lichtinduzierte DNA Bindung (18-fach)	AzoCl	nach Peptidsynthese
Woolley (32)	2005	helikales Peptid	Störung der helikalen Struktur	AzoIod	nach Peptidsynthese
Chi (62)	2006	helikales Peptid	Störung der helikalen Struktur	N,N-dialkyl-Azobenzol	nach Peptidsynthese
Kusebauch (63)	2006	Kollagen Triple-Helix-Peptid	Störung der Triple-Helix-Struktur	AzoButin	nach Peptidsynthese
Woolley (45)	2006	Leucin Zipper GCN4-bZIP	lichtinduzierte DNA Bindung (20- fach)	AzoCl	posttranslational <i>in vitro</i>
Kusebauch (42)	2007	Kollagen Triple-Helix-Peptid	Störung der Triple-Helix-Struktur	AzoButin	nach Peptidsynthese
Beharry (64)	2008	helikales Peptid	Störung der helikalen Struktur	Azo-Piperazin	nach Peptidsynthese
Kneissl (65)	2008	helikales Peptid (Bak <sub>72-87</sub> )	lichtinduzierte Bindung des Peptids an Bcl-x <sub>L</sub> (20-fach)	AzoCl	posttranslational <i>in vitro</i>
Zhang (46)	2009	FynSH3 - Domäne	lichtinduziertes Falten/Entfalten der Proteinstruktur	AzoCl	posttranslational <i>in vitro</i>

AzoButin = Azobenzol-4,4'-bis-N-(4-chloro-2-butynenyl)-carboxamid

AzoPiperazin = 2-Chloro-1-[4-(4-[4-(2-chloroacetyl)-piperazin-1-yl]phenylazo)-phenyl]-piperazin-1-yl]-ethanon

AzoIod und AzoCl siehe Punkt 2.1.11.1

## 1. Einleitung

**Tab. 1-2 Publikationen zur chemischen Modifikation mit mono-funktionellen Azobenzol-Derivaten**

<i>Publikation</i>	<i>Jahr</i>	<i>Zielobjekt</i>	<i>lichtinduzierter Effekt</i>	<i>Azobenzol-Derivat</i>	<i>Azobenzol-Modifikation</i>
Willner (54)	1991	Papain	lichtinduzierte Hydrolase-Aktivität (2,8-fach)	Carboxy-azobenzol	posttranslational <i>in vitro</i>
Banghart (50)	2004	Shaker K <sup>+</sup> -Kanal	lichtinduziertes Blockieren der Pore	mono-funkt. Azo(NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> )	<i>in vivo</i> Modifikation an Membran-Kanälen in Neuronen
Chambers (51)	2006	Shaker K <sup>+</sup> -Kanal	durch lichtinduzierte Porenöffnung stimulierte Aktionspotentiale	mono-funkt. Azo(NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> )	<i>in vivo</i> Modifikation an Membran-Kanälen in Neuronen
Loudwig (48)	2006	α-Hemolysin Protein Pore	lichtinduziertes Blockieren der Pore	mono-funkt. Azo(SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )	posttranslational <i>in vitro</i>
Muramatsu (37)	2006	GroEL - Chaperonin	lichtinduzierte mechanische Barriere am Eingang des zylindrischen Hohlraums	mono-funkt. Azo(CO <sub>2</sub> <sup>-</sup> )	posttranslational <i>in vitro</i>
Volgraf (41)	2006	Ionotroper Glutamat Rezeptor	lichtinduzierte Porenöffnung	MAG	<i>in vivo</i> Modifikation an Membran-Kanälen in HEK293-Zellen
Gorostiza (39)	2007	Ionotroper Glutamat Rezeptor	lichtinduzierte Porenöffnung	MAG	<i>in vivo</i> Modifikation an Membran-Kanälen in HEK293-Zellen
Szobota (52)	2007	Ionotroper Glutamat Rezeptor	durch lichtinduzierte Porenöffnung stimulierte Aktionspotentiale	MAG	<i>in vivo</i> Modifikation an Membran-Kanälen in Neuronen
Yamada (38)	2007	Kinesin	lichtinduzierte ATPase Aktivität (2-fach)	PAM	posttranslational <i>in vitro</i>
Fortin (66)	2008	Spannungs-aktivierte K <sup>+</sup> -Kanäle	durch lichtinduzierte Porenöffnung stimulierte Aktionspotentiale	mono-funkt. AzoQ	<i>in vivo</i> Modifikation an Membran-Kanälen in Neuronen
Harvey (53)	2008	Carbo-anhydrase	lichtinduzierte Hydrolaseaktivität (2-fach)	Epo-Azo-sulf	posttranslational <i>in vitro</i>
Jog (47)	2008	β-Cyclodextrin Pore	lichtinduziertes Blockieren der Pore (2-fach)	Bromobutyl-Azobenzol	posttranslational <i>in vitro</i>
Numano (40)	2009	Ionotroper Glutamat Rezeptor	durch lichtinduzierte Porenöffnung stimulierte Aktionspotentiale	MAG	<i>in vivo</i> Modifikation an Membran-Kanälen in HEK293-Zellen/Neuronen
Shishido (49)	2009	Calmodulin	lichtinduzierte Bindung zu Calmodulin-Bindepeptid M13 (5-fach)	PAM	posttranslational <i>in vitro</i>

MAG = Maleimid-Azobenzol-Glutamat

PAM = N-(4-phenylazophenyl)-maleimid

Epo-Azo-sulf = Epoxid-Azobenzol-Arylsulfonamid

## 1. Einleitung

**Tab 1-3 Publikationen zu Azobenzol-Derivaten für die Inkorporation in Peptide/Proteine/DNA bzw. ohne Kopplung**

<i>Publikation</i>	<i>Jahr</i>	<i>Zielobjekt</i>	<i>lichtinduzierter Effekt</i>	<i>Azobenzol-Derivat</i>	<i>Azobenzol-Kopplung</i>
Westmark (36)	1993	Inhibitoren für Cystein- und Serin-Proteasen	lichtinduzierte Inhibition von Papain (6-fach)	Azobenzol-Aminoacetaldehyd	keine Kopplung
Ueda (67)	1994	Phospholipase A <sub>2</sub>	Lichtinduzierte Hydrolase-Aktivität (1,5-fach)	Azophenyl-Alanin	Inkorporation durch Peptidsynthese
Liu (68)	1997	S-Peptid der Ribonuklease S	lichtinduzierte Ribonuklease S Aktivität (4-fach)	Azophenyl-Alanin	Inkorporation durch Peptidsynthese
James (25)	2001	S-Peptid der Ribonuklease S	lichtinduzierte Ribonuklease S Aktivität (10-20-fach)	Azophenyl-Alanin	Inkorporation durch Peptidsynthese
Muranaka (28)	2002	Meerrettich Peroxidase	lichtinduzierte Peroxidase Aktivität (10 <sup>1</sup> -10 <sup>2</sup> -fach, nicht vollständig reversibel)	Azophenyl-Alanin	Inkorporation durch <i>in vitro</i> Translation
Shimoboji (69)	2002	Endoglucanase 12A	lichtinduziertes Binden und Blockieren der Endoglucanase durch ein Azobenzol-Polymer	Azobenzol-Polymer	keine Kopplung
Matsunaga (70)	2004	Antisense-DNA f. RNase H – RNA Substrat	lichtinduziertes Blockieren des RNase H – RNA Substrates durch Annilieren der Antisense-DNA	Azophenyl-Threoninol	Inkorporation durch DNA-Synthese
Nakayama (29)	2004	BamHI	Ein-Schritt Aktivierung durch UV-Licht	Azophenyl-Alanin	Inkorporation durch <i>in vitro</i> Translation
Nakayama (71)	2005	BamHI	Ein-Schritt Aktivierung durch UV-Licht	Carb.phenyl azophenyl-Alanin	Inkorporation durch <i>in vitro</i> Translation
Bose (30)	2006	Transkriptionsaktivator CAP	lichtinduzierte DNA Bindung (4-fach)	Azophenyl-Alanin	Inkorporation durch <i>in vivo</i> Translation
Dong (24)	2006	β-Hairpin-Peptid	Störung der Hairpin-Struktur	AMPP	Inkorporation durch Peptidsynthese
Liu (34)	2006	T7 Promotor Sequenz	lichtinduzierte Transkription durch T7 RNA Polymerase (8-fach)	Azophenyl-Threoninol	Inkorporation durch DNA-Synthese
Kuil (72)	2008	Peptido-mimetischer ITAM Ligand für tSH2	lichtinduzierte Bindung zu tSH2	AMPB	Inkorporation durch Peptidsynthese
Pearson (35)	2008	Peptido-mimetischer Inhibitor f. Chymotrypsin	lichtinduzierte Inhibition von Chymotrypsin (5-fach)	Trifluor-methylketon-Azobenzol	keine Kopplung
Kim (33)	2009	Trypsin Aptamer	lichtinduzierte Inhibition von Trypsin durch das Aptamer	Azophenyl-Threoninol	Inkorporation durch DNA-Synthese
Nomura (26)	2009	Tandem Zink-Finger Peptid	lichtinduzierte DNA-Bindung (~10-fach)	Azobenzol-Carboxylchlorid	Inkorporation durch Peptidsynthese
Parisot (27)	2009	FLAG Peptid	lichtinduzierte Bindung zu anti-FLAG Antikörper (280-fach)	AMPB	Inkorporation durch Peptidsynthese

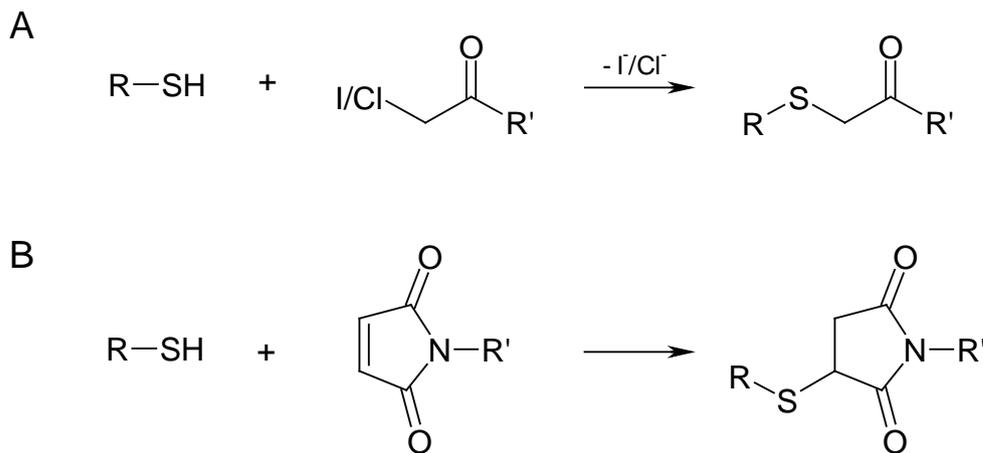
AMPP = [3-(3-aminomethyl)-phenylazo]phenyllessigsäure

AMPB = (4-Aminomethyl)phenylazobenzoessäure

### 1.2.3 Kopplung von Azobenzol-Derivaten an Proteine durch chemische Modifikation

Bei der chemischen Modifikation von Proteinen mit Azobenzol-Derivaten erfolgt die Verknüpfung über Kopplungsgruppen, die spezifisch mit bestimmten Aminosäure-Resten reagieren. Dazu wurden Azobenzol-Derivate synthetisiert, die neben der zentralen Azobenzol-Komponente Thiol-spezifische Kopplungsgruppen tragen, welche hoch spezifisch mit den Sulfhydryl-Gruppen von exponierten Cystein-Resten reagieren können und somit über eine kovalente Bindung mit dem Protein verknüpft werden.

In dieser Arbeit kommen die Thiol-spezifischen Kopplungsgruppen Iod- bzw. Chloracetamid (Abb. 1-5 A) und Maleimid (Abb. 1-5 B) zum Einsatz. Für die Modifikation sollte der pH-Wert zur Erhöhung der Nukleophilie der Sulfhydrylgruppe nicht kleiner als pH 6,5 und insbesondere bei Maleimid nicht größer als pH 7,5 sein, da ansonsten der Maleimid-Ring hydrolysiert und nicht mehr mit Sulfhydryl-Gruppen reagieren kann (73).



**Abb. 1-5 Kopplungsreaktionen:** Schematische Kopplung einer Sulfhydryl-Gruppe an Iod-/Chloracetamid (A) bzw. an Maleimid (B)

## 1.3 ScPvuII als Modellenzym zur Generation eines lichtschtbaren Restriktionsenzym

Für die Generation eines lichtschtbaren Restriktionsenzym dient in dieser Arbeit die *single-chain* Variante der Restriktionsendonuklease PvuII als Modellenzym.

### 1.3.1 Das Restriktionsenzym PvuII

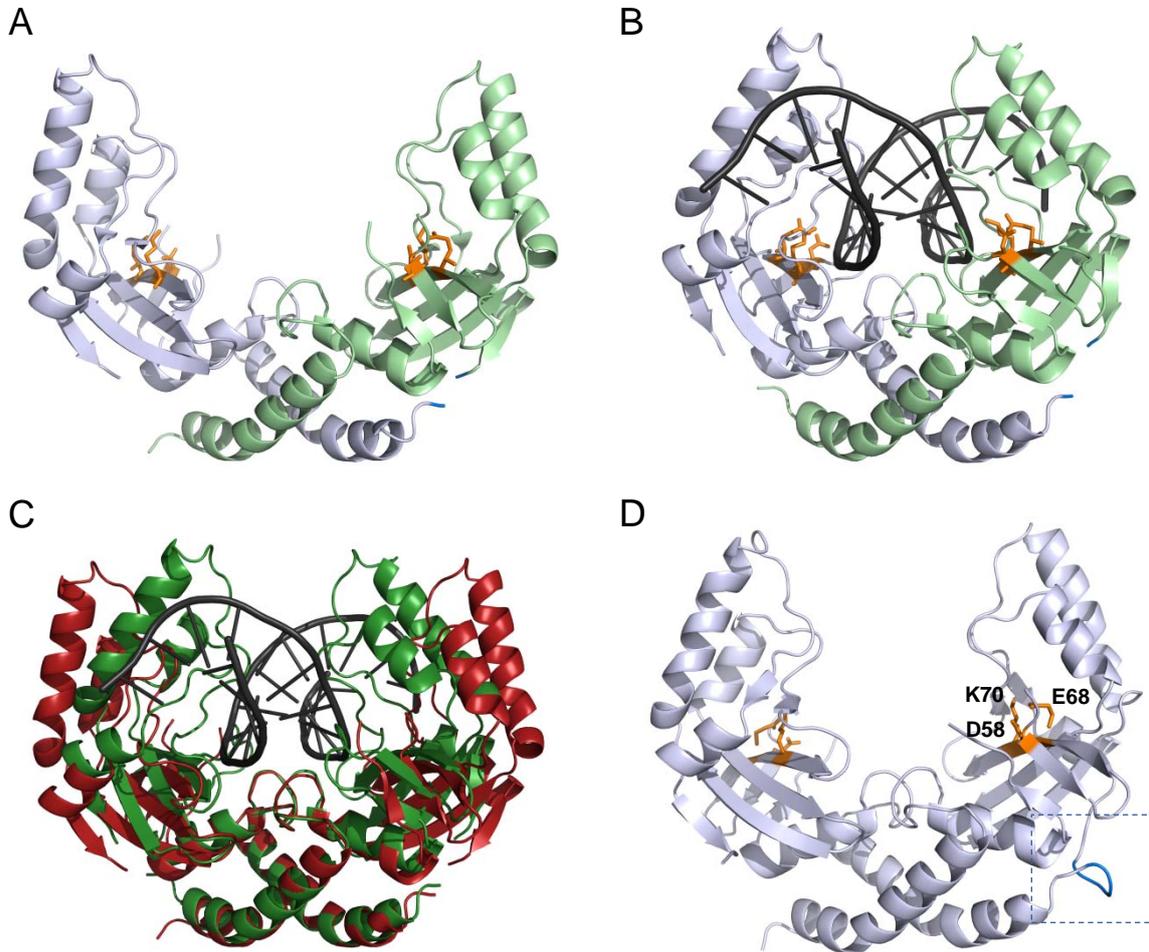
Die Fähigkeit, DNA an einer spezifischen Stelle zu spalten, macht Restriktionsenzyme zu unentbehrlichen Werkzeugen in der Molekularbiologie und Gentechnik. *In natura* sind diese

Enzyme bis auf wenige Ausnahmen Teil eines bakteriellen stammspezifischen Restriktions-Modifikationssystems. Die Restriktionsenzyme werden dabei je nach Untereinheiten, Kofaktoren und Reaktionsmechanismen in vier Typen unterteilt (74), wobei die Typ II Restriktionsenzyme mit ihren bisher mehr als 5000 identifizierten Mitgliedern die am besten charakterisierte Gruppe darstellen (75).

Das Restriktions-Modifikationssystem dieses Typs besteht jeweils aus zwei Enzymen mit derselben spezifischen Erkennungssequenz, dem Restriktionsenzym und der dazugehörigen Methyltransferase, wobei das Restriktionsenzym die DNA in der Regel an dieser Stelle spaltet und die Methyltransferase die DNA durch Methylierung der Erkennungssequenz vor der Spaltung bewahrt. Die eigene bakterielle DNA zeigt dieses Methylierungsmuster und ist somit resistent gegenüber der Spaltung, während eingedrungene fremde DNA, wie zum Beispiel virale DNA, dieses Muster nicht aufweist und deshalb durch das Restriktionsenzym zum Erhalt der genetischen Identität gespalten werden kann. Daher muss beim Eindringen fremder DNA die Spaltung noch vor einer etwaigen Methylierung erfolgen, da ansonsten die fremde DNA ebenfalls spaltungsresistent wird und ihre schädliche Wirkung entfalten kann. Man geht davon aus, dass diese Tatsache durch eine erleichterte Diffusion des Restriktionsenzym zur jeweiligen Erkennungssequenz hin erreicht wird (76-78). Gemäß einer Studie auf dem „*single-molecule*“-Level (79) handelt es sich dabei um einen ein-dimensionalen *sliding*-Mechanismus (80-83), bei dem das Enzym unspezifisch an die DNA bindet und über ein-dimensionale Diffusion daran entlang gleitet, in Kombination mit einem drei-dimensionalen *hopping/jumping*-Mechanismus (84-87), wobei sich das Enzym kurzfristig von der DNA ablöst, um nach kurzer drei-dimensionaler Diffusion erneut zu binden.

Die Typ II Restriktionsenzyme besitzen 4 bis 8 bp lange Erkennungssequenzen und spalten innerhalb dieser Sequenz oder unmittelbar daneben, wobei 5'-Phosphat- und 3'-Hydroxyl-Enden erzeugt werden. Sie kommen in natürlicher Form als Monomere, Dimere oder Tetramere vor und benötigen in der Regel zweiwertige Ionen als Kofaktoren (88-90). Das aktive Zentrum ist strukturell jeweils aus vier bis fünf  $\alpha$ -Faltblättern aufgebaut, die vom  $\alpha$ -Helices umgeben werden, und besitzt das konservierte „PD...(D/E)xK“ Motiv (91, 92). Die drei konservierten Aminosäuren Asparaginsäure, Glutaminsäure und Lysin stellen die entscheidenden Reste im aktiven Zentrum dar (93, 94), wobei neben Lysin auch Glutamin oder Glutaminsäure vorkommen kann (95, 96). Innerhalb der Typ II – Restriktionsenzyme gibt es nach Definition wiederum eine Anzahl von Untergruppen, die nach mehreren Eigenschaften wie beispielsweise der Symmetrie der Erkennungssequenz unterteilt werden (74).

Das Restriktionsenzym PvuII gehört zur Gruppe der Typ II P Restriktionsenzyme. Es bildet ein Homodimer aus zwei identischen Untereinheiten von je 18,2 kDa Molekulargewicht und stellt somit das bisher kleinste bekannte Restriktionsenzym dar (Abb. 1-6 A - C). Jede Untereinheit besitzt ein aktives Zentrum und wirkt auf je einen Strang der doppelsträngigen

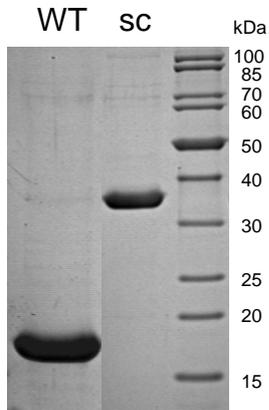


**Abb. 1-6 Strukturen von PvuII/scPvuII:** (A) Struktur von PvuII (Apoenzym-Struktur, PDB = 1PVU). (B) Struktur von PvuII mit spezifischer DNA (Kokristall-Struktur, PDB = 1PVI). (C) Übereinanderlagerung der Apoenzym- (rot) und der Kokristall-Struktur (grün) von PvuII. (D) Struktur von scPvuII (Apoenzym-Struktur), mit dem die N- und C-terminale Hälfte verbindendem Linker (markiert in blau). In Orange sind jeweils die Reste des aktiven Zentrums (D58, E68, K70) dargestellt.

DNA, so dass pro Bindungsereignis beide Stränge geschnitten werden können (97). Die Spaltung erfolgt in Mitten der palindromen Erkennungssequenz CAG↓CTG und erzeugt glatte Enden. Als Kofaktoren werden dafür bis zu zwei  $Mg^{2+}$ -Ionen pro Untereinheit benötigt (98-105). Es wird diskutiert, dass der Übergangszustand in Folge eines „Zwei-Metall-Ionen-Mechanismus“ durch Reduktion der elektrostatische Abstoßung der negativ geladenen Gruppen dieses Zustandes stabilisiert wird (106, 107). Die drei katalytisch aktiven Reste von

PvuII sind Asp 58, Glu 68 und Lys 70 (108), deren Austausch zu dramatischem Verlust der spezifischen Aktivität führt (109).

### 1.3.2 Das Restriktionsenzym scPvuII



**Abb. 1-7 WT PvuII vs. scPvuII:** Gelelektrophoretische Analyse (SDS-PAGE) von WT PvuII (2x 18,2 kDa) und scPvuII (36,7 kDa).

Das eigentliche Modellenzym dieser Arbeit für die Generierung eines lichtschtbaren Restriktionsenzym ist die *single-chain* - Variante von PvuII (scPvuII). Bei dieser Variante wurden die beiden Untereinheiten des PvuII - Homodimers durch einen Linker (Gly-Ser-Gly-Gly) zu einer Polypeptidkette verbunden (Abb. 1-6 D), was gemäß den Kristallstrukturen von PvuII durch die räumliche Nähe des C-terminalen Endes einer Untereinheit zum N-terminalen Ende der anderen Untereinheit (Abb. 1-6 A/B, blau markierte Termini) ermöglicht wird. ScPvuII besitzt somit ein Molekulargewicht von 36,7 kDa, hat eine dem WT PvuII vergleichbare Substratspezifität und zeigt nur geringe Einbußen in der Aktivität ( $k_{cat}/K_M = 1,1 \times 10^9 \text{ min}^{-1} \text{ M}^{-1}$  für scPvuII und  $3,5 \times 10^9 \text{ min}^{-1} \text{ M}^{-1}$  für WT PvuII) (110).

### 1.3.3 ScPvuII und Lichtsteuerung

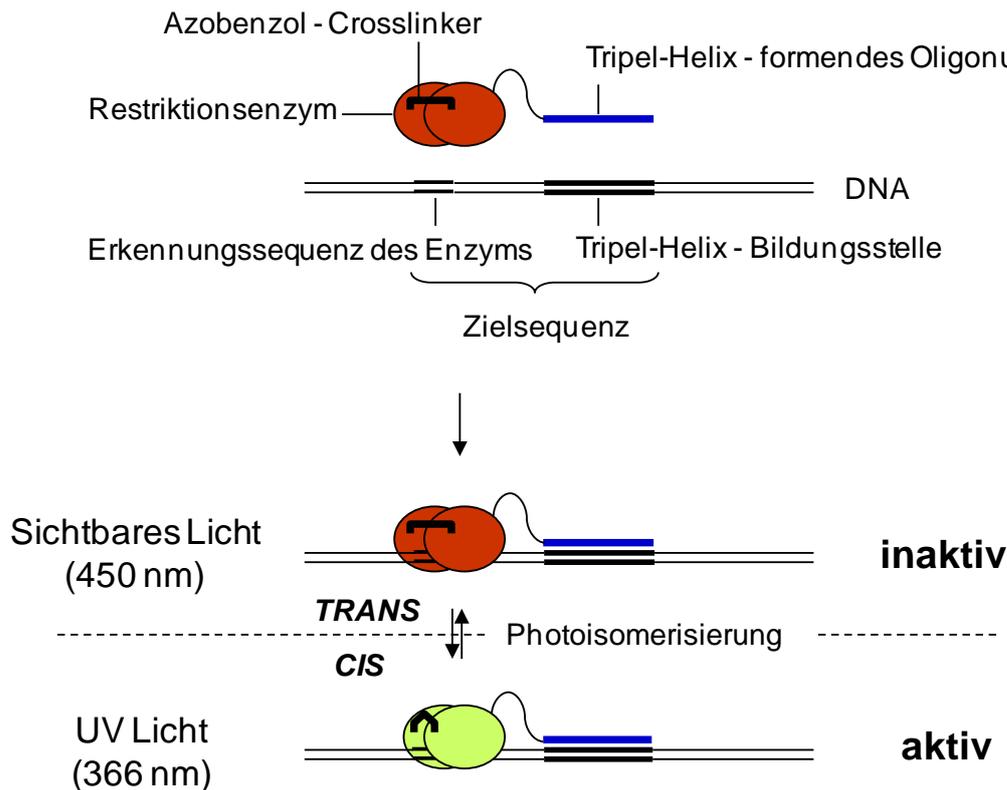
Die *single-chain* Variante von PvuII bietet einige Vorteile, die sie für den Einsatz als Modellenzym für die Lichtsteuerung geeignet machen. So ist scPvuII ein kleines, kompaktes Enzym, das zudem eine hohe Aktivität zeigt. Es ist in seiner nativen Form frei von Cysteinen, so dass für die Kopplung mit Azobenzol-Derivaten direkt spezifische Cysteine in das Protein eingeführt werden können. Die Struktur von scPvuII ist bekannt (Abb. 1-6 D) (111), so dass auf Basis der strukturellen Information Positionen für das Anbringen eines Azobenzol-Schalters gewählt werden können. Daneben ist auch der WT PvuII funktionell und strukturell gut charakterisiert, die Struktur des Apoenzyms (Abb. 1-6 A) (108) und des Kokristalls mit spezifischer DNA (Abb. 1-6 B) (112) sind bekannt. Durch Übereinanderlagerung beider Strukturen können Informationen über Konformationsänderungen des Proteins aufgrund spezifischer Substratbindung gewonnen werden, die für die Wahl der Positionen für den Azobenzol-Schalter in scPvuII ebenso aufschlussreich sind. Mit der speziellen Verwendung der *single-chain* Variante, die im Vergleich zum WT durch den artifiziellen Linker etwas unflexibler ist, bietet sich ebenfalls die Möglichkeit, Azobenzol-Schalter asymmetrisch in beiden Hälften des Enzyms anzubringen.

### 1.3.4 ScPvuII mit Lichtschalter und Gentherapie

Das Heilen von Erbkrankheiten durch Gentherapie, insbesondere von monogenen Erbkrankheiten, bei denen sich aufgrund eines defekten Gens ein krankheitsbedingter Phänotyp ergibt, stellt eine der größten Anforderungen an die heutige Forschung dar (113). Da Therapieansätze über eine unspezifische Integration des funktionellen Gens mittels viraler Vektoren trotz Teilerfolge häufig auch zu unkontrollierter Zellproliferation führen (114, 115), ist das Ziel der Gen-Ersatz-Therapie, ein fehlerhaftes Gen gezielt durch das gesunde Gen zu ersetzen. Dies ist jedoch technisch sehr schwer zu realisieren.

Ein Ansatzpunkt dafür ist es, das gesunde Gen in die Zelle einzuschleusen und innerhalb oder unmittelbar in der Nähe des auszutauschenden Genes einen Doppelstrangbruch zu induzieren (116). Durch diesen Strangbruch wird in Folge der greifenden zelleigenen Reparaturmechanismen auch die homologe Rekombination stark angeregt, wodurch das fehlerhafte Gen durch Rekombination mit dem gesunden Gen ausgetauscht werden könnte. Voraussetzung für diese Strategie ist jedoch, dass die DNA an einer spezifischen Stelle in der Nähe der Mutation gespalten wird. Damit im menschlichen Genom nur ein spezifischer Schnitt erfolgt, bräuchte man eine spezifische Erkennungssequenz von mindestens 16 bp. Dies kann durch die Verwendung von „konstruierten“ Sequenz-spezifischen Endonukleasen, wie z.B. Homing Endonukleasen, Zink-Finger-Nukleasen oder Restriktionsendonukleasen erreicht werden (116, 117). So ist es z.B. bereits gelungen, die Nukleasedomäne des Restriktionsenzym FokI mit Zinkfinger – DNA – Bindemodulen zu koppeln, wodurch ein gezielter Doppelstrangbruch an der gewünschten Stelle erzielt werden konnte (118-122).

Um eine höhere Sequenz-Spezifität eines Restriktionsenzym zu erlangen, kann dieses auch mit einem Tripel-Helix bildenden Oligonukleotid verbunden werden, welches an einer adressierten Sequenz binden und dort eine spezifische Tripel-Helix ausbilden kann (123). Durch die Sequenz des Oligonukleotids könnte somit eine beliebige Sequenz adressiert werden. Die Fusion der *single chain* – Variante von PvuII am C-terminalen Ende mit einem 16 bp – langen Oligonukleotid, das eine der PvuII-Erkennungssequenz benachbarte 16 bp lange Sequenz adressiert, führte dabei zu einem chimären Heterokonjugat, welches die DNA gezielt an der adressierten Stelle spalten konnte (124). Da die Tripel-Helix-Formation des Heterokonjugats im Vergleich zur katalytischen Aktivität von scPvuII jedoch relativ langsam ist, konnte eine adressierte Spaltung *in vitro* bisher nur nach einem anfänglichen Inkubationsschritt des Heterokonjugats mit der Ziel-DNA in Abwesenheit von  $Mg^{2+}$  mit anschließender induzierter Spaltung durch Zugabe von  $Mg^{2+}$  beobachtet werden, da sich ansonsten auch nicht adressierte Spaltungen ergaben. Für *in vivo* Applikationen wäre es somit



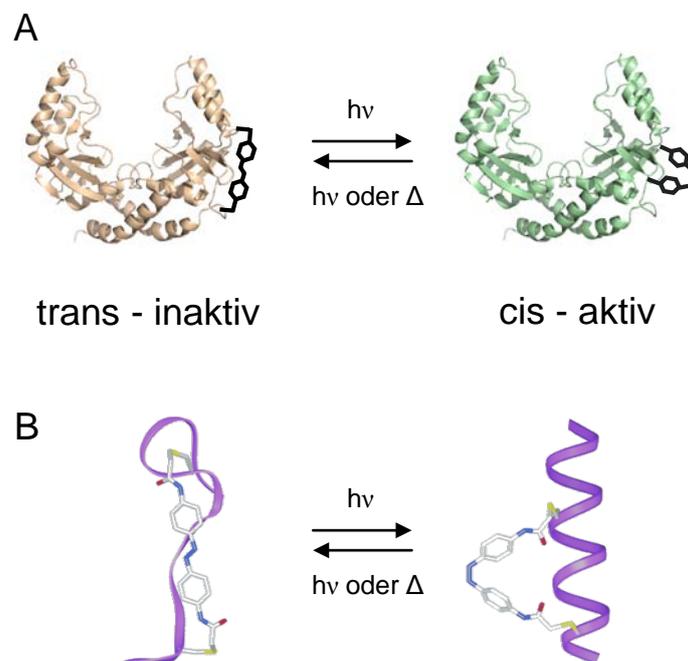
**Abb. 1-8 Modell der Kombination eines Restriktionsenzym, dessen Aktivität über einen angebrachten Azobenzol-Schalter durch Licht steuerbar ist, mit einem Tripel-Helix-formenden Oligonukleotid:** Die Substratspezifität des Restriktionsenzym kann durch Kopplung mit einem Tripel-Helix-formenden Oligonukleotid (TFO), welches eine spezifische Tripel-Helix-Bildungsstelle (TFS) bindet, erhöht werden, so dass das entstandene Heterokonjugat eine bipartite Zielsequenz aus der TFS und einer benachbarten Erkennungssequenz des Restriktionsenzym erkennen kann. Durch Kombination mit einem lichtschtbaren Restriktionsenzym, könnte das Heterokonjugat zunächst im inaktiven Zustand (Sichtbares Licht, Azobenzol-Schalter = *trans*-Konfiguration) über das TFO spezifisch an die TFS binden. Durch Photoisomerisierung in den aktiven Zustand (UV-Licht, Azobenzol-Schalter = *cis*-Konfiguration) kann ein spezifischer Schnitt an der durch die TFS adressierten Erkennungssequenz des Restriktionsenzym erfolgen. Eine anschließende Belichtung mit sichtbarem Licht führt zur erneuten Inaktivierung des Heterokonjugats.

von großem Nutzen, wenn die Aktivität des scPvuII-Moduls reguliert werden könnte. Ein lichtschtbares scPvuII-TFO Heterokonjugat (Abb. 1-8) könnte zunächst im inaktiven Zustand durch „Profektion“ in die Zelle eingebracht werden und die adressierte DNA-Spaltung erst nach erfolgter Tripel-Helix Formierung durch einen Lichtimpuls induziert werden. Nach erfolgtem Doppelstrangbruch könnte die Endonuklease-Aktivität durch Lichtsteuerung ausgeschaltet werden. Die zeitliche Kontrolle über die Nuklease-Aktivität wäre zudem auch für andere Arten von Meganukleasen wie z.B. Homing Endonukleasen oder Zink-Finger-Nukleasen von großer Bedeutung, um das Problem der auftretenden nicht adressierten Spaltung aufgrund des langen Ausgesetztseins der genomischen DNA durch diese Enzyme in der Zelle zu minimieren (125, 126).

## 1.4 Strategien zur Entwicklung eines lichtschaltbaren Restriktionsenzym

### 1.4.1 Photoswitch-Strategie

Bei der *Photoswitch*-Strategie soll die Aktivität von scPvuII durch das Anbringen von bifunktionellen Azobenzol-Schaltern reguliert werden. Die Schalter sollen entweder nahe des katalytischen Zentrums (Abb. 1-9 A) oder auf den drei Helices, die die DNA-Bindungsstelle flankieren, angebracht werden. Somit kann durch die Photoisomerisierung des angehängten Azobenzol-Schalters zwischen der *trans*- und der *cis*-Konfiguration entweder direkt auf die Konformation des aktiven Zentrums Einfluss genommen werden, oder aber die Struktur der modifizierten Helices kann, analog zu der lichtinduzierten Strukturänderung von kleinen helikalen Peptiden (Abb. 1-9 B), durch Belichtung reguliert und somit die Substrat-Bindung beeinflusst werden.



**Abb. 1-9 Photoswitch-Strategie:** (A) Schematisches Modell von scPvuII mit einem Azobenzol-Schalter nahe dem aktiven Zentrum im inaktiven (*trans*-Konfiguration des Azobenzol-Schalters induziert durch blaues Licht) und im aktiven Zustand (*cis*-Konfiguration der Azobenzol-Schalters induziert durch UV-Licht). (B) Modell der lichtinduzierten Störung der helikalen Struktur eines mit Azobenzol-modifizierten Peptids (nach Woolley *et al.*, 2005).

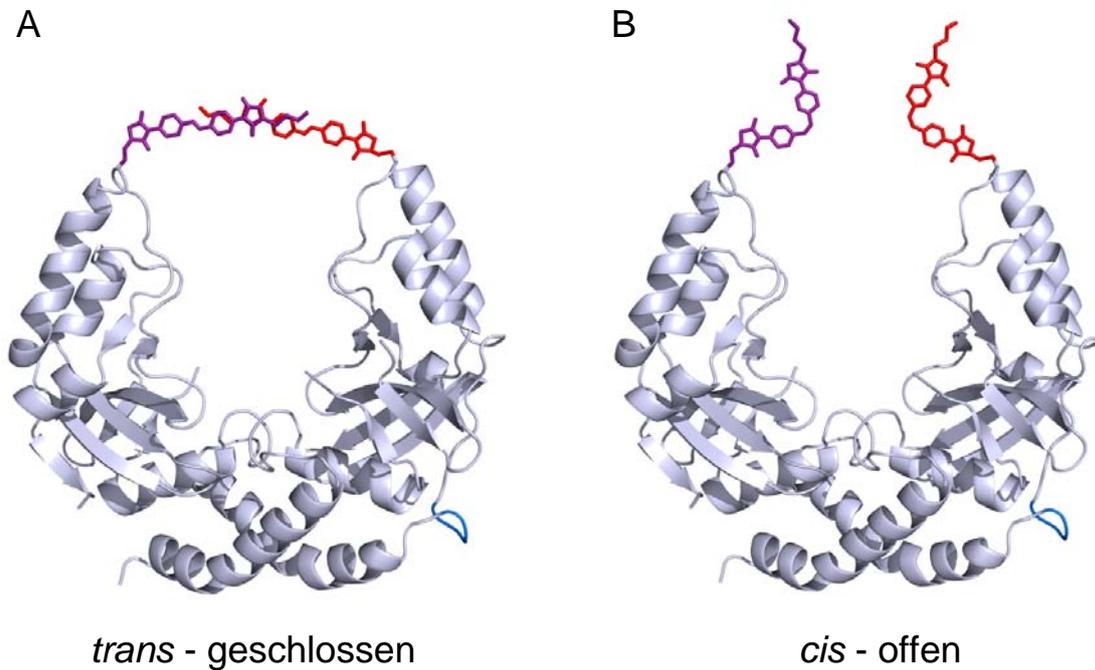
Ein wesentlicher Punkt bei der Bewertung der Erfolgsaussichten dieser Strategie ist die Frage nach der Kräfte-Bilanz. Ist die Kraft der Photoisomerisierung des Azobenzol-Schalters ausreichend, um die Konformation des modifizierten Proteins in einem aktiven Prozess zu

beeinflussen? Legt man an den Endpunkten der Phenyl-Ringe des Azobenzol-Moleküls eine äußere Kraft an, so konnte gezeigt werden, dass die Isomerisierung vom *cis*- in den *trans*-Zustand bis zu einer Obergrenze der äußeren angelegten Kraft von  $\sim 90 - 200$  pN (Nonadiabatische Simulation) (21) bzw. von  $\sim 400$  pN (AFM-Experiment) (127) durch Licht induziert werden kann. Eine mechanisch erzwungene Isomerisierung erfolgte erst bei Kräften  $> 1250$  pN (21). In ähnlichen AFM-Experimenten konnte gezeigt werden, dass für die Entfaltung einzelner Protein-Domänen eine äußere Kraft von  $\sim 150 - 300$  pN angelegt werden muss (128-130). Zudem konnte mittels kalorimetrischen Messungen bestimmt werden, dass die *trans*-Konfiguration von Azobenzol  $\sim 50$  kJ/mol stabiler ist als die *cis*-Konfiguration (131) und dass die Energie-Barriere der Umwandlung bei  $\sim 78$  kJ/mol liegt (60). Typische Werte der freien Energie der Faltung von Proteinen liegen hingegen bei  $\sim 20 - 60$  kJ/mol. Rechnet man jeweils die Werte der *cis/trans*-Isomerisierung von Azobenzol mit den Werten der Faltung/Entfaltung von globulären Proteinen gegeneinander auf, so sollte die Kraft der Isomerisierung des angehängten Azobenzol-Schalters durchaus ausreichen, um die Konformation des Zielproteins in einem aktiven Prozess zu variieren. Experimentell konnte das lichtinduzierte Entfalten der Proteinstruktur auch schon für kleine helikale Proteine (32, 45) bzw. für eine Protein-Domäne (46) gezeigt werden, die mit einem Azobenzol-Schalter modifiziert waren.

### 1.4.2 Photogate-Strategie

Bei der *Photogate*-Strategie soll die Aktivität von scPvuII durch das Anbringen von mono-funktionellen Azobenzol-Derivaten reguliert werden, die direkt am Eingang der DNA-Bindungsstelle angebracht werden. Dabei soll die Zugänglichkeit der DNA zur DNA-Bindungsstelle durch die modifizierten Azobenzol-Moleküle im *trans*-Zustand als mechanische Barriere blockiert werden (vgl. (37)). Eine Isomerisierung in die *cis*-Konfiguration soll diesen Zugang wieder freigeben. Somit sollen in dieser Strategie die katalytischen Eigenschaften des Proteins nicht verändert, sondern lediglich die DNA-Bindung durch das lichtschtbare *Photogate* reguliert werden. Die mono-funktionellen Azobenzol-Derivate werden dabei an dem Ende, das in den Zugang der DNA-Bindungsstelle reicht, mit funktionellen Gruppen versehen, wobei im Rahmen dieses Projekts Derivate mit einer Hydroxyl-, einer Carboxyl-Gruppe und einem Cystein-Rest am Ende getestet werden sollen. In einem weiteren Ansatz soll ein mono-funktionelles Azobenzol-Derivat an einem Ende mit einem 8 bp langen, palindromen Oligonukleotid versehen werden. Das Oligonukleotid besitzt dabei eine Schmelztemperatur von  $24$  °C und kann, da es an beiden Seiten des Zugangs zur DNA-Bindungsstelle nach Modifikation angebracht wird und zu sich selbst komplementär ist, einen kurzen doppelsträngigen Bereich über dem Zugang ausbilden und diesen somit definitiv

blockieren. Eine Kombination aus entsprechender Temperatur und spezifischer Belichtung soll den blockierten Zugang anschließend wieder freigeben.



**Abb. 1-10 Photogate-Strategie:** Schematisches Modell von mit mono-funktionellem Azobenzol modifizierten scPvuII (sc(C135)<sub>2</sub>\_AzoOH) im geschlossenen Zustand (*trans*-Konfiguration induziert durch blaues Licht) (A) und im offenen Zustand (*cis*-Konfiguration induziert durch UV-Licht) (B) des *Photogates*.

### 1.5 Zielsetzung dieser Arbeit

In dieser Arbeit soll untersucht werden, ob die Aktivität des Modellenzym scPvuII durch chemische Modifikation mit einem externen lichtschtaltbaren Azobenzol-Derivat durch Licht reguliert werden kann. Als „*proof-of-principle*“ soll zunächst gezeigt werden, ob es prinzipiell möglich ist, die enzymatische Aktivität durch die lichtinduzierte *cis-/trans*-Konfigurationsisomerie der kovalent mit dem Protein verbundenen Azobenzol-Schalter-Moleküle zu beeinflussen.

Zum experimentellen Nachweis dieses Konzepts sollen zum einen in der *Photoswitch*-Strategie bi-funktionelle Azobenzol-Schalter in Regionen des aktiven Zentrums und der DNA-Bindung angebracht werden, mit der Absicht, die Aktivität des Enzyms durch den mechanischen Stress, der durch die Photoisomerisierung des Schalter-Moleküls hervorgerufen wird, in einem aktiven Prozess zu beeinträchtigen. Zum anderen soll in der *Photogate*-Strategie der Zugang zur DNA-Bindungsstelle des Enzyms mit mono-funktionellen Azobenzol-Derivaten modifiziert werden, mit der Absicht, die DNA-Bindung durch eine

solche lichtschaltbare mechanische Barriere in Abhängigkeit vom Belichtungszustand zu blockieren bzw. freizugeben. Dabei sollen in beiden Konzepten verschiedene Varianten von scPvuII in einem „*trial-and-error*“-Prozess mit Azobenzol-Derivaten modifiziert und auf lichtschaltbare Effekte hin untersucht werden. Die verschiedenen Varianten sollen dabei entsprechend variiert und kombiniert werden, um einen maximalen Aktivitätsunterschied zwischen dem *cis*- und dem *trans*-Zustand des modifizierten Proteins zu erhalten. Als Endziel soll somit ein lichtschaltbares Restriktionsenzym geschaffen werden, dessen Aktivität gemäß einem „Alles-oder-Nichts“-Prinzip reversibel durch die Photoisomerisierung der kovalent mit dem Protein verbundenen Azobenzol-Schalter-Moleküle reguliert werden kann.

Die Eigenschaften eines solchen neu entwickelten lichtschaltbaren Restriktionsenzym sollen anschließend näher charakterisiert werden. Zuletzt soll evaluiert werden, welche Strategie zur Lichtschaltung die besten Ergebnisse geliefert hat und inwiefern das entsprechende Konzept auf andere Proteine übertragen werden kann.

## 2. Materialien und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Enzyme und Marker

Die verwendeten Restriktionsenzyme wurden nach Herstellerangaben mit den mitgelieferten Puffern eingesetzt und sind in Tab. 2-1 in alphabetischer Reihenfolge aufgelistet. Von den Restriktionsenzymen des Herstellers *Fermentas (St. Leon-Rot)* wurden teilweise auch die entsprechenden FastDigest™ – Versionen eingesetzt.

**Tab. 2-1** Verwendete Restriktionsenzyme:

Enzym	Erkennungssequenz	Hersteller
AgeI	5´ ...A↓CCGG T...3´ 3´ ...T GGCC↑A...5´	<i>New England Biolabs (Frankfurt)</i>
BamHI	5´ ...G↓GATC C... 3´ 3´ ...C CTAG↑C...5´	<i>Fermentas (St. Leon-Rot)</i>
Bsp68I	5´ ...TCG↓CGA...3´ 3´ ...AGC↑GCT...5´	<i>Fermentas (St. Leon-Rot)</i>
BveI	5´ ...ACCTGC(N) <sub>4</sub> ↓...3´ 3´ ...TGGACG(N) <sub>8</sub> ↑...5´	<i>Fermentas (St. Leon-Rot)</i>
ClaI	5´ ...AT↓CG AT...3´ 3´ ...TA GC↑TA...5´	<i>New England Biolabs (Frankfurt)</i>
DpnI	5´ ...GA <sup>m</sup> ↓T C...3´ 3´ ...CT ↑A <sup>m</sup> G...5´	<i>Fermentas (St. Leon-Rot)</i>
Eco32I	5´ ...GAT↓ATC...3´ 3´ ...CTA↑TAG...5´	<i>Fermentas (St. Leon-Rot)</i>
HindIII	5´ ...A↓AGCT T...3´ 3´ ...T TCGA↑A...5´	<i>Fermentas (St. Leon-Rot)</i>
KpnI	5´ ...G GTAC↓C...3´ 3´ ...C↑CATG G...5´	<i>Fermentas (St. Leon-Rot)</i>
MvaI269I	5´ ...GAATG CN↓...3´ 3´ ...CTTAC↑GN ...5´	<i>Fermentas (St. Leon-Rot)</i>
NcoI	5´ ...C↓CATG G...3´ 3´ ...G GTAC↑C...5´	<i>Fermentas (St. Leon-Rot)</i>
NdeI	5´ ...CA↓TA TG...3´ 3´ ...GT AT↑AC...5´	<i>Fermentas (St. Leon-Rot)</i>
NsbI	5´ ...TGC↓GCA...3´ 3´ ...ACG↑CGT...5´	<i>Fermentas (St. Leon-Rot)</i>
NsiI (Mph1103I)	5´ ...A TGCA↓T...3´ 3´ ...T↑ACGT A...5´	<i>Fermentas (St. Leon-Rot)</i>
ScaI	5´ ...AGT↓ACT...3´ 3´ ...TCA↑TGA...5´	<i>Fermentas (St. Leon-Rot)</i>
VspI	5´ ...AT↓TA AT...3´ 3´ ...TA AT↑TA...5´	<i>Fermentas (St. Leon-Rot)</i>

↓ und ↑: Schnittstellen der Enzyme; N = G, A, T oder C; <sup>m</sup> = methyliert

Andere verwendete Enzyme sind unter Angabe des Herstellers im Folgenden aufgelistet:

**Tab. 2-2 Verwendete andere Enzyme:**

Enzym	Hersteller
Alkalische Phosphatase (CIP)	<i>New England Biolabs (Frankfurt)</i>
Pfu DNA Polymerase	<i>Eigenherstellung</i>
T4 DNA Ligase	<i>Fermentas (St. Leon-Rot)</i>
Taq DNA Polymerase	<i>Eigenherstellung</i>

Als Größenstandards bei der gelelektrophoretischen Auftrennung von Proteinen bzw. DNA wurden folgende Marker eingesetzt.

**Tab. 2-3 Verwendete Größenstandards:**

Marker	Hersteller
PageRuler™ Unstained Protein Ladder	<i>Fermentas (St. Leon-Rot)</i>
pUC Mix Marker, 8	<i>Fermentas (St. Leon-Rot)</i>
GeneRuler™ 1kb DNA ladder	<i>Fermentas (St. Leon-Rot)</i>

### 2.1.2 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien sind unter Angabe des Herstellers in Tab. 2-4 aufgeführt. Der Reinheitsgrad beträgt jeweils *pro analysi*. Zum Ansetzen aller Puffer und Lösungen wurde Reinstwasser verwendet, das einem *Milli-Q Synthesis* Wasseraufbereitungssystem der Firma *Millipore (Schwalbach)* entnommen wurde.

**Tab. 2-4 Verwendete Chemikalien:**

Chemikalie	Hersteller	Chemikalie	Hersteller
2-Mercaptoethanol	<i>Merck (Darmstadt)</i>	Hefextrakt	<i>AppliChem (Darmstadt)</i>
2-Mercaptopropionsäure	<i>Merck (Darmstadt)</i>	Imidazol	<i>AppliChem (Darmstadt)</i>
40 % - Acrylamid/Bisacrylamid 29:1	<i>AppliChem (Darmstadt)</i>	IPTG	<i>AppliChem (Darmstadt)</i>
Agar	<i>AppliChem (Darmstadt)</i>	Isopropanol	<i>Roth (Karlsruhe)</i>
Agarose	<i>Invitrogen (Karlsruhe)</i>	Kaliumchlorid	<i>Roth (Karlsruhe)</i>
Aluminiumsulfat	<i>AppliChem (Darmstadt)</i>	Kaliumdihydrogenphosphat	<i>Merck (Darmstadt)</i>
Ammoniumperoxodisulfat	<i>Merck (Darmstadt)</i>	Kanamycinsulfat	<i>Roth (Karlsruhe)</i>
Ammoniumsulfat	<i>AppliChem (Darmstadt)</i>	Lubrol (Polyethylene-9-laurylether)	<i>Sigma (München)</i>
Ampicillin-Natriumsalz	<i>AppliChem (Darmstadt)</i>	Magnesiumchlorid	<i>Merck (Darmstadt)</i>
Bromphenolblau	<i>Merck (Darmstadt)</i>	Methanol	<i>Merck (Darmstadt)</i>
BSA	<i>Fermentas (St. Leon-Rot)</i>	Natriumacetat	<i>AppliChem (Darmstadt)</i>
Chloroform	<i>Merck (Darmstadt)</i>	Natriumcarbonat	<i>Merck (Darmstadt)</i>
Cobalt(II)-sulfat	<i>Merck (Darmstadt)</i>	Natriumchlorid	<i>AppliChem (Darmstadt)</i>

## 2. Materialien und Methoden

Coomassie Brilliant Blue G 250	<i>AppliChem (Darmstadt)</i>	Natriumhydroxid	<i>Merck (Darmstadt)</i>
Cystein (L-)	<i>Sigma (München)</i>	Natriumthiosulfat	<i>Merck (Darmstadt)</i>
di-Kaliumhydrogenphosphat	<i>Merck (Darmstadt)</i>	Ni <sup>2+</sup> -NTA-Agarose	<i>Qiagen (Hilden)</i>
DMF	<i>Merck (Darmstadt)</i>	Nickel(II)-chlorid	<i>Merck (Darmstadt)</i>
DMSO	<i>Merck (Darmstadt)</i>	Phosphorsäure	<i>Roth (Karlsruhe)</i>
dNTPs	<i>Fermentas (St. Leon-Rot)</i>	PMSF	<i>AppliChem (Darmstadt)</i>
DTE	<i>AppliChem (Darmstadt)</i>	Saccharose	<i>Merck (Darmstadt)</i>
DTT	<i>AppliChem (Darmstadt)</i>	Salzsäure	<i>Merck (Darmstadt)</i>
EDTA	<i>AppliChem (Darmstadt)</i>	SDS	<i>Roth (Karlsruhe)</i>
Essigsäure	<i>Roth (Karlsruhe)</i>	Silbernitrat	<i>Merck (Darmstadt)</i>
Ethanol	<i>Merck (Darmstadt)</i>	TEMED	<i>AppliChem (Darmstadt)</i>
Ethidiumbromid	<i>Merck (Darmstadt)</i>	Tetracyclin-Hydrochlorid	<i>AppliChem (Darmstadt)</i>
Formaldehydlösung	<i>Merck (Darmstadt)</i>	Tris	<i>AppliChem (Darmstadt)</i>
Glycerin	<i>AppliChem (Darmstadt)</i>	Trypton	<i>AppliChem (Darmstadt)</i>
Glycin	<i>AppliChem (Darmstadt)</i>		

### 2.1.3 Radiochemikalien

[ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-dATP wurde von der Firma *Hartmann Analytic (Braunschweig)* bezogen.

### 2.1.4 Kits

Es folgt eine Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Kits. Bei deren Verwendung wurde jeweils gemäß der Anleitung des Herstellers vorgegangen.

**Tab. 2-5 Verwendete Kits:**

Kit	Hersteller	Verwendung
QIAGEN® Plasmid Midi Kit (100)	<i>Qiagen (Hilden)</i>	Plasmidpräparation im Midi-Maßstab
Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System	<i>Promega (Mannheim)</i>	Plasmidpräparation im Mini-Maßstab
Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System	<i>Promega (Mannheim)</i>	Aufreinigung von PCR-Ansätzen und Restriktionsspaltungen

### 2.1.5 Puffer und Medien

Die Zusammensetzung der in dieser Arbeit verwendeten Puffer und Medien ist den folgenden Tabellen zu entnehmen.

## 2. Materialien und Methoden

**Tab. 2-6 Verwendete Puffer/Lösungen:**

Puffer/Lösungen	Zusammensetzung
10x Aktivitätspuffer PvuII	100 mM Tris/HCl, 500 mM NaCl, 10 mM DTT, 1 mg/ml BSA, pH 7,2
10x PEDL	300 mM KPi, 5 mM EDTA, 1 mM DTE, 0,1 % (v/v) Lubrol, pH 7,4
10x TPE	0,9 M Tris, 20 mM EDTA, pH 8,2 (eingestellt mit Phosphorsäure)
1x STE	10 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl, 0,1 mM EDTA, pH 8,0
50x TAE	2 M Tris, 1 M Natriumacetat, 50 mM EDTA, pH 8,0 (eingestellt mit Eisessig)
5x DNA-Auftragungspuffer	25 % (w/v) Saccharose, 1,2 % (w/v) SDS, 250 mM EDTA, 0,1 % (w/v) Bromphenolblau, pH 8,0 (eingestellt mit NaOH)
1x Laemmli-SDS-Elektrophorese-Puffer	25 mM Tris, 0,19 M Glycin, 0,1 % (w/v) SDS, pH 8,3
5x Laemmligelaufragspuffer (5x LAP)	350 mM Tris/HCl, 0,1 % (w/v) SDS, 6 % (v/v) 2-Mercaptoethanol, 30 % (v/v) Glycerin, 0,05 % (w/v) Bromphenolblau, pH 6,8
Aufschluss-/Waschpuffer	30 mM KPi, 0,01 % (v/v) Lubrol, 500 mM NaCl, 20 mM Imidazol, 1 mM PMSF, pH 7,4
Dialysepuffer	20 mM KPi, 150 mM Kaliumchlorid, 50 % (v/v) Glycerin, pH 7,4
Elutionspuffer	1 x PEDL, 500 mM NaCl, 200 mM Imidazol, 5 mM DTT
HIC-Hochsalzpuffer	10 mM Tris/HCl, 150 mM KCl, 0,8 M Ammoniumsulfat, pH 8,0
HIC-Niedrigsalzpuffer	10 mM Tris/HCl, 150 mM KCl, pH 8,0
Kolloidales Coomassie	0,1 % (w/v) Coomassie Blue-G 250, 2 % (w/v) Phosphorsäure, 5 % (w/v) Aluminiumsulfat, 10 % (v/v) Ethanol
Labeling-Puffer	50 mM KPi, 500 mM NaCl, pH 7,4
Q-Hochsalzpuffer	10 mM Tris/HCl, 2 M KCl, pH 7,5
Q-Niedrigsalzpuffer	10 mM Tris/HCl, 20 mM KCl, pH 7,5
Silberfärbung Puffer 1	50 % (v/v) Methanol, 12 % (v/v) Essigsäure, 0,019 % (v/v) Formaldehyd
Silberfärbung Puffer 2	50 % (v/v) Ethanol
Silberfärbung Puffer 3	0,8 mM Natriumthiosulfat
Silberfärbung Puffer 4	11,8 mM Silbernitrat, 0,075 % (v/v) Formaldehyd
Silberfärbung Puffer 5	0,57 M Natriumcarbonat, 0,02 mM Natriumthiosulfat, 0,05 % (v/v) Formaldehyd
Silberfärbung Puffer 6	1 % (v/v) Essigsäure

**Tab. 2-7 Verwendete Medien:**

Medium	Zusammensetzung
Luria Bertani – Medium (LB – Medium)	1 % (w/v) Pepton, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 0,5 % (w/v) NaCl, pH 7,5

### 2.1.6 Chromatographie-Säulen

Folgende Säulen kamen in dieser Arbeit zum Einsatz:

**Tab. 2-8 Verwendete Säulen:**

Säule	Hersteller	Chromatographie-Art
HiTrap™ Desalting 5 ml	GE Healthcare (München)	Gelfiltration
HiTrap™ Butyl FF 1 ml	GE Healthcare (München)	HIC
HiTrap™ Phenyl FF 1 ml	GE Healthcare (München)	HIC
Resource™ Q 1 ml	GE Healthcare (München)	Anionenaustauschchromatographie

### 2.1.7 Primer/Oligonukleotide

Es folgt eine Auflistung der verwendeten allgemeinen Klonierungsprimer unter Angabe der jeweiligen Hybridisierungsposition, der verwendeten Mutageneseprimer unter Angabe des jeweiligen Mutagenese-Markers und der verwendeten Oligonukleotide, welche alle von *biomers.net* (Ulm) bezogen wurden.

**Tab. 2-9 Allgemeine Klonierungsprimer:**

Primer	Sequenz	Position
Prizsc1-20	5'-CCACTGACACGGAACAACGGC-3'	1
PvuII_hin	5'-GAAGGCGTATTATGCATGGAATTG-3'	101
scbam_hin	5'-TACGGATCCGGAGGAAGTCACCCAGATCTAAATAAATTATTA-3'	149
PvuII_Kpn_fwd	5'-GTTGTGGTACCCAGATCTAAATAAATTATTAGAGC-3'	159
PvuII_Kpn_rev	5'-TCTGGGGTACCACAACCGGATCCGTAATCTTTGTCCC-3'	617
PvuII_Bam_rev	5'-GATGATGGTGGGATCCGTAATCTTTGTCC-3'	618
PvuII_gegen	5'-ACATTACTCACCCGTCCGCCACTC-3'	677

**Tab. 2-10 Mutageneseprimer:**

Primer	Sequenz	Marker
PvuII_D61C_rev	5'-GCGTTACATACAGCATCATTACC-3'	-
PvuII_E110C_rev	5'-GTATATAGCACATATGGCGATACCACG-3'	NdeI ↑
PvuII_E151C_rev	5'-TTGTCCCATGGCACATTACATAGC-3'	NcoI ↑
PvuII_E66C_fwd	5'-AACGCAGGTCAATGCTACGAGTTAAAATC-3'	BveI ↑
PvuII_G135C K137C_rev	5'-GGGTTGTTGATATCGCAATGGCAATCTGAATACC-3'	Eco32I ↑
PvuII_G135C_rev	5'-GGGTTGTTGATATCTTTATGGCAATCTGAATACC-3'	Eco32I ↑
PvuII_H83A_rev	5'-GATTCATGTGGTGCAGTTGAAAAACC-3'	NsbI ↑
PvuII_I74C_fwd	5'-GAGTTAAAATCAATTAATTGTGACCTCAC-3'	VspI ↑
PvuII_K137C_rev	5'-GGGTTGTTGATATCGCAATGCCCATCTG-3'	Eco32I ↑
PvuII_K147C_rev	5'-CATTACATAGCATACCGGTATTTTAGGG-3'	AgeI ↑

## 2. Materialien und Methoden

PvuII_N62C_rev	5'-CGTATTCTTGTCTGCGCAATCTACAGC-3'	NsbI ↑
PvuII_Q96C_rev	5'-CCAAGGTACGCATCGATATTTTGC-3'	ClaI ↑
PvuII_R129C_fwd	5'-AAATGGGAATGCAAATGGTATTTCAGATGG-3'	Mva1269I ↑
PvuII_S133C_fwd	5'-TGGGAATGTAAATGGTATTGTGATGGGC-3'	Mva1269I ↓
PvuII_T49C_fwd	5'-TTACAGGATTATGCGTACTACCAGGACG-3'	ScaI ↓
PvuII_V89C_fwd	5'-TGAATCCTTGCATTATCGCGAAATATAGAC-3'	Bsp68I ↑
PvuII_Y94F_rev	5'-GGTACTTGTCTGAATTCGCGATAATTACAGG-3'	Bsp68I ↑

↑ (↓) Marker-Erkennungssequenz entsteht (verschwindet) durch Mutagenese

**Tab. 2-11 Oligonukleotide:**

Oligonukleotid	Sequenz
L <sub>2</sub> up	5'-GATCCGGGTGTGGAACCGGTGGAGGTAC-3'
L <sub>2</sub> down	5'-CTCCACCGGTTCCACACCCG-3'
L <sub>3</sub> up	5'-GATCCGGGACCGGTTGTGGAGGTGGTAC-3'
L <sub>3</sub> down	5'-CACCTCCACAACCGGTCCCG-3'
L <sub>4</sub> up	5'-GATCCGGGACCGGTTTCAGGTTGTGGTAC-3'
L <sub>4</sub> down	5'-CACAACCTGAACCGGTCCCG-3'
Gate-Bam24	5'-TGGATCCA-3'-Thiol(C3)

### 2.1.8 Plasmide

In dieser Arbeit kamen folgende Plasmide zum Einsatz:

#### Priz'-wtPvuII

Dieses Expressionsplasmid trägt das Gen für das WT PvuII-Monomer (161 bp – 655 bp), welches mit der codierenden Sequenz für einen C-terminalen His-Tag (6x His) versehen ist. Das Gen steht unter Kontrolle des Lac-Operator kontrollierten *rrnB* P2 – Promotors in Kombination mit einer verbesserten Ribosomenbindungsstelle (132), wodurch eine hohe Expression erzielt wird. Das Plasmid trägt eine Ampicillin-Resistenz und besitzt eine Größe von 5875 bp.

#### Priz'-scPvuII

Dieses Expressionsplasmid trägt das Gen für scPvuII (161 bp – 1135 bp), welches durch Verbinden zweier wtPvuII-Monomer Sequenzen durch eine für den Linker der Aminosäuresequenz -GSGG- codierende Sequenz entstanden ist (110), besitzt eine Größe von 6355 bp und ist ansonsten identisch mit Priz'-wtPvuII.

### pLGM

Das Plasmid pLGM trägt das Gen für die PvuII-Methyltransferase, welches in den *low copy number* Vektor pLG339 (133) kloniert wurde (110), und eine Kanamycin-Resistenz und besitzt eine Größe von 7,2 kDa.

### pAT153 tri

Das Plasmid pAT153tri ist ein Derivat des Plasmids pBR322 (134), besitzt eine Größe von 3658 bp und trägt eine Ampicillin – Resistenz. An der Position 3656 ist eine PvuII – Spaltstelle inkloniert. Somit dient pAT153 tri als Substratplasmid für die Spaltungskinetiken von PvuII.

### **2.1.9 Stämme**

In dieser Arbeit wurde für die Amplifizierung von Plasmiden und die Expression der darauf codierten Proteine jeweils der *E. coli*-Stamm XL10-Gold der Firma *Stratagene (Amsterdam)* verwendet:

#### XL10-gold

Genotyp: Tet<sup>r</sup>  $\Delta(mcrA)183$   $\Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173$  *endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte* [F' *proAB lacI<sup>q</sup>ZDM15 Tn10* (Tet<sup>r</sup>) Amy Cam<sup>r</sup>]

### **2.1.10 Lichtquellen**

Für die Belichtung mit blauem Licht wurde eine Blaulichtquelle basierend auf Leuchtdioden (LED; 470 nm  $\pm$  10 nm; 30  $\mu$ mol Photonen m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>; *Eigenherstellung*) verwendet, für die Belichtung mit UV-Licht eine UV-Handlampe (365 nm, 6 Watt, *Bachofer (Reutlingen)*).

### **2.1.11 Azobenzol-Derivate**

Die Berechnung der Konzentration der Azobenzol-Derivate erfolgte über das Lambert-Beersche Gesetz unter Verwendung eines molaren Extinktionskoeffizienten von 22900 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> bei der Wellenlänge des entsprechenden Absorptionsmaximums in *trans* (43).

#### **2.1.11.1 Bi-funktionelle Azobenzol-Derivate**

Folgende bi-funktionellen Azobenzol-Derivate kamen in dieser Arbeit zum Einsatz:

- 3,3'-Bis(sulfo)-4,4'-bis(chloracetamido)azobenzol (59) (im Folgenden bezeichnet als AzoCl) – erhalten von Woolley, Universität Toronto (Abb. 2-1 A)

- 4,4'-Bis(iodacetamido)azobenzol (55) (im Folgenden bezeichnet als AzoIod) – erhalten von Le Thi Hien / Oretskaya / Kubareva, Lomonossov Universität Moskau (Abb. 2-1 B)
- 4,4'-Bis(maleimido)azobenzol (43) (im Folgenden bezeichnet als AzoMal; modifizierte Varianten werden mit der Appendix „\_Azo“ versehen) – erhalten von Le Thi Hien / Oretskaya / Kubareva, Lomonossov Universität Moskau (Abb. 2-1 C)

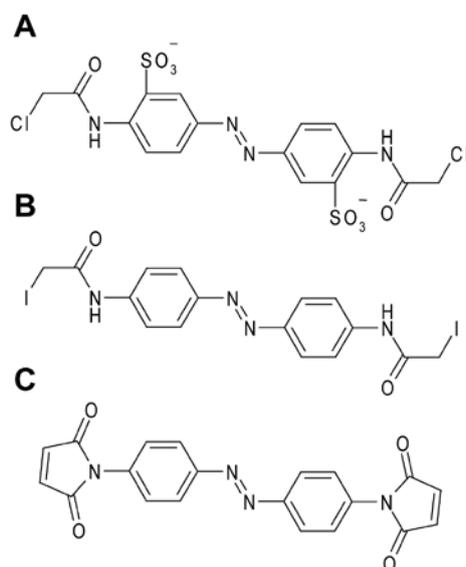


Abb. 2-1 Darstellung der verwendeten bi-funktionellen Azobenzol-Derivate (A) AzoCl, (B) AzoIod, (C) AzoMal

Tab. 2-12 Eigenschaften der bi-funktionellen Azobenzol-Derivate:

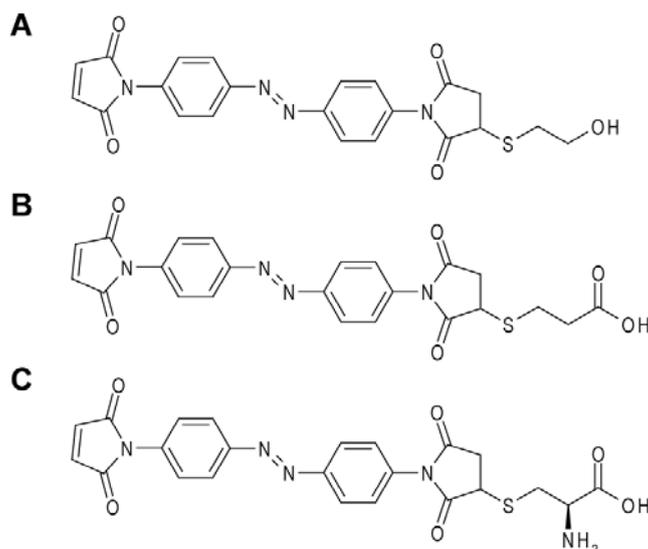
Azobenzol-Derivat	Absorptionsmaximum ( <i>trans</i> )	MG / (g/mol)	Abstand ( <i>trans</i> )	Abstand ( <i>cis</i> )
AzoCl	365 nm	391,3	~ 17 - 19 Å	~ 6 - 15 Å
AzoIod	375 nm	546,2	~ 17 - 19 Å	~ 6 - 15 Å
AzoMal	348 nm	372,3	~ 17 Å	~ 5 - 12 Å

### 2.1.11.2 Mono-funktionelle Azobenzol-Derivate

Folgende mono-funktionellen Azobenzol-Derivate kamen in dieser Arbeit zum Einsatz:

- 4-Maleimido-4'-[2-(2-Hydroxyethylthio)succinimido]azobenzol (135) (im Folgenden bezeichnet als AzoOH) – erhalten von Le Thi Hien / Oretskaya / Kubareva, Lomonossov Universität Moskau (Abb. 2-2 A)

- 4-Maleimido-4'-[2-(2-Carboxyethylthio)succinimido]azobenzol (135) (im Folgenden bezeichnet als AzoCOOH) – erhalten von Le Thi Hien / Oretskaya / Kubareva, Lomonossov Universität Moskau (Abb. 2-2 B)
- 4-Maleimido-4'-[2-((R)-2-Amino-2-Carboxyethylthio)succinimido]azobenzol (im Folgenden bezeichnet als AzoCys) – erhalten von Le Thi Hien / Oretskaya / Kubareva, Lomonossov Universität Moskau (Abb. 2-2 C)



**Abb. 2-2** Darstellung der verwendeten mono-funktionellen Azobenzol-Derivate (A) AzoOH, (B) AzoCOOH, (C) AzoCys

**Tab. 2-13** Eigenschaften der mono-funktionellen Azobenzol-Derivate:

Azobenzol-Derivat	Absorptionsmaximum ( <i>trans</i> )	MG / (g/mol)	Länge ( <i>trans</i> )	Länge ( <i>cis</i> )
AzoOH	342	450,5	~ 20 - 22 Å	~ 11 - 15 Å
AzoCOOH	342	478,5	~ 21 - 23 Å	~ 12 - 16 Å
AzoCys	342	493,5	~ 21 - 23 Å	~ 12 - 16 Å

## 2.2 Mikrobiologische Methoden

Alle mikrobiologischen Arbeiten fanden zur Vermeidung von Kontaminationen unter sterilen Bedingungen statt. Verwendete Materialien, Lösungen und Medien wurden vor dem Gebrauch für 30 min bei 120 °C und 2000 hPa autoklaviert. Die Arbeiten wurden an einer Sterilbank durchgeführt.

### 2.2.1 Nährmedien zur Kultivierung von *E.coli*

Die Anzucht von *E.coli* erfolgte generell in LB-Medium. Zur Kultivierung und Selektion in Flüssig-Selektivmedien wurden vor dem Gebrauch die entsprechenden Antibiotika zugesetzt (Zielkonzentrationen: Ampicillin 75 µg / ml, Tetracyclin 10 µg / ml, Kanamycin 25 µg / ml). Zur Kultivierung und Selektion auf Festmedium wurden dem LB-Medium Bacto-Agar (1,5 % (w/v)) und die entsprechenden Antibiotika zugegeben (Zielkonzentrationen: Ampicillin 100 µg / ml, Tetracyclin 10 µg / ml, Kanamycin 25 µg / ml) und zum Erhalt von Selektivagarplatten in Petrischalen gegossen.

### 2.2.2 DNA-Transformation von *E. coli*

Zum Einschleusen fremder DNA in *E. coli* – Zellen über die Methode der Elektrottransformation müssen diese Zellen dafür zunächst kompetent gemacht werden. Da bei der Elektroporation die Membranen der Zellen mit einem kurzen Hochspannungsimpuls permeabel gemacht werden, wodurch externe DNA aus dem umgebenden Medium in die Zellen aufgenommen werden kann, müssen sich die Zellen in einem möglichst salzfreien Milieu befinden.

#### 2.2.2.1 Herstellung kompetenter Zellen für die Elektrottransformation

Für die Herstellung elektrokompenter Zellen für die Transformation von PvuII-Expressionsplasmiden werden 2 x 500 ml Flüssig-Selektivmedium mit je 10 ml einer ü.N. - Kultur XL10-gold pLGM angeimpft, nach Erreichen einer OD<sup>600</sup> von 0,7 für 30 min auf Eis inkubiert und anschließend bei 4 °C und 3600 g abzentrifugiert. Der Überstand wird abgegossen und das Zellpellet nacheinander mit 250 ml, 150 ml bzw. 20 ml eiskaltem 10%igen Glycerin gewaschen und anschließend erneut abzentrifugiert. Die so gewaschenen Zellen werden nun in 4 ml 10%iger Glycerinlösung resuspendiert, in 80 µl Aliquots schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

#### 2.2.2.2 Elektrottransformation

Für die Elektrottransformation werden 50 µl elektrokompenter Zellen auf Eis aufgetaut und mit 1 - 200 ng salzfreier DNA gemischt. Der Ansatz wird in eine Elektroporationsküvette pipettiert und in dem Elektroporator einem Hochspannungsimpuls von 2500 V bei einer Kapazität von 25 µF und einem Widerstand von 200 Ohm ausgesetzt. Anschließend wird der Ansatz in 1 ml LB-Medium aufgenommen und 1 h bei 37 °C inkubiert. Die Zellen werden

durch Zentrifugation für 5 min bei 1100 x g pelletiert, in 100 µl LB-Medium aufgenommen und anschließend auf Selektivagarplatten ausplattiert und ü.N. bei 37 °C inkubiert.

### **2.3 Molekularbiologische Methoden**

#### **2.3.1 Agarosegelelektrophorese**

Die elektrophoretische Untersuchung von doppelsträngiger DNA in einem Größenbereich von 250 bis etwa 20000 bp erfolgt durch Agarosegelelektrophorese, wobei die DNA Fragmente entsprechend ihrer Größe horizontal aufgetrennt werden. Dazu werden die DNA-Proben mit DNA-Auftragspuffer versetzt und in einem 1 %igen Agarosegel (in 1x TAE) unter Verwendung von 1x TAE als Laufpuffer durch Elektrophorese bei 10 V/cm für 1 h aufgetrennt. Daraufhin wird das Gel in Ethidiumbromidlösung (0,1 µg/ml) inkubiert. Der Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid bindet durch Interkalation zwischen die hydrophoben Basen der DNA spezifisch an doppelsträngige DNA, wodurch die DNA-Banden im Gel beim Betrachten unter UV-Licht sichtbar gemacht werden. Anschließend wird das Gel mit Hilfe eines Geldokumentationssystems dokumentiert.

#### **2.3.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

Kleinere DNA-Moleküle (< 1000 bp), vor allem PCR-Produkte, können durch die Methode der Polyacrylamid-Gelelektrophorese der Größe nach vertikal aufgetrennt werden. Dazu werden die DNA-Proben mit DNA-Auftragspuffer versetzt und in einem 6 %igen Polyacrylamid-Gel (in 1x TPE; Acrylamid : Bisacrylamid = 29 : 1) unter Verwendung von 1x TPE als Laufpuffer durch Elektrophorese bei 27 V/cm für 40 min aufgetrennt. Anschließend wird das Gel entsprechend der Agarosegelelektrophorese in Ethidiumbromidlösung (0,1 µg/ml) gefärbt und unter UV-Licht mit Hilfe des Geldokumentationssystems dokumentiert.

#### **2.3.3 Plasmid-DNA-Isolierung**

Die Isolierung von Plasmid DNA aus *E. coli* Zellen wurde mit Hilfe von Plasmid-Isolierungs-Kits durchgeführt, deren Wirkungsprinzip auf dem Prinzip der alkalischen Lyse (136) beruht. Je nach Anwendung findet entweder eine Plasmid-Mini-Präparation oder eine Plasmid-Midi-Präparation statt, wobei jeweils entsprechend den Herstellerangaben verfahren wird. Für geringe Mengen an Plasmid findet eine Plasmid-Mini-Präparation (6 ml *E. coli* Kultur) mit dem *Wizard<sup>®</sup> Plus SV Minipreps DNA Purification System* - Kit der Firma *Promega (Mannheim)* statt. Für größere Mengen an Plasmid-DNA wird eine Plasmid-Midi-Präparation

(250 ml *E. coli* Kultur) mit Hilfe des *QIAGEN*<sup>®</sup> *Plasmid Midi Kit (100)* der Firma *Qiagen (Hilden)* durchgeführt.

### 2.3.4 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgt durch photometrische Messung am NanoDrop (*Peqlab Biotechnologie GmbH (Erlangen)*) im Wellenlängenbereich von 220 bis 320 nm. Aus dem Absorptionsmaximum von DNA bei 260 nm kann die DNA-Konzentration ermittelt werden, wobei für hochmolekulare DNA ein  $A^{260\text{ nm}}$  - Wert von 1 genau 50 ng DNA /  $\mu\text{l}$  entspricht. Der Reinheitsgrad von DNA lässt sich durch das Verhältnis der Extinktion bei 260 nm und 280 nm bestimmen.  $A^{260\text{ nm}}/A^{280\text{ nm}}$  sollte für reine DNA idealerweise zwischen 1,6 und 1,8 liegen. Kleinere Werte deuten auf eine Verunreinigung mit Proteinen hin, größere Werte auf Verunreinigung mit RNA.

### 2.3.5 Restriktionsspaltung von DNA

In dieser Arbeit wurden sowohl präparative als auch analytische Restriktionsspaltungen von DNA durchgeführt. Bei der präparativen Restriktionsspaltung wurden Restriktionsenzyme als Werkzeuge für die Klonierung neuer DNA Fragmente eingesetzt. Dazu wurden typischerweise 3  $\mu\text{g}$  Plasmid-DNA bzw. 2  $\mu\text{g}$  PCR-amplifizierter DNA mit 30 - 50 *units* des entsprechenden Restriktionsenzym in einem Volumen von 40 - 50  $\mu\text{l}$  für 2 - 3 h bei der entsprechenden Temperatur inkubiert, wobei bei der Wahl der Puffer und der Inkubationstemperatur den Herstellerempfehlungen gefolgt wurde. Die gespaltenen DNA-Fragmente wurden anschließend über das *Wizard*<sup>®</sup> *SV Gel and PCR Clean-Up System* - Kit der Firma *Promega (Mannheim)* aufgereinigt. Bei der analytischen Restriktionsspaltung kann die Richtigkeit neu generierter Plasmide oder PCR-Produkten durch spezifische Spaltung mit dem entsprechenden Restriktionsenzym bestimmt werden. Dazu werden typischerweise 200 - 400 ng DNA mit 10 - 20 *units* Restriktionsenzym in einem Volumen von 20  $\mu\text{l}$  für 1 h nach Herstellerangaben inkubiert und anschließend die Spaltprodukte durch Agarose- bzw. Polyacrylamid-Gelelektrophorese analysiert.

### 2.3.6 Ligation von DNA - Fragmenten

Für die enzymatische Ligation von DNA-Fragmenten wird T4 DNA Ligase verwendet, welches die Bildung einer Phosphodiester-Bindung zwischen einem 5'-Phosphat und einem 3'-Hydroxyl-Terminus von doppelsträngiger DNA mit kompatiblen Enden katalysiert. Dazu werden ~ 150 ng des Vektor und ~ 50 ng des kompatiblen Inserts mit 1 *unit* T4 DNA Ligase nach Herstellerangaben ü.N. bei 16 °C inkubiert.

### 2.3.7 Ethanol-Fällung von DNA

Zur Fällung von DNA wird der entsprechende Ansatz mit 1/10 Vol. 3 M Natriumacetat pH 5,0 und 3 Vol. EtOH versetzt. Durch Zentrifugation bei 20000 x g für 30 min bei 4 °C wird die DNA gefällt. Der Überstand wird verworfen und das Pellet mit 3 Vol. eisgekühltem 70 % EtOH gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wird der Überstand wiederum abgenommen und das Pellet getrocknet. Anschließend wird das Pellet in 10 µl Wasser aufgenommen.

### 2.3.8 PCR

Mit der 1983 von Kary Mullis entwickelten Methode der *polymerase chain reaction* (PCR), ist es möglich, doppelsträngige DNA wiederholt zu replizieren und somit zu amplifizieren (137). Ein von Hin- und Rück-Primer adressierter Bereich einer DNA-Matrize kann somit durch eine hitzebeständige Polymerase gezielt amplifiziert werden. Für sequenzexakte Amplifizierungen kommt die Pfu-Polymerase (aus *Pyrococcus furiosus*; 3'-5' Exonukleaseaktivität;  $T^{opt} = 68\text{ °C}$ ; Polymerisationsrate ~ 500 Nukleotide pro Minute) zum Einsatz, für alle anderen Anwendungen ist die Genauigkeit der Taq-Polymerase (aus *Thermus aquaticus*; 5'-3' Exonukleaseaktivität;  $T^{opt} = 72\text{ °C}$ ; Polymerisationsrate ~ 1000 Nukleotide pro Minute) ausreichend. Die Amplifikation gliedert sich in drei Schritte. Zunächst werden die doppelsträngigen DNA-Moleküle durch einen Temperaturanstieg auf 94 °C denaturiert und somit voneinander getrennt. Durch Abkühlung auf 52 °C kommt es zum *Annealing* der Primer, d.h. sie lagern sich an den komplementären Stellen an und markieren so den Replikationsstart. Die Replikation findet sodann bei einer Temperatur von 72 °C statt. Die drei Phasen werden ca. 20 - 30-mal wiederholt, wodurch es zu einer exponentiellen Amplifizierung des durch die Primer markierten DNA-Bereichs kommt. Die *Annealing*-Temperatur ist so gewählt, dass sie etwa 2-3 °C unter der Primer-*Annealing*-Temperatur liegt. Abweichungen davon können zu mangelnder oder unspezifischer Primerbindung führen. Die *Annealing*-Temperatur der Primer lässt sich nach deren G/C- bzw. A/T-Gehalt ermitteln (138). Dabei gilt annähernd:  $T_M = (G+C) \times 4\text{ °C} + (A+T) \times 2\text{ °C}$ .

Nach erfolgter PCR wird 1/10 Vol. des Ansatzes mit Hilfe der Polyacrylamid-Gelelektrophorese auf Richtigkeit des PCR-Produktes überprüft und die amplifizierte DNA mit dem *Wizard<sup>®</sup> SV Gel and PCR Clean-Up System* - Kit der Firma *Promega (Mannheim)* aufgereinigt.

Im Folgenden sind der Standard-PCR-Ansatz und das Standard-PCR-Programm dargestellt:

• Standard-PCR-Ansatz (50 µl):	• Standard-PCR-Programm:
100 ng DNA-Matrize	94 °C 2 min
400 nM 5' Primer	92 °C 45 sek
400 nM 3' Primer	52 °C 30 sek
200µM dNTPs	72 °C 45 sek
1x Polymerase Puffer	72 °C 5 min
1 U Pfu/Taq-Polymerase	4 °C Pause

} ~ 20 - 30-mal

### 2.3.9 Mutagenese von scPvuII-Varianten

Da die *single-chain* Variante von PvuII durch Verbinden zweier identischer Gensequenzen von PvuII durch eine kurze, für den Linker (-GSGG-) codierende Sequenz geschaffen wurde (110), ist eine zielgerichtete Mutagenese (139) basierend auf Einführen der Mutationen über PCR aufgrund der mehrfachen *Annealing*-Möglichkeit nur schwer auszuführen. Zur Einführung von Mutationen in scPvuII wurden daher zunächst die entsprechenden Mutationen in den WT PvuII über zielgerichtete Mutagenese eingeführt und anschließend die bestehende Gensequenz der N- bzw. C-terminalen Hälfte von scPvuII jeweils durch die die Mutationen tragende WT Sequenz ersetzt. Auf diese Art und Weise können somit scPvuII-Varianten geschaffen werden, die unterschiedliche Substitutionen in der N- bzw. C-terminalen Hälfte besitzen.

#### 2.3.9.1 Zielgerichtete Mutagenese im WT PvuII

Für den zielgerichteten Austausch von Aminosäuren in dem WT PvuII wird das entsprechende Codon auf DNA-Ebene durch ein für die Aminosäure-Substitution codierendes Triplet ersetzt (139). Dazu wird ein Mutagenese-Primer gewählt, der die gewünschte Mutation enthält und in den zusätzlich eine Restriktionsschnittstelle eingeführt wurde, die später als Marker für die Mutation genutzt werden kann (siehe Tab. 2-10). In Kombination mit einem zweiten allgemeinen Klonierungsprimer, so dass ein ca. 100 - 500 bp großes DNA-Stück für die PCR flankiert wird, wird eine Standard-PCR unter Verwendung der Pfu-Polymerase durchgeführt, wobei als Matrize das Plasmid Priz'-wtPvuII dient. Durch diese PCR entsteht als Produkt ein DNA-Fragment, das die gewünschte Mutation in beiden Strängen enthält, der sog. Megaprimer. Dieser wird mit Hilfe des *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* - Kit der Firma *Promega (Mannheim)* aufgereinigt, durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese auf die richtige Länge hin überprüft und einer DNA-Konzentrationsbestimmung unterzogen. Im nächsten Schritt findet eine *rolling circle* – PCR statt, bei der wiederum das Plasmid Priz'-wtPvuII als Matrize dient und der Megaprimer, dessen beide Stränge als 5' und 3'- Primer fungieren, alleine als Polymerisierungsstartpunkt

in beide Richtungen dient. Dabei ist die Polymerisierungszeit länger gewählt, so dass das gesamte Plasmid in beide Richtungen repliziert wird. Statt zweier Primer wird in der *rolling circle* – PCR somit 10 µl Megaprimer eingesetzt, als Polymerase dient die Pfu-Polymerase. Das Programm ist wie folgt abgeändert: Nach 1,5 min Zeit für die Denaturierung bei 95 °C, erfolgt eine 20-fache Wiederholung des Zyklus von 10 min bei 68 °C für *Annealing* + Polymerisation und 30 sek bei 95 °C für die Denaturierung. Danach schließt sich einmalig für 20 min bei 68 °C ein langer *Annealing*- / Polymerisationszyklus an, der sicherstellt, dass die neu synthetisierten DNA-Fragmente auch vollständig sind. Der PCR-Ansatz enthält nun immer noch die ursprüngliche Matrize, die keine Mutation enthält. Falls diese mit transformiert werden würde, würde man falsch positive Klone erhalten. Um dies zu verhindern, wird der fertige *rolling circle* – PCR – Ansatz mit DpnI verdaut. Dieses Restriktionsenzym aus *Streptococcus pneumoniae* spaltet spezifisch methylierte G<sup>m</sup>ATC-Sequenzen, die auf Plasmiden aus *dam*<sup>+</sup> - *E. coli* Zellen vorkommen. Somit wird die Plasmid-DNA-Matrize gespalten, die neu amplifizierten Vektoren jedoch nicht. Die so erhaltenen mutierten Plasmide werden mit Ethanol gefällt und in *E. coli* XL10-gold pLGM elektrotransformiert.

Die gewachsenen Klone werden im Folgenden einer Kolonie - PCR unter Verwendung der Taq-Polymerase und der Primer PvuII\_hin und PvuII\_gegen unterzogen, welche dem Standard-PCR-Programm entspricht. Der Klon kann dabei direkt eingesetzt werden, denn durch das Erhitzen auf 94 °C am Anfang wird die enthaltene DNA freigesetzt und dient als Matrize. Anschließend werden die PCR-Produkte einer analytischen Spaltung an der eingeführten Restriktionsmarker-Stelle unterzogen, wodurch richtige Klone identifiziert werden können. Von den richtigen Klonen wird eine Plasmid-Mini-Präparation durchgeführt. Die gewonnenen Plasmide werden einer analytischen Spaltung unterzogen und die jeweiligen Fragmente bezüglich ihrer Länge mit dem WT verglichen. Daraufhin wird die DNA-Sequenz durch Sequenzierung (*Eurofins MWG Operon (Ebersberg)*) definitiv bestätigt. Falls gleichzeitig eine Cystein-Mutation an zwei verschiedenen Stellen eingeführt werden soll, werden entsprechend für die Herstellung des Megaprimers gleich zwei Primer, die die jeweiligen Mutationen enthalten, verwendet. Falls mehrere Mutationen nacheinander eingebracht werden sollen, dient das Plasmid mit der ersten Mutation als Matrize für eine weitere Mutationsrunde.

### **2.3.9.2 Klonieren der N-terminalen Hälfte von scPvuII**

Für den Austausch der N-terminalen Gensequenz eines bestehenden scPvuII - Gens mit einer entsprechenden mutierten Sequenz wird der entsprechende Vektor von Priz'-scPvuII mit NsiI

und BamHI präparativ gespalten, um die N-terminale Gensequenz auszuschneiden, und mit alkalischer Phosphatase behandelt, wodurch die entstandenen 5'-Phosphatreste entfernt werden und somit die Autoligation des Vektors verhindert wird. In diesen offenen Vektor wird als Insert das entsprechende PCR-Produkt ligiert, welches durch PCR mit dem Primerpaar Prizsc1-20 und PvuII\_Bam\_rev auf dem entsprechenden Vektor von WT PvuII gebildet und anschließend mit NsiI und BamHI gespalten wurde. Das entstandene Ligationsprodukt wird in XL10-gold pLGM elektrotransformiert und entstandene Klone entsprechend der zielgerichteten Mutagenese gescreent.

### **2.3.9.3 Klonieren der C-terminalen Hälfte von scPvuII**

Für den Austausch der C-terminalen Gensequenz eines bestehenden scPvuII - Gens mit einer mutierten Sequenz wird der entsprechende Vektor von Priz'-scPvuII mit BamHI und HindIII präparativ gespalten, um die C-terminale Gensequenz auszuschneiden, und mit alkalischer Phosphatase behandelt. In diesen offenen Vektor wird als Insert das entsprechende PCR-Produkt ligiert, welches durch PCR mit dem Primerpaar scbam\_hin und PvuII\_gegen auf dem entsprechenden Vektor von WT PvuII gebildet und anschließend mit BamHI und HindIII gespalten wurde. Das entstandene Ligationsprodukt wird in XL10-gold pLGM elektrotransformiert und entstandene Klone entsprechend der zielgerichteten Mutagenese gescreent.

### **2.3.9.4 Klonieren von Linker-Variationen von scPvuII**

Für das Einbringen von Linker-Variationen in scPvuII wurde zunächst der bestehende, vier Aminosäuren lange Linker (-GSGG-) (110) durch den Linker L<sub>1</sub> (-GSGC-) ersetzt. Dazu wurde der Vektor Priz'-scPvuII mit NsiI und HindIII präparativ gespalten, mit alkalischer Phosphatase behandelt und zugleich mit zwei Inserts ligiert. Das erste Insert wurde durch PCR mit dem Primerpaar Prizsc1-20 und PvuII\_Kpn\_rev auf dem WT PvuII - Gen gebildet, mit NsiI und KpnI präparativ gespalten und enthält am 3'-Terminus die für den Linker<sub>1</sub> codierende Sequenz und ein KpnI kompatibles Ende. Das zweite Insert entstand durch PCR mit dem Primer PvuII\_Kpn\_fwd und PvuII\_gegen auf dem WT PvuII - Gen und anschließender Spaltung mit KpnI und HindIII, wodurch ein KpnI kompatibles Ende am 5'-Terminus gebildet wurde. Das entstandene Ligationsprodukt wird analog elektrotransformiert und gewachsene Klone gescreent. Durch diese erste Klonierung wurde somit der Linker L<sub>1</sub> eingeführt und eine direkt an die DNA-Sequenz des Linkers anschließende, in Priz'-scPvuII nur einmal vorkommende KpnI-Schnittstelle eingeführt, was zugleich den für die Aktivität

von scPvuII unbedeutenden Aminosäureaustausch am „ursprünglichen N-terminalen Ende“ der C-terminalen Hälfte von scPvuII von S2\* zu G2\* und H3\* zu T3\* zur Folge hat.

Für weitere Linker-Variationen wurde der Vektor dieser neu gebildeten L<sub>1</sub> - Variante von scPvuII mit BamHI und KpnI gespalten, um die Linkersequenz auszuschneiden, und mit einem kurzen Insert ligiert, welches die neue Linkersequenz trägt und durch *Annealing* der Oligos L<sub>(2-4)</sub> up mit L<sub>(2-4)</sub> down entstand. Das entstandene Ligationsprodukt wird analog elektrotransformiert und gewachsene Klone gescreent. Durch diesen Klonierungsschritt wurden somit die 8-Aminosäuren langen Linker-Varianten L<sub>2</sub> (-GSGCGTGG-), L<sub>3</sub> (-GSGTGCGG-) und L<sub>4</sub> (-GSGTGSGC-) eingeführt.

### 2.4 Biochemische Methoden

#### 2.4.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die elektrophoretische Untersuchung von Proteinen erfolgt durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) (140), wobei die Proteine entsprechend ihrer Größe vertikal aufgetrennt werden. Dazu werden die Proteinproben mit Laemmligelauftragspuffer versetzt, für 1 min bei 95 °C inkubiert (bei Proteinproben mit Azobenzol-Modifikation für 3 min bei 60 °C) und in einem diskontinuierlichen Gelsystem (15 %iges Trenngel pH 8,8 und 6 %iges Sammelgel pH 6,8) unter Verwendung von 1x Laemmli-SDS-Elektrophorese-Puffer bei 27 V/cm für 1 h elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wird das Gel entweder einer Färbung durch Kolloidales Coomassie oder einer Silberfärbung unterzogen und durch ein Geldokumentationssystem dokumentiert.

##### 2.4.1.1 Coomassie - Färbung

Für die Färbung von Proteingelen mit kolloidalem Coomassie (141), wird das Gel dreimal für 5 min mit warmen Wasser gewaschen, für > 1 h mit kolloidalem Coomassie gefärbt und anschließend für 5 min mit Wasser gespült.

##### 2.4.1.2 Silberfärbung

Für die Silberfärbung von Proteingelen (142) wird das Gel für 1 h mit Puffer 1 fixiert und für 20 min mit Puffer 2 gewaschen. Nach Vorbehandlung mit Puffer 3 für 1 min und anschließendem Waschen mit Wasser für dreimal 20 sek wird das Gel für 20 min in der Färbelösung (Puffer 4) inkubiert, für zweimal 20 sek mit Wasser gewaschen und die Proteinbanden durch Entwickeln in Puffer 5 sichtbar gemacht. Nach ausreichend intensiver Färbung der Proteinbanden wird die Färbung durch Puffer 6 abgestoppt.

### 2.4.2 Expression und Aufreinigung von Proteinen

Da PvuII als Restriktionsenzym bei Überexpression in *E. coli* auch die genomische bakterielle DNA schneiden würde und somit toxisch für die Zelle wäre, erfolgt die Expression in Anwesenheit der PvuII - Methyltransferase, welche PvuII - Erkennungssequenzen spezifisch methyliert und somit vor der Spaltung durch PvuII schützt. Daher wird das jeweilige PvuII - Expressionsplasmid in den Stamm XL10-gold, welches das für die PvuII-Methyltransferase codierende Plasmid pLGM bereits enthält, co-transformiert.

Von den verschiedenen Varianten von scPvuII / PvuII werden jeweils 500 ml – LB-Medium, welchem Ampicillin, Kanamycin und Tetracyclin zugegeben wurde, mit je 10 ml einer frischen ü.N. - Kultur angeimpft und bei 37 °C inkubiert. Nach Erreichen einer Zelldichte von 0,7 OD<sup>600</sup>, erfolgt die Induktion der Expression der PvuII – Varianten durch den Zusatz von 1 mM IPTG für 3 h bei 37 °C. Anschließend werden die Zellen abzentrifugiert (3600 x g, 4 °C, 15 min), mit 50 ml eisgekühlten 1x STE - Puffer gewaschen, erneut abzentrifugiert und schockgefroren bei -18 °C aufbewahrt. Die Proteinaufreinigung erfolgt daraufhin über Affinitätschromatographie mit Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose über den C-terminalen His-Tag (6x Histidin) aller PvuII - Varianten bei 4° C. Dazu werden die Zellen zunächst in 40 ml Aufschluss-/Waschpuffer resuspendiert, durch Ultraschall (5-mal 30 sek, *Sonifier 250, Branson (Danbury)*) aufgeschlossen und anschließend zentrifugiert (31000 x g, 4 °C, 30 min). Der klare Überstand, welcher das lösliche PvuII enthält, wird mit 700 µl Ni-NTA-Agarose (entspricht 350 µl *beads*) für 1 h „rollend“ inkubiert. Der Ansatz wird sodann zur Pelletierung der Ni-NTA-Agarose zentrifugiert (130 x g, 4 °C, 5 min) und dreimal mit 50 ml Aufschluss-/Waschpuffer im Batch-Modus gewaschen und erneut zentrifugiert. Im Anschluss erfolgt die Elution des gebundenen Proteins durch dreimalige Zugabe von 1 ml Elutionspuffer mittels Imidazol (200 mM). Die Elutionsfraktionen mit der höchsten Proteinkonzentration werden vereinigt und ü.N. gegen Dialysepuffer dialysiert. Die so aufgereinigte scPvuII / PvuII - Variante kann nun bei -18 °C gelagert werden.

### 2.4.3 Bestimmung der Protein-Konzentration

Die Bestimmung der Protein-Konzentration erfolgt durch photometrische Messung am NanoDrop (*Peqlab Biotechnologie GmbH (Erlangen)*). Gemessen wird die Extinktion bei 280 nm gegen den vorliegenden Puffer. Bei dieser Wellenlänge absorbieren die im Protein enthaltenen aromatischen Tryptophan- und Tyrosin-Reste. Der molare Extinktionskoeffizient (143) kann mit Hilfe der Beziehung  $\epsilon_{\text{Protein}}^{280\text{nm}} = n \times \text{Trp} \times 5500 + n \times \text{Tyr} \times 1490 + n \times \text{Cys-S-S-Cys} \times 125 [M^{-1} \text{ cm}^{-1}]$  berechnet werden, wodurch man für scPvuII einen

Extinktionskoeffizienten  $\epsilon^{280\text{nm}}$  von  $73800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  erhält. Somit kann über das Lambert-Beersche-Gesetz aus  $A^{280\text{nm}}$  und  $\epsilon^{280\text{nm}}$  die Proteinkonzentration wie folgt bestimmt werden:  $c = A^{280\text{nm}} / (\epsilon^{280\text{nm}} * d)$ ; wobei  $d = 1 \text{ cm}$ . Für scPvuII gilt somit, dass ein  $A^{280\text{nm}}$  - Wert von 1 einer Proteinkonzentration von  $13,5 \mu\text{M}$  entspricht.

Falls die Proteinkonzentration insbesondere nach Azobenzol-Modifikation und den anschließenden Aufreinigungsschritten zu gering für photometrische Messungen ist, erfolgt eine Abschätzung der Konzentration über SDS-Gelelektrophorese mit Silberfärbung anhand des Vergleichs der Bandenintensität der unbekanntes Probe mit den Bandenintensitäten von scPvuII bekannter Konzentration als Referenz.

### 2.4.4 Aktivitätstest von scPvuII

Die Aktivität von scPvuII (PvuII) und deren Varianten wird durch eine Spaltungskinetik des Substratplasmids pAT153 tri bestimmt. scPvuII spaltet pAT153 tri an einer Stelle, wodurch das überspiralisierte Plasmid (*supercoil*) über das Zwischenprodukt des offenen Rings (*open circle*), bei dem ein Strang geschnitten wurde, in das linearisierte Produkt (*linear*) übergeht. Das Fortschreiten der Linearisierung von pAT153 tri ist somit ein Ausmaß für die Aktivität von scPvuII. Dazu werden Ansätze mit  $4 \text{ nM}$  Substratplasmid in einem Volumen von  $20 \mu\text{l}$  zusammen mit  $1\times$  Aktivitätspuffer PvuII und  $10 \text{ mM}$   $\text{MgCl}_2$  vorbereitet, die Reaktion durch Zugabe verschiedener Enzymkonzentrationen ( $5 \mu\text{M}$  -  $0,05 \text{ nM}$ ) gestartet und fortan bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  für  $10 \text{ min}$  inkubiert. Der Ansatz wird anschließend durch Zugabe von DNA-Auftragspuffer gestoppt und durch Agarosegelelektrophorese analysiert. Über Quantifizierung der Bandenintensitäten kann der relative Anteil an linearisiertem Substratplasmid ermittelt werden (rel. Anteil (*linear*) = Intensität (*linear*) / Summe Intensitäten (*supercoil* + *open circle* + *linear*)). Im Vergleich zu der Aktivität von scPvuII kann somit die relative Aktivität neuer scPvuII Varianten bestimmt werden.

### 2.4.5 Chromatographische Trennverfahren

Sämtliche chromatographischen Schritte dieser Arbeit zur Aufreinigung von verschiedenen Azobenzol-modifizierten Protein-Proben wurden auf einem Äktapurifizier 10 – FPLC Chromatographie-System (*GE Healthcare (München)*) bei  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  durchgeführt, welches u.a. eine Detektion der eluierenden Probe bei  $280 \text{ nm}$  (Protein),  $260 \text{ nm}$  (DNA) und  $360 \text{ nm}$  (Azobenzol) erlaubt.

Das Entsalzen und Abtrennen kleiner Moleküle von Proteinproben erfolgt über Gelfiltration unter Benutzung der HiTrap™ Desalting 5 ml - Säule und konstantem Fluss mit Q-Niedrigsalzpuffer.

Für eine Trennung über hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC) erfolgt die Bindung von Proteinproben an die Säulen HiTrap™ Butyl FF 1 ml und HiTrap™ Phenyl FF 1 ml äquilibriert mit 100 % HIC-Hochsalzpuffer, gefolgt von der Elution gebundener Proteine durch einen linearen Gradienten auf 100 % HIC-Niedrigsalzpuffer innerhalb von 10 Säulenvolumina.

Die Bindung von Proteinproben an die Säule Resource™ Q 1 ml zur Auftrennung über Anionenaustauschchromatographie erfolgt in 100 % Q-Niedrigsalzpuffer. Gebundene Proteine werden über einen stufenweisen Gradienten mit Q-Hochsalzpuffer (0 - 4 % Q-Hochsalzpuffer in 2 cv, 4 - 10 % Q-Hochsalzpuffer in 8 cv, 10 - 100 % Q-Hochsalzpuffer in 10 cv) eluiert.

### **2.4.6 Modifikation von scPvuII mit Azobenzol-Derivaten**

In dieser Arbeit wurden scPvuII-Varianten sowohl mit bi-funktionellen Azobenzol-Derivaten (→ *Photoswitch*-Strategie), als auch mit mono-funktionellen Azobenzol-Derivaten (→ *Photogate*-Strategie) modifiziert.

#### **2.4.6.1 Modifikation mit bi-funktionellen Azobenzol-Derivaten**

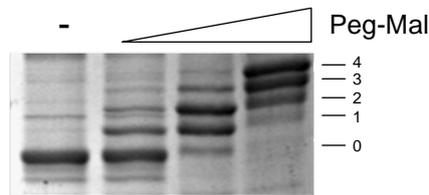
Für die Modifikation von scPvuII-Varianten mit bi-funktionellen Azobenzol-Derivaten wird die Proteinvariante mit Labeling-Puffer auf eine Konzentration von 5 µM verdünnt und mit einem 2 - 2,5 molaren Überschuss an AzoMal (über Cystein-Resten), welches in DMSO gelöst und durch 20-minütige Inkubation mit UV-Licht in den *cis*-Zustand isomerisiert wurde, für 10 min bei RT zur Reaktion gebracht. Für AzoCl und AzoIod kamen auch ein höherer Überschuss an Azobenzol-Derivat und eine veränderte Inkubationszeit und -temperatur zum Einsatz.

#### **2.4.6.2 Modifikation mit mono-funktionellen Azobenzol-Derivaten**

Für die Modifikation von scPvuII-Varianten mit mono-funktionellen Azobenzol-Derivaten wird die Proteinvariante mit Labeling-Puffer auf eine Konzentration von 5 µM verdünnt und mit einem 5 - 10 molaren Überschuss an dem Azobenzol-Derivat (über Cystein-Resten) für 10 min bei RT zur Reaktion gebracht.

### 2.4.6.3 Quantifizierung der Modifikationsausbeute

Zur Bestimmung der Modifikationsausbeute durch Azobenzol-Modifikationen wird nach Beendigung der Modifikationsreaktion ein 10 µl Aliquot mit einem 50-fachen Überschuss (über Cystein-Resten) an PEG-Mal ((Methyl-PEO<sub>12</sub>)<sub>3</sub>-PEO<sub>4</sub>-Maleimid; 2,3 kDa; *Pierce (St. Augustin)*) versehen. PEG-Mal reagiert über die Maleimid-Komponente spezifisch mit freien Cystein-Resten und erhöht die Masse des Proteins um 2,3 kDa pro addiertem PEG (Abb. 2-3). Falls nach der ersten Azobenzol-Modifikation somit noch freie Cystein-Reste vorhanden sein sollten, kann dies indirekt durch einen Massen-*shift* durch SDS-PAGE detektiert werden. Eine Modifikation von nicht modifiziertem Protein mit PEG-Mal dient dabei als Referenz und spiegelt ebenso das Vorhandensein und die Zugänglichkeit für Maleimid-Modifikationen von Cystein-Resten im Protein wieder.



**Abb. 2-3 Gelelektrophoretische Analyse der Modifikation der Quadrupel-Cystein Variante sc(C147 C151)<sub>2</sub> mit PEG-Maleimid (0, 1, 5, 50 - facher molarer Überschuss)**

### 2.4.7 Aufreinigung von Azobenzol-modifiziertem scPvuII

Die Aufreinigung von scPvuII, bei dem zwei Cystein-Reste mit dem bi-funktionellem Azobenzol-Derivat AzoMal querverknüpft sind, von anderen bei der Modifikationsreaktion entstandenen Nebenprodukten erfolgt, indem dem Ansatz nach Modifikation ein 125 - facher molarer Überschuss an 2-Mercaptopropionsäure (über Cystein-Reste) zugefügt wird, welches mit seiner funktionellen Sulfhydryl-Gruppe an die nicht reagierten Maleimid-Kopplungsgruppen addiert und somit eine negative Ladung anfügt. Der Ansatz wird zentrifugiert (20000 x g, 4 °C, 5 min) und anschließend über einer Gelfiltration (HiTrap™ Desalting) und eine Anionenaustauschchromatographie (Resource™ Q) aufgereinigt. Die ersten Fraktionen, die Azobenzol-modifiziertes Protein enthalten, werden gesammelt und Aktivitätstests unter spezifischer Belichtung unterzogen.

Die Aufreinigung von scPvuII, das mit mono-funktionellen Azobenzol-Derivaten modifiziert wurde, erfolgt über Gelfiltration (HiTrap™ Desalting) der zentrifugierten Probe (20000 x g, 4

°C, 5 min) und in einigen Fällen über anschließende Anionenaustauschchromatographie (Resource™ Q).

### 2.5 Methoden unter spezifischer Belichtung

#### 2.5.1 Setup für die spezifische Belichtung

Für die Belichtung von Azobenzol-modifizierten Varianten von scPvuII auf Eis wurde folgendes Setup (Abb. 2-4) verwendet. Die zu belichtende Probe wird direkt auf einem mit Parafilm bedeckten Metallblock auf Eis inkubiert, durch einen Blendschutz und eine über die Probe gestülpte CD-Küvette (*Hellma (Müllheim)*, QS 0,1 mm), die im benutzten Spektralbereich lichtdurchlässig ist, vor auf dem Metallblock auftretender Kondensation geschützt und entsprechend belichtet. Dieses Belichtungs-Setup kam bei längeren Inkubationen der modifizierten Proben auf Eis mit verschiedenen Vor-Belichtungen und bei thermischen Relaxationsexperimenten zum Einsatz. Für die Durchführung von Spaltungsreaktionen bei 37 °C unter spezifischer Belichtung, wurde die Probe direkt auf einem im Heizblock befindlichen und mit Parafilm bedeckten Metallblock inkubiert und spezifisch belichtet. Der Abstand der UV-Lampe zur Probe beträgt dabei jeweils 9 cm, der entsprechende Abstand zur Blaulichtquelle jeweils 15 cm.

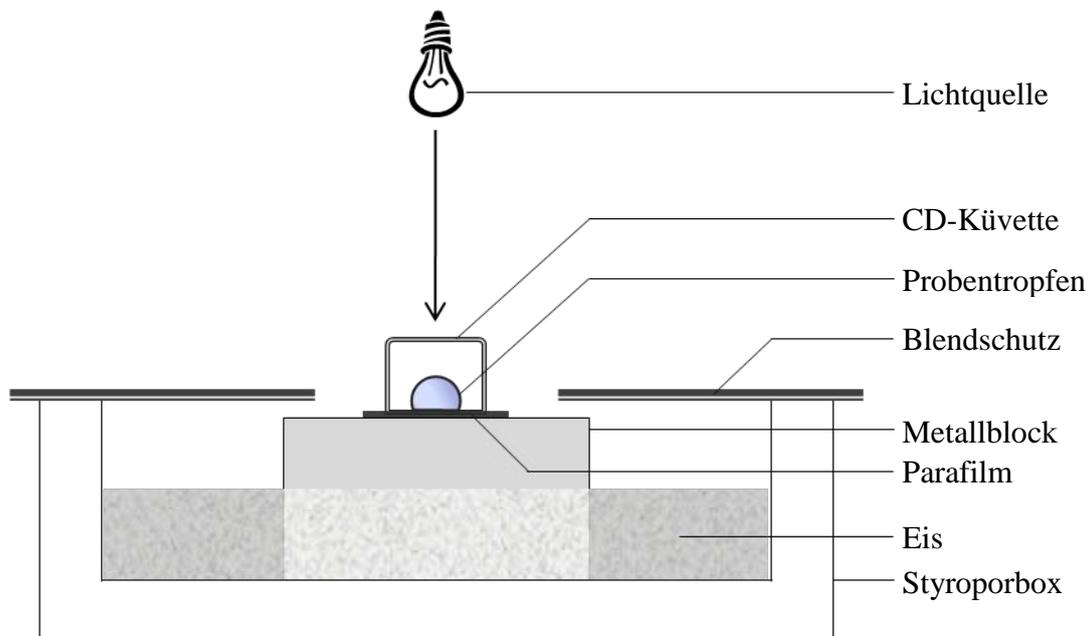


Abb. 2-4 Setup für die Belichtung von Proteinproben bei 4 °C

### 2.5.2 Aktivitätstests unter spezifischer Beleuchtung

#### 2.5.2.1 Aktivitätstest unter Vor-Belichtung der modifizierten Probe

Für diesen Assay wird ein 130 µl großer Enzym-Mix, der eine geeignete Konzentration der Azobenzol-modifizierten Protein-Fraktion mit 2x Aktivitätspuffer PvuII enthält, zunächst für 2 min mit blauem Licht auf Eis belichtet. 50 µl dieses belichteten Enzym-Mixes werden zum Start der Reaktion mit 50 µl Substrat-Mix (8 nM pAT153 tri und 2 mM MgCl<sub>2</sub>) gemischt und für 5 - 10 min bei 37 °C unter Belichtung mit blauem Licht inkubiert. Der vorliegende Spaltungsansatz enthält somit neben der entsprechenden Konzentration an Azobenzol-modifiziertem Protein (gemäß Konzentrationsabschätzung über SDS-PAGE mit Silberfärbung ~ 0,1 - 30 nM) 4 nM Substratplasmid und 1 mM MgCl<sub>2</sub>. Nach bestimmten Reaktionszeiten (1, 2, 3, 5, 7, 10 min) wird ein 10 µl Aliquot entnommen und durch Zugabe von DNA-Probenpuffer abgestoppt. Der auf Eis gehaltene Enzym-Mix wird daraufhin für 4 min mit UV-Licht belichtet. Anschließend werden erneut 50 µl dieses belichteten Enzym-Mixes mit 50 µl Substrat-Mix vermischt, bei 37 °C unter Belichtung mit UV-Licht inkubiert und nach entsprechenden Zeiten Proben genommen und abgestoppt.

Die gesammelten Proben werden durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt, die Intensitäten der einzelnen Banden quantifiziert und daraus der relative Anteil an linearisiertem Substratplasmid ermittelt. Diese relativen Anteile an linearisiertem Substratplasmid werden gegen die Zeit aufgetragen und aus der Anfangssteigung durch lineare Regression die relativen Aktivitäten [nM geschnittenes Substrat / min] bestimmt, wobei die relative Aktivität unter Belichtung mit blauem Licht dem *trans*-Zustand des verknüpften Azobenzol-Derivats und die relative Aktivität unter Belichtung mit UV-Licht dem *cis*-Zustand zugeordnet werden.

Zur Evaluation wird der „*cis/trans*“-Effekt für jede Variante bestimmt, der sich aus dem Quotienten der relativen Aktivität in *cis* und der relativen Aktivität in *trans* ergibt. Bezieht man die aus der Konzentrationsabschätzung durch SDS-PAGE mit Silberfärbung erhaltene Konzentration an eingesetztem Protein mit ein, so kann man aus der relativen Aktivität die absolute Aktivität [nM geschnittenes Substrat / (min x nM Enzym)] bezogen auf die jeweilige Belichtung ermitteln.

### 2.5.2.2 Aktivitätstest *in situ* unter spezifischer Belichtung

Um den Einfluss von variabler spezifischer Belichtung auf die Aktivität Azobenzol-modifizierter scPvuII-Varianten *in situ* während einer Spaltungskinetik zu untersuchen, wird das modifizierte Enzym geeigneter Konzentration (gemäß Konzentrationsabschätzung über SDS-PAGE mit Silberfärbung ~ 0,2 - 0,7 nM) mit 4 nM pAT153 tri, 1x Aktivitätspuffer und 1 mM MgCl<sub>2</sub> bei 37 °C inkubiert, wobei die Belichtung startend mit blauem Licht alle 5 min zwischen Belichtung mit blauem Licht und UV-Licht variiert wird. Nach bestimmten Reaktionszeiten wird jeweils ein 10 µl Aliquot entnommen und durch Zugabe von DNA-Probenpuffer abgestoppt. Die gesammelten Proben werden durch Agarose-Gelelektrophorese analysiert, die Intensitäten der einzelnen Banden quantifiziert und daraus der relative Anteil an linearisiertem Substratplasmid ermittelt.

### 2.5.2.3 *Steady-state* kinetische Analyse unter spezifischer Belichtung

Zur näheren Charakterisierung einer Azobenzol-modifizierten Variante von scPvuII wird diese einer *Steady-state* kinetischen Analyse nach Michaelis-Menten (144) unter spezifischer Belichtung unterzogen. Als Substrat dient ein 229 bp langes PCR-Fragment, welches durch Inkorporation von [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-dATP während der PCR-Reaktion radioaktiv markiert wurde und eine singuläre PvuII - Erkennungssequenz trägt. Die Spaltungsreaktionen von 1,8 nM bis 121,8 nM dieses Substrats in zwei Produktfragmente (143 und 86 bp) durch 2,4 nM einer Azobenzol-modifizierten scPvuII Variante in 1x Aktivitätspuffer PvuII mit 10 mM MgCl<sub>2</sub> wird dazu unter Belichtung mit blauem oder UV-Licht (entsprechend des Aktivitätstest unter Vor-Belichtung Punkt 2.5.2.1) durchgeführt. Nach 0, 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 5, und 8 Minuten wird jeweils ein 10 µl - Aliquot entnommen, mit DNA-Auftragspuffer abgestoppt und auf einem 10%igen Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch untersucht. Das Gel wird mit Hilfe eines InstantImager - Systems (*Packard*) analysiert, mit InstantImager - Software quantifiziert und der relative Anteil an geschnittenem Substrat ermittelt. Aufgetragen gegen die Zeit wird daraus durch lineare Regression der Anfangssteigung die jeweilige relative Aktivität bestimmt. Die Werte der relativen Aktivitäten für Belichtung unter blauem und UV-Licht werden im Michaelis-Menten-Diagramm gegen die eingesetzte Substratkonzentration aufgetragen, die Messpunkte durch nicht-lineare Regressionsanalyse an das Michaelis-Menten-Modell angepasst und daraus die Werte für  $K_m$  und  $V_{max}$  gewonnen.

## 2.6 Organisch-Chemische Methoden

### 2.6.1 Synthese von Oligonukleotid-modifiziertem mono-funktionellem Azobenzol

Für die Synthese von 4-Maleimido-4'-Oligonukleotid-Thio-Azobenzol (Abb. 2-4) (im Folgenden bezeichnet als AzoDNA) werden 5,4  $\mu\text{mol}$  AzoMal in 400  $\mu\text{l}$  DMF gelöst und mit 0,2  $\mu\text{mol}$  Oligonukleotid Gate-Bam24, gelöst in 100  $\mu\text{l}$  Wasser, gemischt und für 30 min bei RT unter Schütteln zur Reaktion gebracht. Anschließend werden 200  $\mu\text{l}$  Wasser zugegeben und die wässrige Phase dreimal mit 1 ml Chloroform extrahiert. Das in der wässrigen Phase verbleibende AzoDNA wird durch Zugabe von 5  $\mu\text{l}$  einer 3 M NaCl - Lösung und 1 ml EtOH, Inkubation für 30 min bei  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  und anschließender Zentrifugation für 30 min bei  $4\text{ }^\circ\text{C}$  gefällt, in Wasser aufgenommen und direkt zur Modifikation von scPvuII-Varianten verwendet.

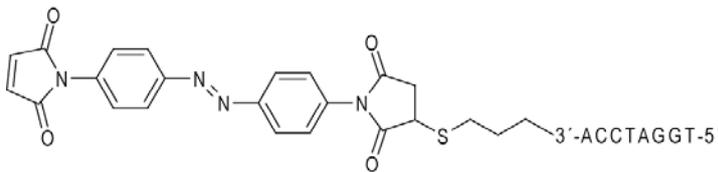


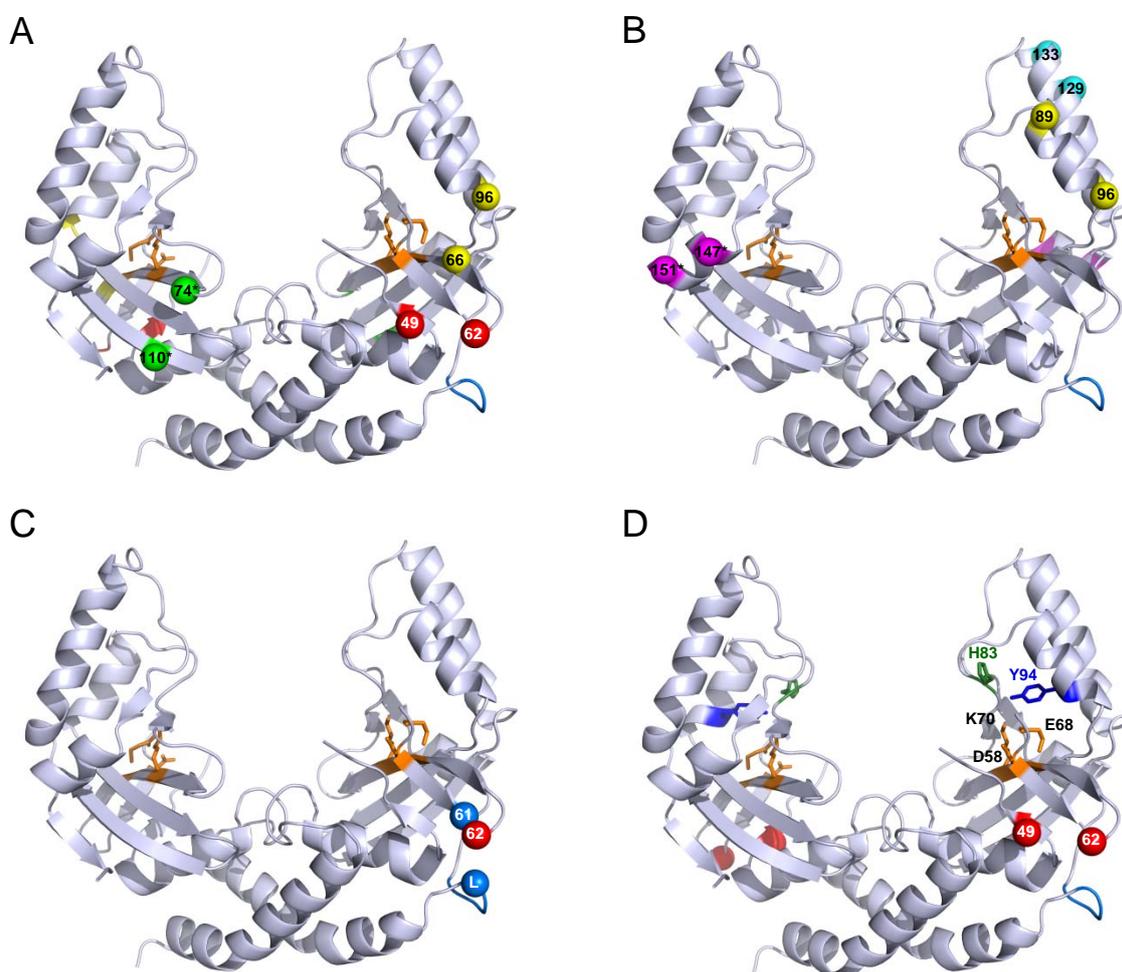
Abb. 2-5 Darstellung von AzoDNA

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Photoswitch-Strategie von scPvuII

##### 3.1.1 Varianten für die Modifikation mit bi-funktionellen Azobenzol-Derivaten

Zur Regulation der Aktivität von scPvuII über angehängte bi-funktionelle Azobenzol-Derivate wurden verschiedene Aminosäure-Paare (basierend auf der Struktur von PvuII (111) und mit Hilfe des Programms sGAL (145)) ausgewählt, die zum einen auf der Oberfläche des Proteins exponiert sind und deren Abstand ( $\sim 8 \pm 4 \text{ \AA}$ , Tab. 3-1) zum anderen mit dem



**Abb. 3-1** Gewählte Crosslink-Stellen von scPvuII für die Modifikation mit bi-funktionellen Azobenzol-Derivaten: (A) Crosslink-Stellen nahe dem aktiven Zentrum (C49-C62; C66-C96; C74-C110). (B) Crosslink-Stellen auf die DNA-Bindungsstelle flankierenden Helices (C89-C96; C129-C133; C147-C151). (C) Crosslink-Stellen, die die Linker-Region mit Resten nahe des aktiven Zentrums verbinden (Linker-C61; Linker-C62). (D) Positionen der zusätzlich eingeführten Mutationen, die die DNA-Bindung (H83A) bzw. Katalyse (Y94F) von scPvuII vermindern und mit Crosslink-Stellen (hier C49-C62) kombiniert wurden. In Orange sind jeweils die Reste des aktiven Zentrums (D58, E68, K70) dargestellt.

Abstand von AzoMal in der *cis*-Konfiguration ( $\sim 5 - 12 \text{ \AA}$ ) übereinstimmt. Die Aminosäuren der gewählten Paare wurden anschließend durch Cysteine substituiert und dienen folglich als Crosslink-Stellen für die Modifikation mit bi-funktionellen Azobenzol-Derivaten. Ausgewählt wurden Aminosäure-Paare, die auf Loops oder  $\beta$ -Faltblättern nahe dem aktiven Zentrum lokalisiert sind (T49-N62; E66-Q96; I74-E110) (Abb. 3-1 A) und Paare auf drei, die DNA-Bindungsstelle flankierenden  $\alpha$ -Helices (V89-Q96; R129-S133; K147-E151) (Abb. 3-1 B). Zudem wurden Crosslink-Stellen ausgesucht, die die Linker-Region ( $L_1 - L_4$ ; siehe Punkt 2.3.9.4) mit Aminosäure-Resten nahe dem aktiven Zentrum durch die Azobenzol-Modifikation querverknüpfen (Linker-D61; Linker-N62) (Abb. 3-1 C). Der Austausch der Aminosäure-Reste in Cysteine erfolgte entweder nur in der N-terminalen Hälfte von scPvuII (Doppel-Cystein-Varianten mit einer Azobenzol-Crosslink-Stelle) oder in beiden Enzym-Hälften (Quadrupel-Cystein-Varianten mit zwei Azobenzol-Crosslink-Stellen). Zudem wurden durch Kombination mehrerer Crosslink-Stellen Varianten erhalten, die acht Cysteine und somit vier Azobenzol-Crosslink-Stellen enthalten. Insgesamt wurden in dieser Arbeit 11 Doppel-Cystein-, 17 Quadrupel-Cystein-Varianten und 3 Varianten mit acht Cysteinen produziert und anschließend mit einem bi-funktionellen Azobenzol-Derivat modifiziert. Darüber hinaus wurden in acht dieser Varianten zusätzliche Aminosäure-Substitutionen eingeführt, die die Aktivität von scPvuII durch Störung der DNA-Bindung (H83A) (109) bzw. der Katalyse (Y94F) (103) vermindern (Abb. 3-1 D). Alle in dieser Arbeit produzierten Varianten sind in Tab. 3-1 aufgelistet.

**Tab. 3-1** Liste aller für den *Photoswitch* produzierten Varianten unter Angabe ihrer abgeschätzten relativen DNA Spaltungsaktivität (Variante / scPvuII) und dem berechneten  $C\gamma$  - Abstand. Die relative Aktivität ist angegeben als +++ (scPvuII Aktivität), ++ ( $1 - 10^{-1}$  der scPvuII Aktivität) und + ( $10^{-1} - 10^{-2}$  der scPvuII Aktivität), der berechnete  $C\gamma$  - Abstand basiert auf den Strukturen von scPvuII (111) bzw. von WT PvuII (108); n.m. bedeutet nicht messbar aufgrund nicht vorhandener Struktur.

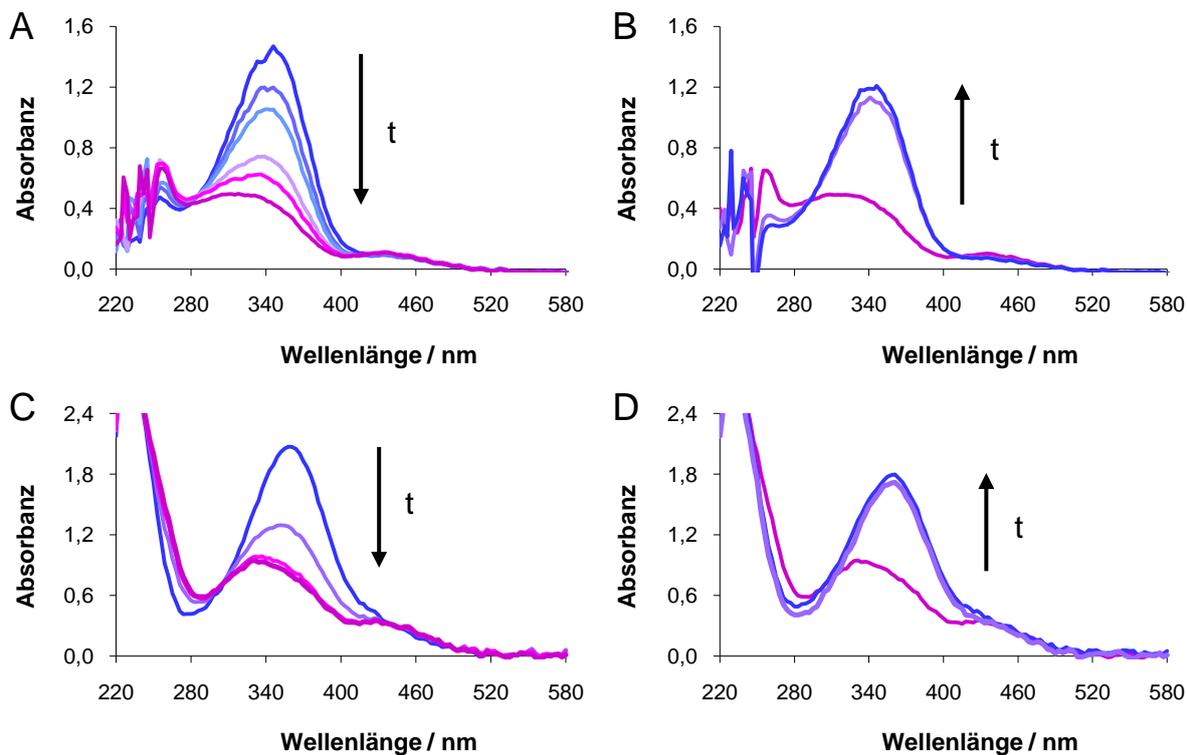
Variante	Rel. Aktivität	C $\gamma$ - Abstand / $\text{\AA}$	
		(N)	(C)
sc	+++	-	-
sc(C49 C62)	+++	8,2	-
sc(C66 C96)	+++	9,5	-
sc(C74 C110)	++	7,5	-
sc(C89 C96)	++	11,2	-
sc(C129 C133)	++	4,0	-
sc(C147 C151)	+	5,9	-
sc(C49 C62) <sub>2</sub>	+++	8,2	7,8
sc(C66 C96) <sub>2</sub>	+++	9,5	10,4
sc(C74 C110) <sub>2</sub>	++	7,5	7,2
sc(C147 C151) <sub>2</sub>	++	5,9	6,1
sc(C49 C62) <sub>2</sub> (C66 C96) <sub>2</sub>	+	8,2 + 9,5	7,8 + 10,4
sc(C49 C62) <sub>2</sub> (C74 C110) <sub>2</sub>	++	8,2 + 7,5	7,8 + 7,2
sc(C49 C62) <sub>2</sub> (C66 C96)(C74* C110*)	++	8,2 + 9,5	7,8 + 7,2
sc(C49 C62) <sub>2</sub> (A83)	++	8,2	7,8
sc(C49 C62) <sub>2</sub> (A83) <sub>2</sub>	+	8,2	7,8

### 3. Ergebnisse

sc(C49 C62) <sub>2</sub> (F94)	++	8,2	7,8
sc(C49 C62) <sub>2</sub> (F94) <sub>2</sub>	++	8,2	7,8
sc(C49 C62) <sub>2</sub> (A83) <sub>2</sub> (F94)	+	8,2	7,8
sc(C49 C62) <sub>2</sub> (A83) <sub>2</sub> (F94) <sub>2</sub>	+	8,2	7,8
sc(C61 L <sub>1</sub> )	++	10,4	-
sc(C62 L <sub>1</sub> )	+++	8,6	-
sc(C61 L <sub>2</sub> )	+++	n.m.	-
sc(C61 L <sub>3</sub> )	+++	n.m.	-
sc(C61 L <sub>4</sub> )	+++	n.m.	-
sc(C61 L <sub>1</sub> )(C49* C62*)	++	10,4	7,8
sc(C62 L <sub>1</sub> )(C49* C62*)	+++	8,6	7,8
sc(C61 L <sub>2</sub> )(C49* C62*)	+++	n.m.	n.m.
sc(C61 L <sub>3</sub> )(C49* C62*)	+++	n.m.	n.m.
sc(C61 L <sub>4</sub> )(C49* C62*)	+++	n.m.	n.m.
sc(C61 L <sub>4</sub> )(C49* C62*)(F94)	++	n.m.	n.m.
sc(C61 L <sub>4</sub> )(C49* C62*)(F94) <sub>2</sub>	++	n.m.	n.m.
wt(C49 C62) <sub>2</sub>	+++	8,6	8,6
wt(C49 C62) <sub>2</sub> (F94) <sub>2</sub>	++	8,6	8,6

#### 3.1.2 Lichtinduzierte Isomerisierung von Azobenzol

Die Funktionalität der lichtinduzierten Isomerisierung von Azobenzol konnte durch photometrische Messungen der Extinktion nach spezifischer Belichtung bestätigt werden



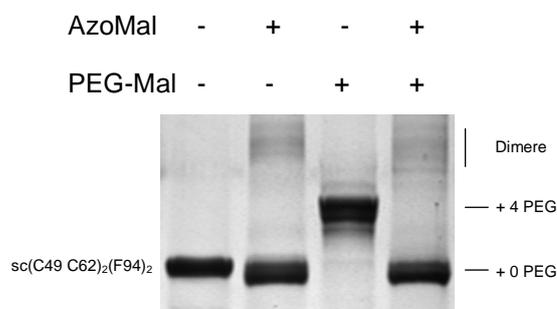
**Abb. 3-2 Lichtinduzierte Isomerisierung von AzoMal:** (A) *trans* → *cis* Isomerisierung von AzoMal gelöst in DMSO durch Belichtung mit UV-Licht für 0, 3, 5, 7, 11 und 15 min. (B) *cis* → *trans* Isomerisierung von AzoMal gelöst in DMSO durch Belichtung mit blauem Licht für 0, 1, 3 min. (C) *trans* → *cis* Isomerisierung von mit Cystein modifiziertem AzoMal gelöst in Labeling-Puffer durch Belichtung mit UV-Licht für 0, 1, 3 und 5 min. (D) *cis* → *trans* Isomerisierung von mit Cystein modifiziertem AzoMal gelöst in Labeling Puffer durch Belichtung mit blauem Licht für 0, 1 und 2 min.

(vgl. (43)), wobei das der *trans*-Konfiguration entsprechende Absorptionsmaximum bei ~350 - 360 nm durch Belichtung mit UV-Licht und der damit verbundenen Isomerisierung in die *cis*-Konfiguration abnimmt (Abb. 3-2 A/C). Durch Belichtung mit blauem Licht und der damit verbundenen Rück-Isomerisierung in die *trans*-Konfiguration kann dieses Maximum anschließend wiederhergestellt werden (Abb. 3-2 B/D). Die *trans* → *cis* Isomerisierung von freiem AzoMal gelöst in DMSO ist dabei innerhalb von 15 min vollzogen, während AzoMal, welches zur Erhöhung der Löslichkeit in wässrigem Milieu mit Cystein modifiziert wurde, gelöst in Labeling-Puffer die *cis*-Konfiguration schneller erreicht (< 3 min). Die Rück-Isomerisierung in die *trans*-Konfiguration erfolgt in beiden Fällen unmittelbar nach Belichtung mit blauem Licht (< 1 min). Eine direkte Messung der Isomerisierung einer mit bifunktionellem Azobenzol modifizierten Variante konnte aufgrund der zu geringen Konzentration an modifiziertem Protein nach den Aufreinigungsschritten (Punkt 2.4.7) photometrisch nicht erfolgen.

### 3.1.3 Modifikation und Aufreinigung Azobenzol-modifizierter Varianten

#### 3.1.3.1 Optimierung der Azobenzol-Modifikation

Da scPvuII in Lösung zu unspezifischen Aggregationen neigt, diese unter Hochsalzbedingungen jedoch nicht auftreten, was durch dynamische Lichtstreuungsexperimente gezeigt werden konnte (Diplomarbeit Christian Gerken, Justus-Liebig Universität Gießen, 2008), wurden sämtliche Modifikationen unter 500 mM NaCl durchgeführt, um somit störende Aggregationen möglichst auszuschließen. Anfängliche Modifikationen mit AzoCl und AzoIod mit einem bis zu 25-fachem Überschuss (über Cystein-Reste) für 1 - 4 h bei RT bzw. 37 °C erzielten lediglich Ausbeuten von 25 - 75 %, wobei sich die lange Inkubationszeit bei der entsprechenden Temperatur auch negativ auf die Enzymaktivität auswirkte. Da die Modifikationsreaktion mit AzoMal innerhalb weniger Minuten bei RT zu Ausbeuten von 70 - 85 % führt, wurde für alle weiteren Modifikations- bzw. *Photoswitch*-Experimente jeweils

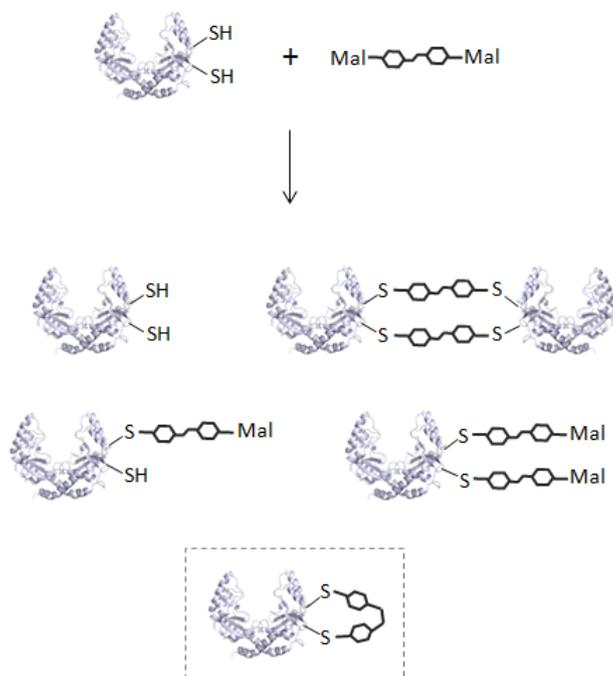


**Abb. 3-3 Analyse der Modifikation von  $sc(C49\ C62)_2(F94)_2$  mit AzoMal durch SDS-PAGE:** Durch sekundäre Modifikation mit PEG-Maleimid ergibt sich eine Modifikationsausbeute von ~ 80 %.

AzoMal verwendet. Ein 2 - 2,5-facher Überschuss an AzoMal (isomerisiert in den *cis*-Zustand) und Inkubation für 10 min bei RT führt dabei neben einigen Dimeren (die die Ausbeute vermindern) lediglich zu einer Bande im SDS-Gel (Abb. 3-3 Spur 2). Die Intensität dieser Bande wird durch die Folge-Reaktion mit PEG-Mal nicht beeinträchtigt, was belegt, dass unter den Bedingungen der ersten Modifikation mit AzoMal keine freien Cysteine mehr verbleiben (Abb. 3-3 Spur 4).

### 3.1.3.2 Optimierung der Aufreinigung Azobenzol-modifizierter Varianten

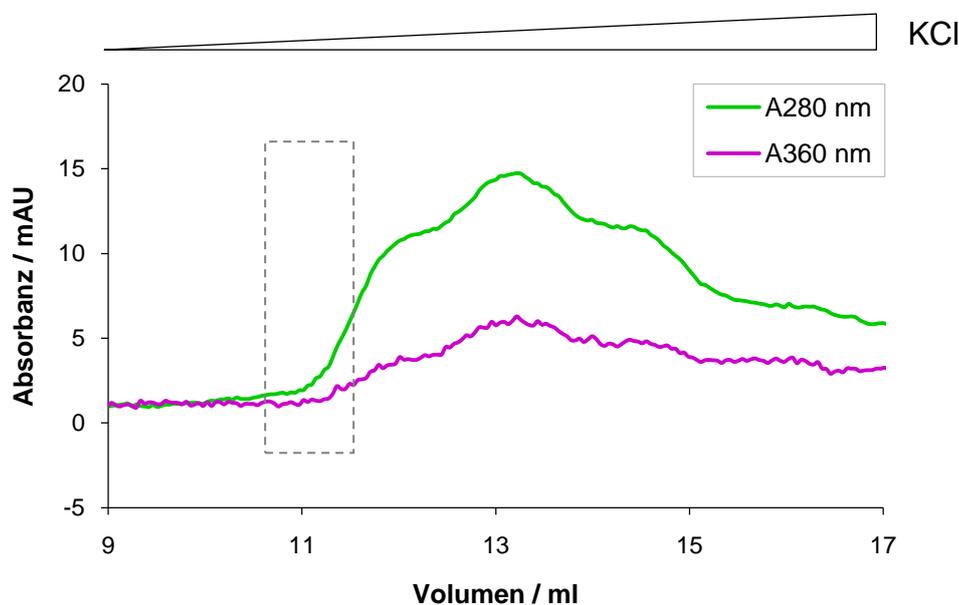
In Folge der bi-molekularen Reaktion einer Doppel-Cystein Variante mit einem AzoMal-Crosslinker entstehen neben dem erwünschten Produkt, bei dem beide Cysteine durch ein AzoMal-Molekül querverknüpft sind, auch andere Nebenprodukte (Abb. 3-4), die allerdings (mit Ausnahme der quervernetzten Dimere) die gleiche elektrophoretische Mobilität besitzen wie das erwünschte Produkt (Abb. 3-3). Da die Stöchiometrie der Crosslink-Reaktion so gewählt ist, dass nach der Modifikationsreaktion keine freien Cysteine mehr vorhanden sind (Abb. 3-3 Spur 4), ist als Nebenprodukt abgesehen von den entstehenden Dimeren vor allem das Produkt zu erwarten, bei dem beide Cysteine mit je einem AzoMal-Molekül modifiziert



**Abb. 3-4 Schematische Darstellung der Modifikation einer Doppel-Cystein Variante mit AzoMal mit den zu erwartenden Reaktionsprodukten:** Das markierte Produkt stellt die gewünschte Spezies dar, bei der die zwei Cysteine der Crosslink-Stelle durch ein AzoMal-Molekül querverknüpft sind. Für Varianten mit 4 bzw. 8 Cysteinen gilt unter Berücksichtigung einer größeren Produktvielfalt ähnliches.

(nicht querverknüpft) sind. Da das gewünschte Produkt nur einen Teil des unaufgereinigten Modifikationsansatzes darstellt, und diesem Teil alleine ein möglicher Aktivitätsunterschied durch unterschiedliche Belichtung zugeordnet werden muss, ist eine Aufreinigung des querverknüpften Produktes notwendig, damit dessen eigentlicher „*cis/trans*“-Effekt nicht durch die Aktivität der Nebenprodukte überdeckt wird. Für Varianten mit 4 bzw. 8 Cysteinen sind entsprechend mehrere aber analoge Nebenprodukte zu erwarten.

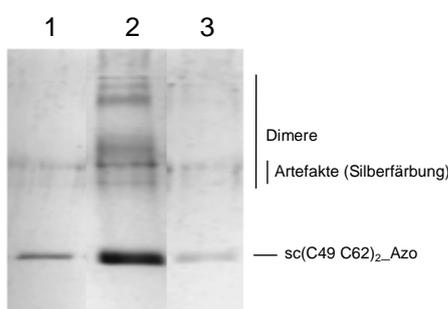
Anfängliche Versuche, die Nebenprodukte über hydrophobe Interaktionschromatographie aufgrund der hydrophoben Wechselwirkungen der angehängten Azobenzol-Moleküle abzutrennen, scheiterten, da nur jeweils ein breiter Peak unter 100% Niederigsalzpuffer von der Säule eluiert werden konnte. Daher wurde die Tatsache ausgenutzt, dass AzoMal-Moleküle, bei denen nur eine Maleimid-Kopplungsgruppe mit einem Cystein-Rest reagiert hat, immer noch eine intakte zweite Maleimid-Kopplungsgruppe besitzen. An diese wird 2-Mercaptopropionsäure gekoppelt (siehe Punkt 2.4.7), wodurch eine (oder je nach Nebenprodukt mehrere) negative Ladung an das jeweilige Nebenprodukt addiert wird. Das erwünschte querverknüpfte Produkt erhält dagegen keine zusätzliche negative Ladung und kann durch Anionenaustauschchromatographie abgetrennt werden. Das Ergebnis einer solchen Auftrennung ist in Abb. 3-5 für  $sc(C49\ C62)_2\text{-Azo}$  exemplarisch dargestellt.



**Abb. 3-5 Chromatogramm der Anionenaustauschchromatographie von  $sc(C49\ C62)_2\text{-Azo}$ :** Die Elution erfolgte durch einen Gradienten von 100 mM bis 320 mM KCl. Die markierte Fraktion, welche dem ersten Azobenzol enthaltenden Peak entspricht, wurde gesammelt, gegen Dialysepuffer ü.N. dialysiert und für Aktivitätstests unter spezifischer Belichtung eingesetzt.

### 3. Ergebnisse

Wie zu erkennen ist, zeigt das Chromatogramm mehrere, auf Azobenzol zurückzuführende Peaks, wobei jeweils das dem ersten Peak entsprechende Eluat, das auch theoretisch das erwünschte querverknüpfte Produkt enthalten soll, scharf fraktioniert wird (Abb. 3-5) und für Aktivitätstests unter spezifischer Belichtung eingesetzt wird. Bei der elektrophoretischen Analyse (Abb. 3-6) erhält man für die aufgereinigte Probe eine einzelne Bande, die Dimere konnten somit abgetrennt werden. Ob die besagten Nebenprodukte abgetrennt werden konnten, ist aufgrund der gleichen elektrophoretischen Mobilität nicht direkt ersichtlich, jedoch zeigt jeweils der erste fraktionierte Peak einen höheren „*cis/trans*“-Effekt als die nachfolgenden Peaks.



**Abb. 3-6 Analyse der Aufreinigung von  $sc(C49\ C62)_2\_Azo$  durch SDS-PAGE mit Silberfärbung:** Aufgetragen sind neben der unmodifizierten Kontrolle (1) die modifizierte, unaufgereinigte (2) und die modifizierte, aufgereinigte (3) Variante

Führt man mit der Variante mit dem bisher höchsten erhaltenen „*cis/trans*“-Effekt,  $sc(C49\ C62)_2(F94)_2\_Azo$ , Aktivitätstests unter spezifischer Belichtung jeweils vor bzw. nach der Aufreinigung durch, so erhält man für die unaufgereinigte Variante eine „*cis/trans*“-Effekt von 3,4 gegenüber einem Wert von 15,8 bei der aufgereinigten Variante (Tab. 3-2). Dies verdeutlicht wiederum, dass die bei der Modifikation erhaltenen Nebenprodukte den eigentlichen „*cis/trans*“-Effekt des querverknüpften Produktes überdecken und eine Aufreinigung dieses Produktes somit notwendig ist.

**Tab. 3-2 Einfluss der Aufreinigung von Azobenzol-modifiziertem  $scPvuII$  auf den gemessenen „*cis/trans*“-Effekt am Beispiel von  $sc(C49\ C62)_2(F94)_2\_Azo$**

Variante	Absolute Aktivität [nM Substrat / (min x nM Enzym)]		„ <i>cis/trans</i> “- Effekt
	<i>trans</i>	<i>cis</i>	
$sc(C49\ C62)_2(F94)_2$	0,49 ± 0,07	0,48 ± 0,07	1,0 ± 0,0
$sc(C49\ C62)_2(F94)_2\_Azo$ unaufgereinigt	0,072 ± 0,005	0,24 ± 0,01	3,4 ± 0,2
$sc(C49\ C62)_2(F94)_2\_Azo$ aufgereinigt	0,0027 ± 0,0005	0,042 ± 0,013	15,8 ± 2,4

### 3.1.4 Stufenweise Entwicklung eines photosensitiven Restriktionsenzym

Der folgende Abschnitt zeigt die schrittweise Optimierung der Varianten von scPvuII für die Modifikation mit AzoMal und den anschließenden Aktivitätstests unter spezifischer Belichtung auf, hin zu einem bisher maximal erreichten „*cis/trans*“-Effekt von 16. Sämtliche Varianten und deren erzielte „*cis/trans*“-Effekte sind in einer Übersichtstabelle in Punkt 3.1.6 (Tab. 3-9) zusammengefasst.

#### 3.1.4.1 Varianten mit einem Azobenzol-Schalter

Betrachtet man anfangs die Varianten, die ein querverknüpftes Azobenzol in der N-terminalen Hälfte tragen (Tab. 3-3), so ist bei den Varianten sc(C49 C62)\_Azo und sc(C66 C96)\_Azo der Kategorie „Azobenzol-Ansatzpunkt nahe dem aktiven Zentrum“ ein ~ 2-facher Unterschied in der *cis*- gegenüber der *trans*-Konfiguration des angehängten Azobenzols auszumachen. Die anderen Varianten, insbesondere mit der Modifizierung von  $\alpha$ -Helices nahe der DNA Bindungsstelle zeigen dagegen nur kleine ( $< 1,5$ ) „*cis/trans*“-Effekte. Kontrollexperimente mit scPvuII zeigen, dass dessen enzymatische Aktivität ohne Modifikation nicht durch die unterschiedlichen Belichtungszustände beeinflusst wird („*cis/trans*“-Effekt = 1).

Tab. 3-3 Varianten mit einem Azobenzol-Schalter: *cis/trans*-Effekte der relativen Aktivitäten ( $\pm$  S.D.)

Variante	„ <i>cis/trans</i> “-Effekt
sc	1,0 $\pm$ 0,1
sc(C49 C62)_Azo	2,2 $\pm$ 0,0
sc(C66 C96)_Azo	2,3 $\pm$ 0,4
sc(C74 C110)_Azo	1,1 $\pm$ 0,2
sc(C89 C96)_Azo	1,1 $\pm$ 0,1
sc(C129 C133)_Azo	1,1 $\pm$ 0,0
sc(C147 C151)_Azo	1,5 $\pm$ 0,0

#### 3.1.4.2 Varianten mit zwei Azobenzol-Schaltern

Führt man die Azobenzol-Crosslink-Stellen symmetrisch jeweils in die N- und C-terminale Hälfte ein (Tab. 3-4), so erhält man für die Varianten nahe dem aktiven Zentrum mit den Positionen C66-C96 und C74-C110 einen „*cis/trans*“-Effekt von ~ 3. Für die Crosslink-Stelle C49-C62 lässt sich der Effekt durch spezifische Belichtung beim Übergang von einem zu zwei Azobenzol-Schaltern sogar von 2,2 auf 7,2 steigern (vgl. Abb. 3-7). Dagegen lassen sich bei der „helikalen“ Position C147-C151 nahe der DNA-Bindungsstelle mit zwei Azobenzol-

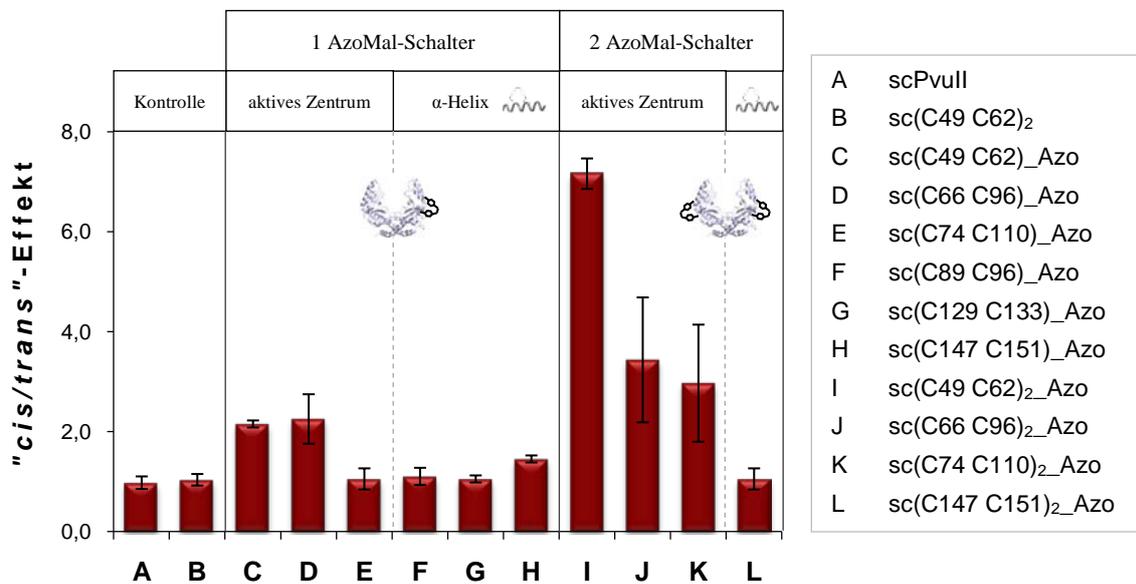
### 3. Ergebnisse

Schaltern erneut keine signifikanten Aktivitätsunterschiede aufgrund spezifischer Belichtung erkennen.

**Tab. 3-4 Varianten mit zwei Azobenzol-Schaltern: *cis/trans*-Effekte der relativen Aktivitäten ( $\pm$  S.D.)**

Variante	" <i>cis/trans</i> "-Effekt
sc(C49 C62) <sub>2</sub>	1,0 $\pm$ 0,1
sc(C49 C62) <sub>2</sub> _Azo	7,2 $\pm$ 0,3
sc(C66 C96) <sub>2</sub> _Azo	3,4 $\pm$ 1,0
sc(C74 C110) <sub>2</sub> _Azo	3,0 $\pm$ 1,0
sc(C147 C151) <sub>2</sub> _Azo	1,1 $\pm$ 0,2

Insgesamt sind die gemessenen „*cis/trans*“-Effekte des Schritts von einem Azobenzol-Schalter zu zwei Azobenzol-Schaltern in Abb. 3-7 zusammenfassend dargestellt.



**Abb. 3-7 Zusammenstellung der „*cis/trans*“-Effekte von scPvuII-Varianten mit einem bzw. zwei querverknüpften Azobenzol-Schaltern**

### 3.1.4.3 Varianten mit vier Azobenzol-Schaltern

Die Varianten nahe dem aktiven Zentrum werden weiter kombiniert, so dass Varianten erhalten werden, die 8 Cysteine bzw. vier Azobenzol Crosslink-Stellen besitzen (Tab. 3-5). Allerdings zeigen diese Varianten nach der Modifikation mit AzoMal erhebliche Löslichkeitsprobleme auf, vermutlich aufgrund der hydrophoben Interaktionen der angehängten Azobenzol-Moleküle. Die Zugabe von 0,01% Lubrol kann diese Aggregationen zwar bedingt verhindern, die aufgereinigten Proben besitzen aber lediglich einen gemessenen „*cis/trans*“-Effekt von ~2. Die Tatsache, dass sich unspezifische Querverknüpfungen zwischen verschiedenen Cystein-Resten ausbilden können, zeigt zusammen mit dem Löslichkeitsproblem, dass diese Varianten mit vier Crosslink-Stellen mit Azobenzol-Modifikationen überladen scheinen. Dies kann die Ursache dafür sein, dass keine weitere Steigerung des gemessenen „*cis/trans*“-Effektes gegenüber den Varianten mit zwei Azobenzol-Schaltern gefunden wird.

**Tab. 3-5 Varianten mit vier Azobenzol-Schaltern: *cis/trans*-Effekte der relativen Aktivitäten ( $\pm$  S.D.)**

Variante	„ <i>cis/trans</i> “-Effekt
sc(C49 C62) <sub>2</sub> (C66 C96) <sub>2</sub> _Azo	2,4 $\pm$ 0,4
sc(C49 C62) <sub>2</sub> (C74 C110) <sub>2</sub> _Azo	1,9 $\pm$ 0,2
sc(C49 C62) <sub>2</sub> (C66 C96)(C74* C110*)_Azo	2,2 $\pm$ 0,4

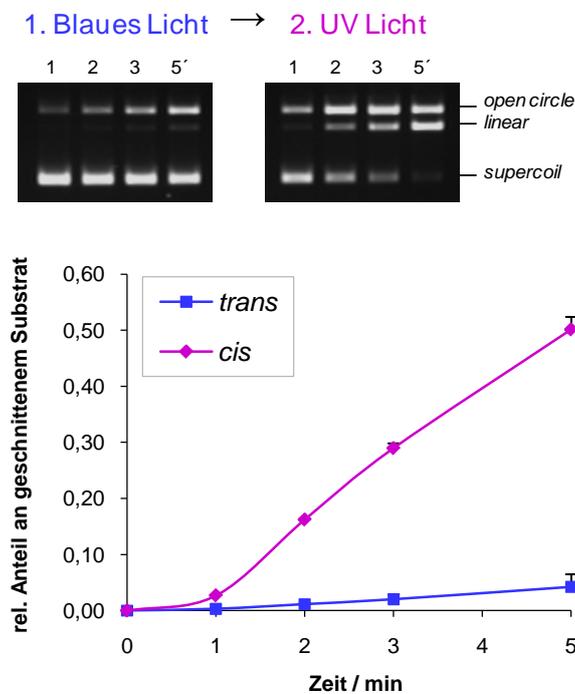
### 3.1.4.4 Varianten mit zwei Azobenzol-Schaltern und zusätzlichen Mutationen

Zur weiteren Steigerung des „*cis/trans*“-Effekts wurde die Variante mit dem bis dahin höchsten Wert (sc(C49 C62)<sub>2</sub>) als Ausgangspunkt für weitere Aminosäure-Substitutionen herangezogen, welche die Aktivität von PvuII durch Störung der DNA-Bindung (H83A) (109) bzw. der Katalyse (Y94F) (103) vermindern. Die Mutationen A83 und F94 wurden daher jeweils einzeln oder kombiniert in die N-terminale bzw. in beide Hälften der Variante sc(C49 C62)<sub>2</sub> eingeführt (Tab. 3-6) und die erhaltenen Varianten nach Modifikation Aktivitätstests unter spezifischer Belichtung unterzogen. Dabei zeigte sich für die zusätzliche H83A Substitution in beiden Hälften eine Steigerung des „*cis/trans*“-Effekts auf einen Wert von ~10, die beidseitige Y94F-Substitution zeigte sogar einen 16-fachen Unterschied der Aktivität in der *cis*- gegenüber der *trans*-Konfiguration des angehängten Azobenzol-Crosslinkers (Abb. 3-8). Eine Kombination aus A83 und F94 in beiden Hälften führt jedoch zu einem deutlichen Absinken des „*cis/trans*“-Effekts, vermutlich da die absolute Aktivität dieser Variante insgesamt zu stark abgenommen hat (vgl. Tab. 3-9).

### 3. Ergebnisse

**Tab. 3-6 Varianten mit zwei Azobenzol-Schaltern und zusätzlichen Mutationen: *cis/trans*-Effekte der relativen Aktivitäten ( $\pm$  S.D.)**

Variante	" <i>cis/trans</i> "-Effekt
sc(C49 C62) <sub>2</sub> (F94) <sub>2</sub>	1,0 $\pm$ 0,0
sc(C49 C62) <sub>2</sub> (A83) <sub>2</sub> _Azo	6,2 $\pm$ 0,5
sc(C49 C62) <sub>2</sub> (A83) <sub>2</sub> _Azo	10,4 $\pm$ 2,9
sc(C49 C62) <sub>2</sub> (F94) <sub>2</sub> _Azo	14,7 $\pm$ 2,3
sc(C49 C62) <sub>2</sub> (F94) <sub>2</sub> _Azo	15,8 $\pm$ 2,4
sc(C49 C62) <sub>2</sub> (A83) <sub>2</sub> (F94) <sub>2</sub> _Azo	5,4 $\pm$ 1,1
sc(C49 C62) <sub>2</sub> (A83) <sub>2</sub> (F94) <sub>2</sub> _Azo	2,6 $\pm$ 0,2



**Abb. 3-8 Aktivitätstest unter spezifischer Belichtung von sc(C49 C62)<sub>2</sub>(F94)<sub>2</sub>\_Azo nach Vor-Belichtung der modifizierten Probe mit blauem Licht  $\rightarrow$  UV-Licht:** Gezeigt ist die gelelektrophoretische Analyse von Aliquots der Spaltungsreaktion (4 nM DNA, 12 nM Enzym) nach bestimmten Zeitintervallen (oben) zusammen mit dem dazugehörigen Graphen von linearisiertem Produkt gegen die Zeit (unten).

Die nach Einführung zusätzlicher Mutationen erhaltenen „*cis/trans*“-Effekte sind in Abb. 3-9 zusammenfassend dargestellt.

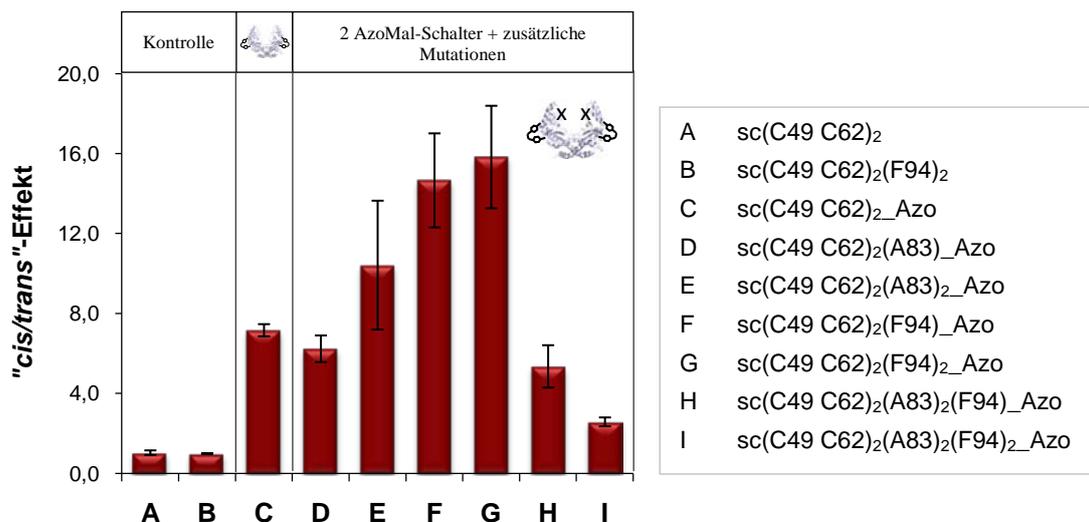


Abb. 3-9 Zusammenstellung der „cis/trans“-Effekte von scPvuII-Varianten mit zwei Azobenzol-Schaltern und zusätzlichen Mutationen

### 3.1.4.5 Varianten mit Azobenzol-Schaltern in der Linker-Region

Da die anfänglichen Experimente zeigten, dass die besten „cis/trans“-Effekte mit Positionen nahe des aktiven Zentrums erzielt werden konnten, wurden Positionen des Linkers der *single-chain* Variante von PvuII in Kombination mit den Positionen D61 und N62 als weitere Crosslink-Stellen herangezogen, zumal der Abstand und die Orientierung zueinander für eine Azobenzol-Modifikation geeignet ist. Der Linker als artifizierender Teil des Proteins ist theoretisch weitgehend sterisch fixiert und kann somit als Fixpunkt für die Quervernetzung mittels Azobenzol dienen. Der anfängliche Linker -GSGG- wurde dementsprechend durch die Linker-Varianten L<sub>1</sub> (-GSGC-), L<sub>2</sub> (-GSGCGTGG-), L<sub>3</sub> (-GSGTGCGG-) und L<sub>4</sub> (-GSGTGSGC-) ersetzt und mit den Positionen C61 bzw. C62 der N-terminalen Hälfte kombiniert (Tab. 3-7). Zudem wurde bei einigen Varianten zusätzlich die Effekt-bringende Azobenzol Crosslink-Stelle C49\*-C62\* in die C-terminale Hälfte eingeführt.

Betrachtet man die Linker-Varianten mit nur einem Azobenzol-Schalter, so ergeben sich für die Linker L<sub>1</sub>, L<sub>3</sub> und L<sub>4</sub> in Kombination mit C61 „cis/trans“-Effekte von ~ 2 - 3. Bei den Linker-Varianten mit zwei Azobenzol-Schaltern zeigt die Variante C61/L<sub>4</sub> den besten Effekt mit einem Wert von ~ 7, welcher deutlich über dem Wert von 2,2 liegt, der der einzelnen Crosslink-Stelle C49\*-C62\* zugeschrieben werden kann (vgl. Tab. 3-3). Führt man in diese Variante wiederum die Katalyse-beeinflussende Mutation F94 ein, so erhält man bei der Variante sc(C61 L<sub>4</sub>)(C49\* C62\*)(F94)<sub>2</sub>\_Azo in Analogie zur Variante sc(C49

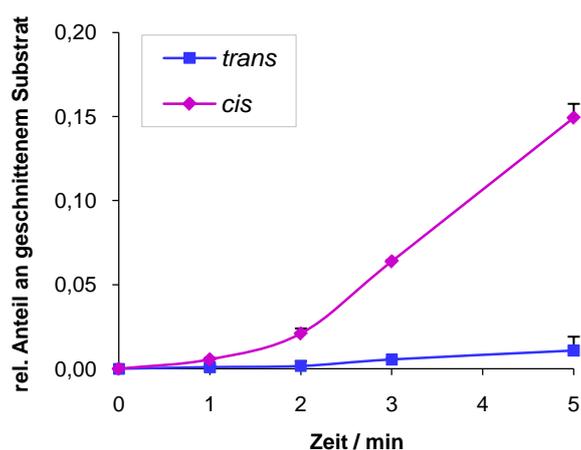
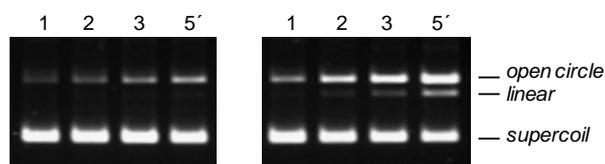
### 3. Ergebnisse

C62)<sub>2</sub>(F94)<sub>2</sub>\_Azo einen 16-fachen Unterschied in der Aktivität unter spezifische Belichtung (Abb. 3-10).

**Tab. 3-7 Varianten mit Azobenzol-Schaltern in der Linker-Region: *cis/trans*-Effekte der relativen Aktivitäten (± S.D.)**

Variante	" <i>cis/trans</i> "-Effekt
sc(C61 L <sub>1</sub> )_Azo	3,2 ± 0,3
sc(C62 L <sub>1</sub> )_Azo	1,0 ± 0,1
sc(C61 L <sub>2</sub> )_Azo	0,9 ± 0,2
sc(C61 L <sub>3</sub> )_Azo	2,0 ± 0,1
sc(C61 L <sub>4</sub> )_Azo	2,3 ± 0,4
sc(C61 L <sub>1</sub> )(C49* C62*)_Azo	3,3 ± 0,4
sc(C62 L <sub>1</sub> )(C49* C62*)_Azo	3,6 ± 0,5
sc(C61 L <sub>2</sub> )(C49* C62*)_Azo	2,3 ± 0,9
sc(C61 L <sub>3</sub> )(C49* C62*)_Azo	4,2 ± 0,2
sc(C61 L <sub>4</sub> )(C49* C62*)_Azo	6,6 ± 0,9
sc(C61 L <sub>4</sub> )(C49* C62*)(F94)_Azo	16,0 ± 2,0
sc(C61 L <sub>4</sub> )(C49* C62*)(F94) <sub>2</sub> _Azo	16,3 ± 1,3

1. Blaues Licht → 2. UV Licht



**Abb. 3-10 Aktivitätstest unter spezifischer Belichtung von sc(C61 L<sub>4</sub>)(C49\* C62\*)(F94)<sub>2</sub>\_Azo nach Vor-Belichtung der modifizierten Probe mit blauem Licht → UV -Licht:** Gezeigt ist die gelelektrophoretische Analyse von Aliquots der Spaltungsreaktion (4 nM DNA, 30 nM Enzym) nach bestimmten Zeitintervallen (oben) zusammen mit dem dazugehörigen Graphen von linearisiertem Produkt gegen die Zeit (unten).

Die gemessenen „*cis/trans*“-Effekte der verschiedenen Linker-Varianten sind in Abb. 3-11 zusammenfassend dargestellt.

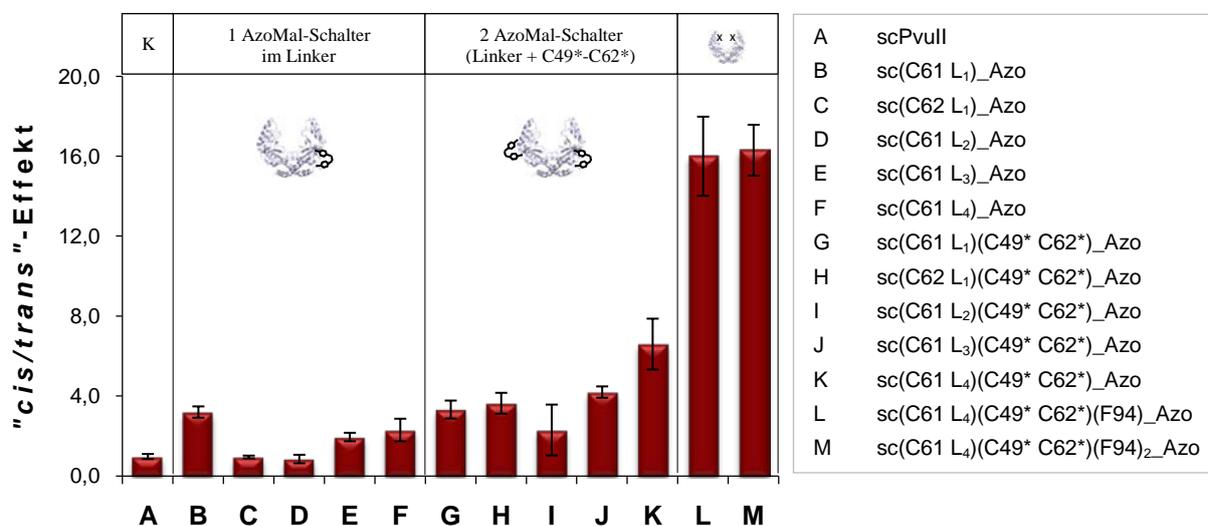


Abb. 3-11 Zusammenstellung der „*cis/trans*“-Effekte von scPvuII-Varianten mit Azobenzol-Schaltern in der Linker-Region

### 3.1.4.6 Vergleich der entsprechenden Azobenzol-Schalter in scPvuII und WT PvuII

Aufgrund der Tatsache, dass sich mit die bisher größten „*cis/trans*“-Effekte bei scPvuII-Varianten mit identischen Modifikationen in der N- und C- terminalen Hälfte ergaben, insbesondere bei sc(C49 C62)<sub>2</sub> und bei sc(C49 C62)<sub>2</sub>(F94)<sub>2</sub>, wurden die entsprechenden Variationen ebenfalls in den WT PvuII eingeführt und nach Modifikation auf lichtensitive Effekte hin untersucht (Tab. 3-8). Dabei zeigten die Varianten im WT PvuII jeweils einen geringeren „*cis/trans*“-Effekt, vermutlich da sich die homodimeren Varianten aufgrund der höheren Flexibilität besser an die durch die *cis/trans*-Konfiguration des angehängten Azobenzol-Moleküls hervorgerufenen Spannungen anpassen können.

Tab. 3-8 Varianten mit zwei Azobenzol-Schaltern in scPvuII und WT PvuII: *cis/trans*-Effekte der relativen Aktivitäten ( $\pm$  S.D.)

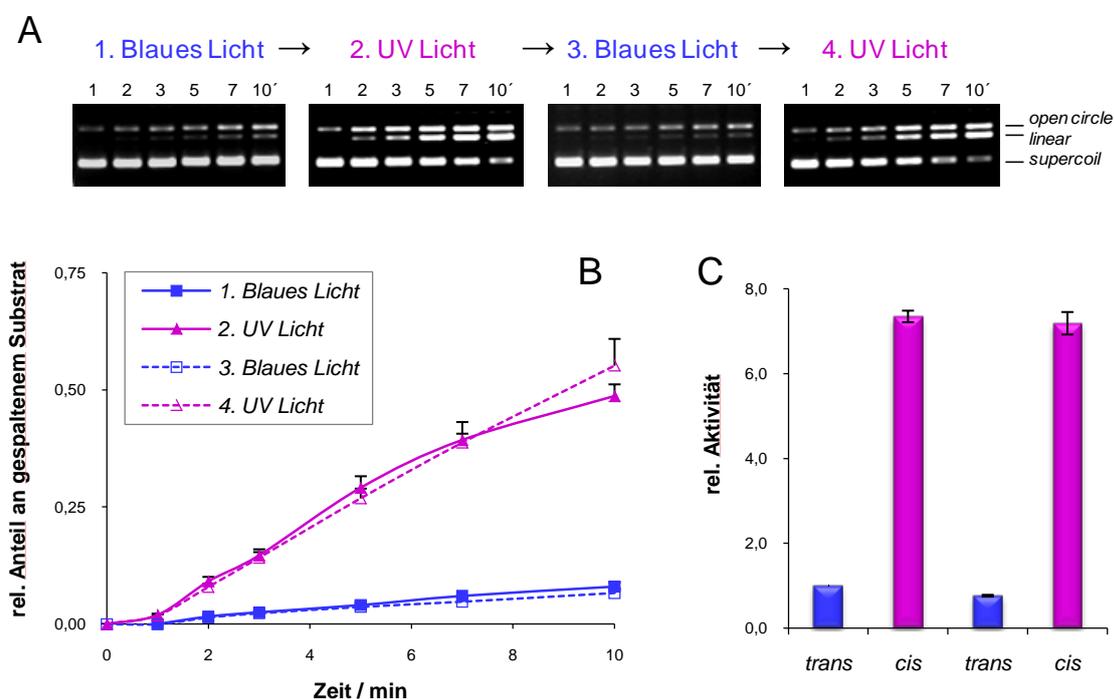
Variante	„ <i>cis/trans</i> “-Effekt
sc(C49 C62) <sub>2</sub> _Azo	7,2 $\pm$ 0,3
sc(C49 C62) <sub>2</sub> (F94) <sub>2</sub> _Azo	15,8 $\pm$ 2,4
wt(C49 C62) <sub>2</sub> _Azo	5,2 $\pm$ 0,5
wt(C49 C62) <sub>2</sub> (F94) <sub>2</sub> _Azo	6,3 $\pm$ 0,2

### 3.1.5 Charakterisierung der lichtschaltbaren Varianten von scPvuII

Im Folgenden wurden die Eigenschaften der lichtsteuerbaren Kontrolle der enzymatischen Aktivität über angehängte bi-funktionelle Azobenzol-Schalter näher charakterisiert. Dabei wurden die Varianten  $sc(C49\ C62)_2\_Azo$ , die alleine durch zwei angehängte Azobenzol-Schalter einen „*cis/trans*“-Effekt von 7 erzielt, und die Variante  $sc(C49\ C62)_2(F94)_2$ , die durch die zwei Modifikationen und zusätzliche Substitutionen den bisher größten „*cis/trans*“-Effekt von 16 erreicht hat, näher untersucht.

#### 3.1.5.1 Reversible lichtsteuerbare Kontrolle der Enzymaktivität

Um die Reversibilität des *Photoswitchs* zu demonstrieren, wurde die Variante  $sc(C49\ C62)_2\_Azo$  einem kontinuierlichen Aktivitätstest unter spezifischer Belichtung (blaues Licht → UV-Licht → blaues Licht → UV-Licht) unter Vor-beleuchtung der modifizierten Probe unterzogen (Abb. 3-12). Nach der ersten Aktivierung durch UV-Licht konnte die Aktivität durch Belichtung mit blauem Licht komplett auf den Level des ersten *trans*-Zustands reduziert werden. Anschließende Bestrahlung mit UV-Licht führte erneut zu einer 7-fachen

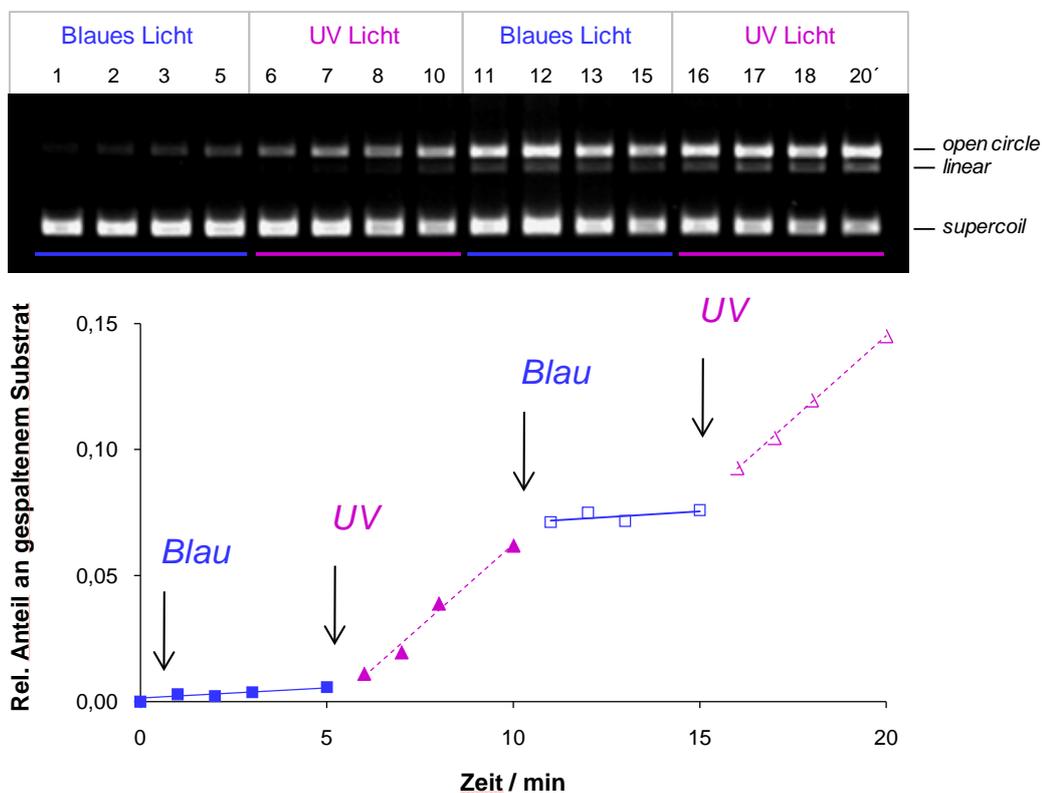


**Abb. 3-12** Aktivitätstest unter spezifischer Belichtung von  $sc(C49\ C62)_2\_Azo$  nach Vor-Belichtung der modifizierten Probe über mehrere Runden (blaues Licht → UV -Licht → blaues Licht → UV-Licht): Gezeigt ist die gelelektrophoretische Analyse von Aliquots der Spaltungsreaktionsansätze (4 nM DNA, 0,5 nM Enzym) nach bestimmten Zeitintervallen (A) zusammen mit dem dazugehörigen Graphen von linearisiertem Produkt gegen die Zeit (B) und der jeweiligen normierten relativen Aktivität (Aktivität (1. Blaues Licht) = 1).

### 3. Ergebnisse

Steigerung der Aktivität ohne Einbußen im Vergleich zum ersten *cis*-Zustand. Für die Variante  $sc(C49\ C62)_2(F94)_2\_Azo$  konnte die reversible Kontrolle über die Enzymaktivität entsprechend nachgewiesen werden (vgl. Abb. 3-14).

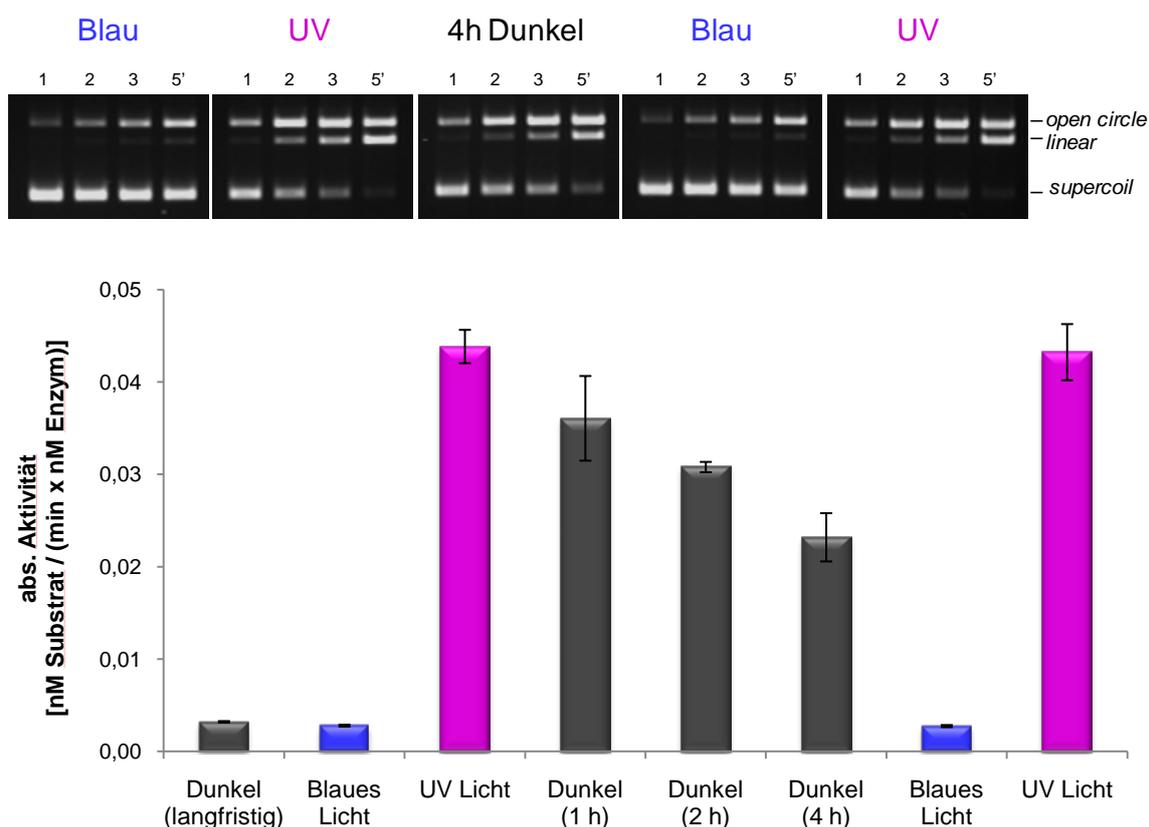
Die reversible Kontrolle der Aktivität über spezifische Belichtung konnte zudem auch während der Spaltungsreaktion *in situ* gezeigt werden, indem die Belichtung zwischen blauem Licht und UV-Licht während der Spaltung kontinuierlich abgewechselt wurde. Dadurch konnte für die Variante  $sc(C49\ C62)_2\_Azo$  (nicht gezeigt, aber analog zu Abb. 3-13 mit 7-fachem Unterschied der Spaltungsraten) und die Variante  $sc(C49\ C62)_2(F94)_2\_Azo$  (Abb. 3-13) demonstriert werden, dass die Spaltungsraten unmittelbar und reproduzierbar die entsprechende spezifische Belichtungsart widerspiegeln.



**Abb. 3-13 Reversible Kontrolle der DNA Spaltungsaktivität von  $sc(C49\ C62)_2(F94)_2\_Azo$  *in situ*:** Die Spaltungsreaktion (4 nM DNA, 0,72 nM Enzym) wurde *in situ* verfolgt unter Variation der Belichtung (Blaues Licht: 0 - 5 min, UV-Licht: 5 - 10 min, Blaues Licht: 10 - 15 min, UV-Licht 15 - 20 min). Gezeigt ist die gelelektrophoretische Analyse von Aliquots des Spaltungsreaktionsansatzes nach bestimmten Zeitintervallen (oben) zusammen mit dem dazugehörigen Graphen von linearisiertem Produkt gegen die Zeit (unten).

### 3.1.5.2 Thermische Relaxation der über die Azobenzol-Schalter lichtgesteuerten Enzymaktivität

Um zu überprüfen, ob sich die enzymatische Aktivität, die durch angehängte Azobenzol-Schalter in der *cis*-Konfiguration bedingt ist, gemäß dem thermischen Relaxationsverhalten (*cis* → *trans*) von freiem Azobenzol (19, 43) verhält und somit entsprechend der Relaxation des angehängten Azobenzols in die *trans*-Konfiguration ebenfalls vergleichbar abnimmt, wurde die Variante  $sc(C49\ C62)_2(F94)_2\_Azo$  dahingehend untersucht (Abb. 3-14). Dazu wurde das modifizierte Protein nach anfänglicher Belichtung mit UV-Licht für 4 h im Dunkeln bei 4 °C inkubiert. Nach 1, 2 und 4 h wurden jeweils Proben entnommen und diese je einem Aktivitätstests im Dunkeln unterzogen. An die Inkubation im Dunkeln schließt sich ein Belichtungsschritt mit blauem Licht zum Erreichen des minimalen „*trans*“-Aktivitätslevels und ein erneuter Aktivierungsschritt unter UV-Licht als Kontrolle an. Passt

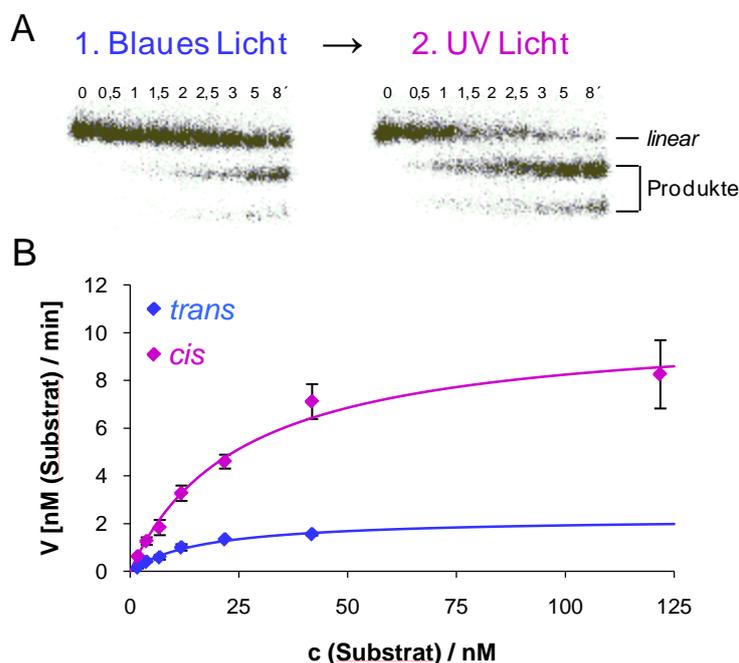


**Abb. 3-14** Aktivitätstest unter spezifischer Belichtung von  $sc(C49\ C62)_2(F94)_2\_Azo$  unter Vor-Belichtung der modifizierten Probe mit zwischenzeitlicher Inkubation im Dunkeln für 4 h bei 4 °C (blaues Licht → UV-Licht → Dunkel → blaues Licht → UV-Licht): Gezeigt ist die gelelektrophoretische Analyse von Aliquots der Spaltungsreaktionsansätze (4 nM DNA, 12 nM Enzym) unterschiedlicher Belichtungszustände nach bestimmten Zeitintervallen (oben) zusammen mit den dazugehörigen absoluten Aktivitäten jedes Belichtungszustands (unten).

man die erhaltenen abnehmenden Werte der Aktivität bei Inkubation im Dunkeln an ein einfaches exponentielles Zeitgesetz an, so erhält man für die Relaxation der enzymatischen Aktivität des modifizierten Proteins eine Halbwertszeit  $t_{1/2}$  von  $\sim 6$  h bei  $4^\circ\text{C}$ . Des Weiteren führt ein zusätzlicher Belichtungsschritt mit blauem Licht zu einem sofortigen Rückgang der enzymatischen Aktivität auf den minimalen „*trans*“ Level, der ebenfalls durch langfristige Inkubation im Dunkeln (1 - 2 Tage) erreicht wird. Der abschließende Belichtungsschritt durch UV-Licht mit einem dem anfänglichen „*cis*“-Belichtungszustand analogen Aktivitätslevel zeigt neben der Reversibilität des *Photoswitch*-Prozesses auch, dass es bei der langfristigen Inkubation im Dunkeln zu keiner Inaktivierung des modifizierten Proteins gekommen ist.

### 3.1.5.3 Mechanistische Analyse des Lichtschalter-Effekts

Die größten „*cis/trans*“-Effekte wurden bei Varianten erhalten, die die Azobenzol-Schalter nahe dem aktiven Zentrum besitzen. Daher wurde zur näheren Analyse des Mechanismus von querverknüpftem Azobenzol als Lichtschalter die Variante  $\text{sc}(\text{C49 C62})_2\text{Azo}$ , die mit einem



**Abb. 3-15 Michaelis-Menten-Kinetik von  $\text{sc}(\text{C49 C62})_2\text{Azo}$  unter spezifischer Belichtung:** In (A) die autoradiographische Analyse einer exemplarischen Spaltungsreaktion eines 229 bp langen, radioaktiv markiertem PCR-Produkts unter blauem bzw. UV-Licht (3,8 nM DNA, 2,4 nM Enzym). In (B) die *steady-state* kinetische Analyse der modifizierten Variante; die Kurven repräsentieren die anfänglichen DNA-Spaltungsraten unter Belichtung mit blauem bzw. UV-Licht. Die gezeichneten Kurven sind das Ergebnis einer nicht-linearen Regressionsanalyse, wobei gilt: *cis*:  $K_m = 25,4 \pm 2,9$  nM und  $V_{\max} = 10,3 \pm 0,9$  nM  $\text{min}^{-1}$ ; *trans*:  $K_m = 16,7 \pm 1,3$  nM und  $V_{\max} = 2,2 \pm 0,1$  nM  $\text{min}^{-1}$

„*cis/trans*“-Effekt von ~7 den höchsten Wert der Varianten mit zwei Azobenzol-Schaltern besitzt (Abb. 3-7) und somit als Ausgangspunkt für zusätzliche Substitutionen diente (Abb. 3-9), einer kinetischen Analyse nach Michaelis-Menten unter spezifischer Belichtung unterzogen. Dabei zeigte die modifizierte Variante einen  $K_m$ -Wert von  $25,4 \pm 2,9$  nM und ein  $V_{max}$  von  $10,3 \pm 0,9$  nM min<sup>-1</sup> im *cis*-Zustand und einen  $K_m$ -Wert von  $16,7 \pm 1,3$  nM und ein  $V_{max}$  von  $2,2 \pm 0,1$  nM min<sup>-1</sup> im *trans*-Zustand, was bedeutet, dass der Effekt hauptsächlich auf Unterschieden in  $V_{max}$  beruht.

### 3.1.6 Übersicht der *Photoswitch*-Effekte

In Tab. 3-9 sind zusammenfassend alle im Rahmen des *Photoswitch*-Projekts produzierten und getesteten Varianten unter Angabe der absoluten Aktivitäten in *trans* und *cis* und des „*cis/trans*“-Effekts der relativen Aktivitäten aufgeführt.

**Tab. 3-9 Übersicht der *Photoswitch*-Effekte der verwendeten Varianten unter Angabe der absoluten Aktivität in *trans* und *cis* und des *cis/trans*-Effekts der relativen Aktivitäten (jeweils  $\pm$  S.D.), n.b. = nicht bestimmt (da keine Konzentrationsbestimmung vorgenommen wurde)**

Typ der Modifikation	Variante	Absolute Aktivität [nM Substrat / (min x nM Enzym)]		„ <i>cis/trans</i> “-Effekt
		<i>trans</i>	<i>cis</i>	
Unmodifiziert	sc	2,4 $\pm$ 0,1	2,3 $\pm$ 0,2	1,0 $\pm$ 0,1
	sc(C49 C62) <sub>2</sub>	2,2 $\pm$ 0,4	2,2 $\pm$ 0,1	1,0 $\pm$ 0,1
	sc(C49 C62) <sub>2</sub> (F94) <sub>2</sub>	0,49 $\pm$ 0,07	0,48 $\pm$ 0,07	1,0 $\pm$ 0,0
Ein Azobenzol-Schalter	sc(C49 C62)_Azo	n.b.	n.b.	2,2 $\pm$ 0,0
	sc(C66 C96)_Azo	n.b.	n.b.	2,3 $\pm$ 0,4
	sc(C74 C110)_Azo	n.b.	n.b.	1,1 $\pm$ 0,2
	sc(C89 C96)_Azo	n.b.	n.b.	1,1 $\pm$ 0,1
	sc(C129 C133)_Azo	n.b.	n.b.	1,1 $\pm$ 0,0
	sc(C147 C151)_Azo	n.b.	n.b.	1,5 $\pm$ 0,0
Zwei Azobenzol-Schalter	sc(C49 C62) <sub>2</sub> _Azo	0,074 $\pm$ 0,02	0,52 $\pm$ 0,11	7,2 $\pm$ 0,3
	sc(C66 C96) <sub>2</sub> _Azo	n.b.	n.b.	3,4 $\pm$ 1,0
	sc(C74 C110) <sub>2</sub> _Azo	n.b.	n.b.	3,0 $\pm$ 1,0
	sc(C147 C151) <sub>2</sub> _Azo	n.b.	n.b.	1,1 $\pm$ 0,2
Vier Azobenzol-Schalter	sc(C49 C62) <sub>2</sub> (C66 C96) <sub>2</sub> _Azo	n.b.	n.b.	2,4 $\pm$ 0,4
	sc(C49 C62) <sub>2</sub> (C74 C110) <sub>2</sub> _Azo	n.b.	n.b.	1,9 $\pm$ 0,2
	sc(C49 C62) <sub>2</sub> (C66 C96)(C74* C110*)_Azo	n.b.	n.b.	2,2 $\pm$ 0,4
Zwei Azobenzol-Schalter und zusätzliche Mutationen	sc(C49 C62) <sub>2</sub> (A83)_Azo	0,079 $\pm$ 0,007	0,49 $\pm$ 0,04	6,2 $\pm$ 0,5
	sc(C49 C62) <sub>2</sub> (A83) <sub>2</sub> _Azo	0,014 $\pm$ 0,007	0,14 $\pm$ 0,06	10,4 $\pm$ 2,9
	sc(C49 C62) <sub>2</sub> (F94)_Azo	0,008 $\pm$ 0,004	0,11 $\pm$ 0,06	14,7 $\pm$ 2,3
	sc(C49 C62) <sub>2</sub> (F94) <sub>2</sub> _Azo	0,0027 $\pm$ 0,0005	0,042 $\pm$ 0,013	15,8 $\pm$ 2,4
	sc(C49 C62) <sub>2</sub> (A83) <sub>2</sub> (F94)_Azo	0,0064 $\pm$ 0,0014	0,033 $\pm$ 0,001	5,4 $\pm$ 1,1
	sc(C49 C62) <sub>2</sub> (A83) <sub>2</sub> (F94) <sub>2</sub> _Azo	0,0019 $\pm$ 0,0002	0,0050 $\pm$ 0,0009	2,6 $\pm$ 0,2
Ein Azobenzol-Schalter betreffend die Linker-Region	sc(C61 L <sub>1</sub> )_Azo	n.b.	n.b.	3,2 $\pm$ 0,3
	sc(C62 L <sub>1</sub> )_Azo	n.b.	n.b.	1,0 $\pm$ 0,1
	sc(C61 L <sub>2</sub> )_Azo	0,16 $\pm$ 0,02	0,13 $\pm$ 0,01	0,9 $\pm$ 0,2
	sc(C61 L <sub>3</sub> )_Azo	0,093 $\pm$ 0,001	0,18 $\pm$ 0,01	2,0 $\pm$ 0,1
	sc(C61 L <sub>4</sub> )_Azo	0,11 $\pm$ 0,02	0,24 $\pm$ 0,01	2,3 $\pm$ 0,4

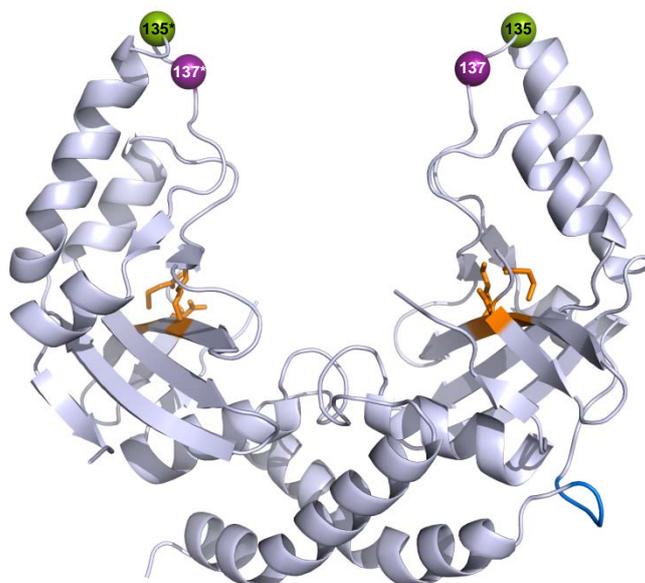
### 3. Ergebnisse

Typ der Modifikation	Variante	Absolute Aktivität [nM Substrat / (min x nM Enzym)]		"cis/trans"-Effekt
		trans	cis	
Zwei Azobenzol-Schalter betreffend die Linker-Region	sc(C61 L <sub>1</sub> )(C49* C62*)_Azo	n.b.	n.b.	3,3 ± 0,4
	sc(C62 L <sub>1</sub> )(C49* C62*)_Azo	n.b.	n.b.	3,6 ± 0,5
	sc(C61 L <sub>2</sub> )(C49* C62*)_Azo	0,040 ± 0,023	0,073 ± 0,017	2,3 ± 0,9
	sc(C61 L <sub>3</sub> )(C49* C62*)_Azo	0,021 ± 0,005	0,085 ± 0,015	4,2 ± 0,2
	sc(C61 L <sub>4</sub> )(C49* C62*)_Azo	0,019 ± 0,006	0,12 ± 0,02	6,6 ± 0,9
	sc(C61 L <sub>4</sub> )(C49* C62*)(F94)_Azo	0,0014 ± 0,0001	0,022 ± 0,005	16,0 ± 2,0
	sc(C61 L <sub>4</sub> )(C49* C62*)(F94) <sub>2</sub> _Azo	0,00035 ± 0,00001	0,0058 ± 0,0005	16,3 ± 1,3
Zwei Modifikationen im Homodimer	wt(C49 C62) <sub>2</sub> _Azo	0,089 ± 0,010	0,46 ± 0,01	5,2 ± 0,5
	wt(C49 C62) <sub>2</sub> (F94) <sub>2</sub> _Azo	0,011 ± 0,002	0,069 ± 0,008	6,3 ± 0,2

## 3.2 Photogate-Strategie von PvuII

### 3.2.1 Varianten für die Modifikation mit mono-funktionellen Azobenzol-Derivaten

Für diese Strategie wurden Positionen gesucht, die am Eingang der DNA-Bindungsstelle positioniert sind und nach symmetrischer Modifikation mit mono-funktionellen Azobenzol-Derivaten in beiden Hälften den Zugang der DNA zum aktiven Zentrum je nach Konfiguration des angehängten Azobenzols sterisch blockieren oder zulassen. Die Aminosäuren G135 und K137 sind entsprechend lokalisiert, zeigen die richtige Orientierung und besitzen einen Abstand in der Struktur von scPvuII von ~ 25 - 35 Å (Tab. 3-10), welcher durch zwei Azobenzol-Moleküle in der *trans*-Konfiguration überspannt werden kann. Die gewählten Positionen wurden durch Cysteine substituiert und so kombiniert, dass für die Modifikation mit Azobenzol drei Varianten mit jeweils einem Cystein am Eingang der DNA-Bindungsstelle in jeder Hälfte



**Abb. 3-16** Gewählte Positionen von scPvuII für die Modifikation mit mono-funktionellen Azobenzol-Derivaten: G135 und K137 sind am Eingang der DNA-Bindungsstelle positioniert.

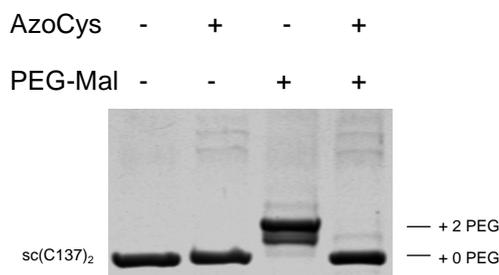
(Doppel-Cystein-Variante) und eine Variante mit jeweils zwei entsprechenden Cysteinen pro Hälfte (Quadrupel-Cystein-Variante) zur Verfügung standen.

**Tab. 3-10** Liste aller für das *Photogate* produzierten Varianten unter Angabe ihrer abgeschätzten relativen DNA Spaltungsaktivität (Variante / scPvuII) und dem berechneten C $\gamma$  - Abstand. Die relative Aktivität ist angegeben als +++ (scPvuII Aktivität), ++ ( $1 \cdot 10^{-1}$  der scPvuII Aktivität) und + ( $10^{-1} - 10^{-2}$  der scPvuII Aktivität), der berechnete C $\gamma$  - Abstand basiert auf der Struktur von scPvuII (111).

Variante	Rel. Aktivität	C $\gamma$ - Abstand / Å
sc	+++	-
sc(C135) <sub>2</sub>	++	34,6
sc(C137) <sub>2</sub>	++	25,7
sc(C135)(C137*)	++	30,4
sc(C135) <sub>2</sub> (C137) <sub>2</sub>	+	34,6 + 25,7

### 3.2.2 Modifikation und Aufreinigung Azobenzol-modifizierter Varianten

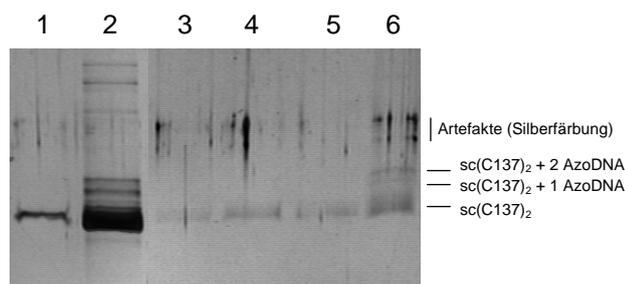
Die Modifikation erfolgte mit einem 5 - 10 fachen Überschuss jedes mono-funktionellen Azobenzol-Derivats (über Cystein-Reste der entsprechenden Variante) für 10 min bei RT und führte bei den bereits vor-synthetisierten Derivaten AzoOH, AzoCOOH und AzoCys (erhalten von Le Thi Hien, Lomonossov Universität Moskau) zu einer Modifikationsausbeute von > 80 % (Abb. 3-17). Die Modifikation mit dem synthetisierten AzoDNA-Konstrukt führte, ersichtlich durch den Massen-*shift* durch das angehängte Azobenzol-Oligonukleotid-Konstrukt in der SDS-PAGE Analyse, nur zu einer Ausbeute der vollständig mit AzoDNA-modifizierten Varianten von ~ 5 %, was womöglich auf eine Inhomogenität des eingesetzten Modifikations-Konstrukts zurückzuführen ist.



**Abb. 3-17** Analyse der Modifikation von sc(C137)<sub>2</sub> mit AzoCys durch SDS-PAGE: Durch sekundäre Modifikation mit PEG-Maleimid ergibt sich eine Modifikationsausbeute von ~ 85 %.

Die Aufreinigung der mit AzoOH und AzoCOOH modifizierten Varianten erfolgte wie beschrieben über Gelfiltration, die AzoCys und AzoDNA modifizierten-Proben wurden

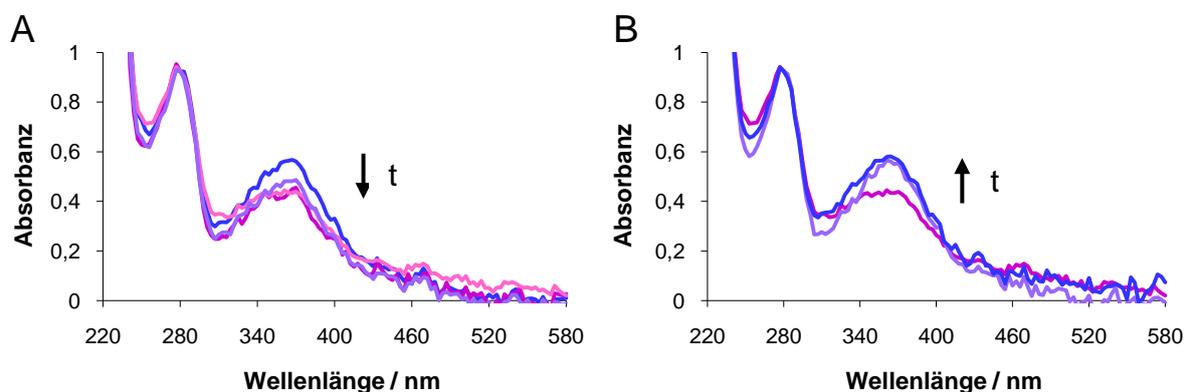
zusätzlich einer Anionenaustauschchromatographie unterzogen. Während bei den mit AzoDNA modifizierten Proben, die Aufreinigung nur zu einer Anreicherung des gewünschten Produktes auf ~ 20 - 30 % führte (Abb. 3-18 Spur 6), wurden bei den restlichen modifizierten Proben die jeweils dem alleinigen Azobenzol-enthaltenden Hauptpeak entsprechenden Eluate gesammelt und für weitere Aktivitätstests unter spezifischer Belichtung eingesetzt.



**Abb. 3-18 Analyse der Aufreinigung von  $sc(C137)_2$ \_AzoDNA durch SDS-PAGE mit Silberfärbung:** Aufgetragen sind neben der unmodifizierten Kontrolle (1) die modifizierte, unaufgereinigte (2) Variante und die Elutionsfraktionen der Anionenaustauschchromatographie von 200 - 400 nM KCl (3) - (6).

### 3.2.3 Lichtinduzierte Isomerisierung von Protein gebundenem, mono-funktionellen Azobenzol

Da die Konzentration an modifiziertem Protein, das lediglich durch Gelfiltration aufgereinigt wurde, ausreichend groß ist, um damit spektroskopische Messungen durchzuführen, kann die Isomerisierung von an das Protein gebundenem, mono-funktionellen Azobenzol direkt



**Abb. 3-19 Lichtinduzierte Isomerisierung der angebundenen Azobenzol-Modifikationen von  $sc(C137)_2$ \_AzoCOOH:** (A) *trans* → *cis* Isomerisierung des an  $sc(C137)_2$  angebundenen AzoCOOH in Dialysepuffer durch Belichtung mit UV-Licht für 0, 1, 2 und 3 min. (B) *cis* → *trans* Isomerisierung des an  $sc(C137)_2$  angebundenen AzoCOOH in Dialysepuffer durch Belichtung mit blauem Licht für 0, 1 und 2 min.

verfolgt werden (Abb. 3-19). Innerhalb von jeweils einer Minute ist dabei die Isomerisierung in die entsprechende andere Konfiguration vollzogen. Der Amplituden-Unterschied der Extinktion bei 370 nm zwischen den Belichtungszuständen mit blauem bzw. UV-Licht ist dabei relativ gering, deckt sich jedoch mit der Isomerisierungsspektren von freiem Azobenzol in Dialysepuffer (nicht gezeigt) und mit publizierten Daten (43, 135).

#### 3.2.4 Aktivitätstests unter spezifischer Belichtung

##### 3.2.4.1 „Cis/trans“-Effekte der modifizierten Varianten

Die modifizierten und aufgereinigten Varianten wurden einem Aktivitätstest unter spezifischer Belichtung mit Vor-Belichtung der modifizierten Probe unterzogen (Tab. 3-11). Dabei ergaben sich bei den mit AzoOH und AzoCOOH modifizierten Varianten lediglich kleine gemessene „cis/trans“-Effekte ( $< 1,9$ ). Auffallend war jedoch die modifizierte Variante  $sc(C135)_2(C137)_2$ , bei der eine zusätzliche *star*-Aktivität beobachtet werden konnte, was in Punkt 3.2.4.2 näher beschrieben wird.

Die Varianten, die mit AzoCys modifiziert wurden, wurden vor der Zugabe von Substrat-DNA mit 10 mM  $MgCl_2$  für 30 min auf Eis im Dunkeln inkubiert, um eine mögliche Komplex-Bildung der in räumlicher Nähe befindlichen Cystein-Endgruppen zu ermöglichen. Bei der Variante  $sc(C135)_2\_AzoCys$  erfolgte ebenfalls eine Vorinkubation mit 1  $\mu M$  Cobalt(II)-Sulfat und 10 mM  $MgCl_2$  (unter diesen Bedingungen ist keine Beeinträchtigung der Aktivität von *scPvuII* messbar). Jedoch zeigten sich auch hier keine relevanten „cis/trans“-Effekte ( $< 1,6$ ).

Die Spaltungsreaktionen unter spezifischer Belichtung von angereichertem mit AzoDNA modifiziertem Protein wurden aufgrund der Schmelztemperatur des angehängten Oligonukleotids von 24 °C, bei den Temperaturen 37 °C, RT und 4 °C durchgeführt. Dabei zeigte sich allerdings jeweils kein lichtinduzierter Aktivitätsunterschied, die gemessene absolute Aktivität ging aber entsprechend der verminderten Temperatur bei RT auf etwa 70 % und bei 4 °C auf etwa 20 % der Aktivität gemessen bei 37 °C zurück.

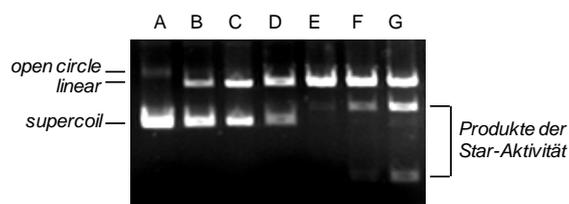
In Tab. 3-11 sind die gemessenen „cis/trans“-Effekte der modifizierten Varianten in der *Photogate*-Strategie zusammenfassend dargestellt.

**Tab. 3-11 Übersicht über die *Photogate*-Effekte der verwendeten Varianten unter Angabe etwaiger abweichender Reaktionsbedingungen und des gemessenen „*cis/trans*“-Effekts der relativen Aktivitäten (unter Verwendung von 10 mM Mg<sup>2+</sup>); (⊠) = Beobachtete Star-Aktivität unter den Bedingungen des Standard-Aktivitätstests unter Vorbelichtung der modifizierten Probe**

	Variante	abweichende Reaktionsbedingungen	„ <i>cis/trans</i> “-Effekt
	sc	-	1.0 ± 0.1
AzoOH	sc(C135) <sub>2</sub> _AzoOH	-	1,7
	sc(C137) <sub>2</sub> _AzoOH	-	1,9
	sc(C135)(C137*)_AzoOH	-	1,0
	sc(C135) <sub>2</sub> (C137) <sub>2</sub> _AzoOH	-	1,0 (⊠)
AzoCOOH	sc(C135) <sub>2</sub> _AzoCOOH	-	1,2
	sc(C137) <sub>2</sub> _AzoCOOH	-	1,8
	sc(C135)(C137*)_AzoCOOH	-	0,8
	sc(C135) <sub>2</sub> (C137) <sub>2</sub> _AzoCOOH	-	1,0 (⊠)
AzoCys	sc(C135) <sub>2</sub> _AzoCys	Vorinkubation mit 10 mM Mg <sup>2+</sup>	1,4
	sc(C137) <sub>2</sub> _AzoCys	Vorinkubation mit 10 mM Mg <sup>2+</sup>	1,0
	sc(C135)(C137*)_AzoCys	Vorinkubation mit 10 mM Mg <sup>2+</sup>	1,6
	sc(C135) <sub>2</sub> (C137) <sub>2</sub> _AzoCys	Vorinkubation mit 10 mM Mg <sup>2+</sup>	1,2
	sc(C135) <sub>2</sub> _AzoCys	Vorinkubation mit 10 mM Mg <sup>2+</sup> + 1 μM Co <sup>2+</sup>	1,1
AzoDNA	sc(C135) <sub>2</sub> _AzoDNA	-	1,1
	sc(C135) <sub>2</sub> _AzoDNA	Spaltung bei RT	0,9
	sc(C135) <sub>2</sub> _AzoDNA	Spaltung bei 4 °C	1,1
	sc(C137) <sub>2</sub> _AzoDNA	-	1,1
	sc(C137) <sub>2</sub> _AzoDNA	Spaltung bei RT	1,1
	sc(C137) <sub>2</sub> _AzoDNA	Spaltung bei 4 °C	0,9

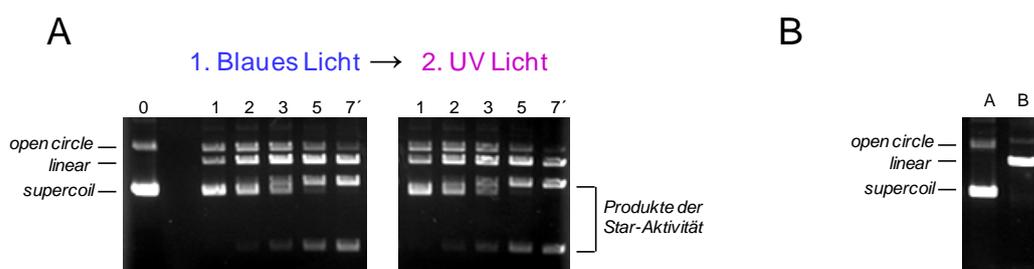
### 3.2.4.2 Star-Aktivität der modifizierten Variante sc(C135)<sub>2</sub>(C137)<sub>2</sub>\_AzoOH/COOH

Die mit AzoOH bzw. AzoCOOH modifizierten Variante sc(C135)<sub>2</sub>(C137)<sub>2</sub> zeigte bei den Aktivitätstests zwar keinen Unterschied in der DNA Spaltung aufgrund spezifischer Belichtung, das zunächst linearisierte Substratplasmid (mit einer PvuII-Spaltungssequenz) wurde jedoch anschließend erneut gespalten (Abb. 3-21 A). Es ist bekannt, dass der WT PvuII bei hohem Überschuss von Enzym über DNA an Spezifität verliert und auch an sogenannten



**Abb. 3-20 Star-Aktivität von WT PvuII:** Gelelektrophoretische Analyse der Spaltung von pAT153 tri (4 nM, 1 PvuII - Spaltsequenz) durch unterschiedliche Konzentrationen an WT PvuII für 10 min bei 37 °C (A = Kontrolle, B - G = 0,0004 - 400 nM Enzym)

*star*-Spaltungssequenzen, die von der PvuII-Spaltungssequenz in einem Nukleotid abweichen, eine DNA-Spaltung ausführt (146). Unter den in dieser Arbeit verwendeten Spaltungsbedingungen zeigt sich diese *star*-Aktivität von WT PvuII bei einem Verhältnis von 4 nM Substratplasmid gegenüber 40 nM Enzym (Abb. 3-20). ScPvuII und alle anderen Varianten (auch modifiziert) zeigen diese *star*-Aktivität unter den gewählten Bedingungen jedoch nicht. Lediglich die Variante sc(C135)<sub>2</sub>(C137)<sub>2</sub>\_AzoOH/COOH zeigt dieses *star*-Aktivität-Spaltungsmuster der Substratplasmids bereits bei 4 nM DNA und 20 nM Enzym, wobei die absolute Aktivität der Variante im Vergleich zum WT PvuII deutlich reduziert ist ( $\sim 10^{-3}$ ). Zur Kontrolle wurde die modifizierte und unmodifizierte Variante sc(C135)<sub>2</sub>(C137)<sub>2</sub> mit einem unspezifischen Plasmid (keine PvuII-Spaltungsstelle) inkubiert (4 nM DNA, 200 nM Enzym), wobei das unmodifizierte Protein keine Spaltungsaktivität zeigt, das modifizierte Protein das unspezifische Plasmid jedoch linearisiert (Abb. 3-21 B).



**Abb. 3-21 Licht-unabhängige *star*-Aktivität von sc(C135)<sub>2</sub>(C137)<sub>2</sub>\_AzoOH:** (A) Gelelektrophoretische Analyse von Aliquots eines Aktivitätstests unter spezifischer Belichtung (4 nM pAT153 tri (1 PvuII-Spaltsequenz), 20 nM Enzym) nach bestimmten Zeitintervallen. (B) Gelelektrophoretische Analyse der Spaltung von unspezifischer Plasmid-DNA (pASK45+, keine PvuII-Spaltsequenz, 4 nM) durch 200 nM von unmodifiziertem sc(C135)<sub>2</sub>(C137)<sub>2</sub> (Spur A) und sc(C135)<sub>2</sub>(C137)<sub>2</sub>\_AzoOH (Spur B).

Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass durch die zwei Azobenzol-Modifikationen an dem Eingang der DNA-Bindungsstelle auf beiden Hälften des Enzyms, die Dissoziation von der DNA nach erfolgter Bindung durch eine Art „Umzingeln“ der DNA vermindert ist, wodurch aufgrund der erhöhten lokalen Konzentration von modifiziertem Enzym auf der DNA ein Spaltung an *star*-Spaltungssequenzen stattfindet. Dagegen findet ein angestrebtes Blockieren der anfänglichen DNA-Bindung durch die angehängten Azobenzol-Moleküle in einer lichtabhängigen Art und Weise nicht statt.

### 4. Diskussion

Für viele Anwendungen in der biotechnologischen und biomedizinischen Forschung wäre es von großem Nutzen, wenn die Aktivität von Enzymen auf einfache Art und Weise durch das Anbringen eines externen Schalters zeitlich regulierbar wäre, wobei das „An“- und „Aus“-Schalten der enzymatischen Aktivität über ein externes Trigger-Signal wie beispielsweise Licht erfolgen könnte. In der Literatur gibt es bisher viele verschiedene Ansätze (Tab. 1-1 und 1-2), dies durch chemische Modifikation mit Azobenzol-Schalter-Molekülen zu erreichen, jedoch konnte bisher kein System geschaffen werden, in dem die enzymatische Aktivität in einem hohen Maße durch Belichtung reversibel gesteuert werden kann. Daher soll diese Arbeit als „*proof-of-principle*“ anhand des Modellenzym scPvuII darüber Aufschluss geben, ob es möglich ist, die Aktivität dieses Enzyms durch Anbringen von Azobenzol-Schalter-Molekülen durch Belichtung regulieren zu können. Anschließend muss geprüft werden, ob das System der Lichtschaltung auf andere Enzyme übertragbar ist und ob es für zukünftige Anwendungen in der Zelle zum Einsatz kommen kann.

#### 4.1 *Photoswitch*-Strategie von scPvuII

Das Anbringen von bi-funktionellen Azobenzol-Schaltern bei dieser Strategie bietet den Vorteil, dass die lichtinduzierte Isomerisierung von der kompakten *cis*- in die ausgedehnte *trans*-Konfiguration in einem aktiven Prozess die entstandenen Längenunterschiede des Schalter-Moleküls direkt auf die Konformation des Proteins übertragen kann. Jedoch muss das gewünschte Modifikationsprodukt, bei dem beide Cysteine einer Crosslink-Stelle durch den angehängten Azobenzol-Schalter querverknüpft sind, durch Aufreinigung von den bei der Modifikation entstandenen Nebenprodukten zunächst in einer möglichst reinen Form gewonnen werden, um die eigentlichen *Photoswitch*-Effekte messen zu können.

##### 4.1.1 Auswahl der Positionen

Für die *Photoswitch*-Strategie wurden anhand der Struktur von scPvuII Crosslink-Stellen für die Modifikation von bi-funktionellen Azobenzol-Derivaten in einem „*trail-and-error*“ Prozess ausgewählt und nach anschließender Modifikation weiter auflichtschaltbare Effekte hin untersucht. Voraussetzung für Crosslink-Stellen ist es, dass sie sich an kritischen Regionen des Proteins befinden, d.h. insbesondere in der räumlichen Nähe zur Substrat-Bindungsstelle oder zum katalytischen Zentrum.

Da vorhergehende Studien zeigten, dass der helikale Gehalt von kleinen helikalen Proteinen durch Anbringen eines Azobenzol-Schalters durch Licht gesteuert werden kann (44, 45),

wurden Crosslink-Stellen in drei  $\alpha$ -Helices von scPvuII eingeführt (Abb. 3-1 B). Davon sind zwei in der DNA-Bindungssubdomäne (C89-C96 und C129-C133) lokalisiert und eine in der katalytischen Subdomäne (C147-C151). Die Photoisomerisierung von dort angebrachten Azobenzol-Schaltern könnte zu einer partiellen Entfaltung dieser helikalen Bereiche und somit aufgrund einer verminderten DNA-Bindung zu reduzierter Aktivität führen.

Des Weiteren wurden Crosslink-Stellen ausgewählt, bei denen sich der eine Azobenzol-Ansatzpunkt direkt auf den  $\beta$ -Strängen befindet, auf denen auch das katalytische Zentrum (D58, E68 und K70) lokalisiert ist, und sich der andere Ansatzpunkt auf Faltblatt- oder *Loop*-Regionen in umliegenden strukturellen Bereichen befindet (C49-C62, C66-C96 und C74-C110) (Abb. 3-1 A). Die Photoisomerisierung dort angebrachter Azobenzol-Schalter könnte die für die Aktivität optimale Position der katalytisch aktiven Reste dahingehend verändern, dass die Koordination des essentiellen  $Mg^{2+}$ -Ions gestört und somit die katalytische Aktivität des Enzyms vermindert wird.

In einer analogen Strategie wurde ein Ansatzpunkt in der Linker-Region als sterischer Fixpunkt für die Azobenzol-Modifikation gewählt (aufgrund der passenden Orientierung zunächst die Position C161 des Linker<sub>1</sub>) und mit Resten nahe des aktiven Zentrums kombiniert (C61 bzw. C62) (Abb. 3-1 C). Zudem wurde der bestehende 4-Aminosäure-Linker durch drei 8-Aminosäure-Linker (L<sub>2</sub>- L<sub>4</sub>) ersetzt, wobei das Cystein für den Ansatz des Azobenzols dabei jeweils um zwei Positionen variiert wurde. Damit sollte in Kombination mit der Position C61 bzw. C62 die optimale Positionierung des angebrachten Azobenzol-Schalters gefunden werden, bei dem die Photoisomerisierung die größte Kraftübertragung auf das aktive Zentrum hat, so dass sich der größte lichtsichtbare Effekt ergibt.

### 4.1.2 Modifikation und Aufreinigung

Bei der Modifikation von scPvuII-Varianten mit den verschiedenen bi-funktionellen Azobenzol-Derivaten zeigte sich, dass die Kopplung mit Maleimid deutlich effektiver verläuft als mit Iod- bzw. Chloracetamid. Daher wurde trotz des Vorteils, dass AzoCl in wässrigem Milieu im Gegensatz zu AzoMal gut löslich ist, für die Modifikation stets der Crosslinker AzoMal anstelle von AzoIod und AzoCl verwendet, zumal da bei der Reaktion mit AzoMal nach 10 min bei RT sämtliche Cystein-Reste modifiziert werden und überschüssiger Crosslinker durch Zentrifugation und anschließende Gelfiltration komplett abgetrennt werden kann. Dabei ist die Verwendung eines 2 - 2,5 fachen Überschusses an AzoMal (über Cystein-Reste) und eine Proteinkonzentration bei der Modifikation von 5  $\mu$ M so optimiert, dass der relative Anteil an intermolekular querverknüpften Dimeren minimiert ist und sich ein relativer Anteil an vollständig intramolekular modifiziertem Protein von > 70 % ergibt.

Da das erwünschte Produkt, bei dem beide Cysteine einer Crosslink-Stelle über ein AzoMal-Molekül querverknüpft sind, offensichtlich nur einen Teil der Modifikationsprodukte darstellt, erfolgt nach der Modifikation die Aufreinigung dieses gewünschten Produktes über eine sekundäre Kopplung von 2-Mercaptopropionsäure an noch freie Maleimid-Kopplungsgruppen und anschließende Anionenaustauschchromatographie. Das erwünschte querverknüpfte Produkt besitzt nach der Modifikation mit AzoMal keine freien Maleimid-Kopplungsgruppen mehr und erhält so im Gegensatz zu den anderen Nebenprodukten keine zusätzliche negative Ladung. Demnach sollte das erwünschte Produkt als erstes von der Anionenaustauschsäule eluieren, da die Elution der Nebenprodukte durch die zusätzlichen negativen Ladungen erst bei einer höheren Ionenstärke erfolgt.

Die Brauchbarkeit dieses Aufreinigungskonzepts konnte durch einen Testversuch der Aufreinigung einer Einfach-Cystein-Variante von scPvuII, bei der keine intramolekularen Querverknüpfungen erfolgen können, belegt werden. Da sämtliches Protein nach der Modifikation mit AzoMal noch eine freie Maleimid-Kopplungsgruppe besitzt, konnte gezeigt werden, dass durch die Zugabe von 2-Mercaptopropionsäure das Azobenzol-modifizierte Protein erst bei einer höheren Salzkonzentration von der Säule eluierte (Chromatogramm nicht gezeigt).

Bei der Aufreinigung aller AzoMal modifizierten Varianten von scPvuII ergaben sich jeweils mehrere auf Azobenzol zurückzuführende Peaks, die allerdings teilweise ineinander übergehen und nicht komplett getrennt sind (Abb. 3-5). Die Fraktionen, die dem ersten auf Azobenzol zurückzuführenden Peak entsprechen, wurden „scharf geschnitten“ gesammelt und für Aktivitätstests unter spezifischer Belichtung eingesetzt. Bei einer weniger scharfen Fraktionierung, bei der eventuell Anteile der den folgenden Peaks entsprechenden Proteinspezies mit-fraktioniert wurden, wurden auch geringere Effekte unter spezifischer Belichtung erhalten.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die dem ersten Peak entsprechende Fraktion deutlich höhere lichtensitive Effekte aufwies als die daran anschließenden Fraktionen. Testet man nicht zuletzt die „*cis/trans*“-Effekte vor und nach der Aufreinigung, erhielt man für die bisher beste Variante (sc(C49 C62)<sub>2</sub>(F94)<sub>2</sub>\_Azo) einen Wert von 3,4 vor und einen Wert von 15,8 nach der Aufreinigung. Auch der Blick auf die absoluten Aktivitäten in *trans* und *cis* vor und nach der Aufreinigung zeigt deutlich, dass für die Messung des eigentlichen „*cis/trans*“-Effekts einer Variante die Aufreinigung des intramolekular querverknüpften Produktes nötig ist, da ansonsten die lichtunabhängigen Aktivitäten der Nebenprodukte die deutlich geringeren Aktivitäten der querverknüpften Variante in *cis* und *trans* überdecken (Tab. 3-2).

Insgesamt deuten die dargelegten Beobachtungen zusammen mit der Tatsache, dass sich nach erfolgter Aufreinigung eine singuläre Bande bei der elektrophoretischen Analyse ergibt, darauf hin, dass die Aufreinigung erfolgreich verlaufen ist. Jedoch kann auch aufgrund der zu geringen Konzentration an aufgereinigtem Protein, nicht ausgeschlossen werden, dass sich noch Spuren von Nebenprodukten in dem aufgereinigten Ansatz befinden.

### 4.1.3 Schritte zur Entwicklung eines lichtschtbaren Restriktionsenzym

Für die Bewertung der lichtinduzierten Aktivitäten der einzelnen Varianten wird jeweils der „*cis/trans*“-Effekt herangezogen, der durch Normalisierung der relativen Aktivität einer jeden Variante in der *cis*-Konfiguration des angehängten Azobenzol-Schalters bezogen auf die entsprechende Aktivität in der *trans*-Konfiguration erhalten wird. Zum Vergleich der Aktivitäten der einzelnen Varianten untereinander werden zusätzlich die absoluten Aktivitäten im *trans*- und im *cis*-Zustand bestimmt, indem die jeweils gemessene relative Aktivität eines Belichtungszustands auf die Konzentration des eingesetzten Proteins bezogen wird. Da die Konzentration der modifizierten und aufgereinigten Proben für spektroskopische Messungen zu gering ist, kann die Konzentration jeweils nur über SDS-PAGE mit Silberfärbung anhand von Proteinbanden bekannter Konzentration als Referenz abgeschätzt werden. Für die anfänglichen Varianten ist diese Abschätzung nicht erfolgt, so dass für diese Varianten keine Werte für die absolute Aktivität bestimmt werden konnten, die Werte der „*cis/trans*“-Effekte jedoch zu Bewertung des lichtinduzierten Effekts ausreichend Aufschluss geben.

In einem schrittweisen und zielorientiertem Prozess wurden die anfänglich ausgewählten Azobenzol-Crosslink-Stellen je nach den gemessenen lichtschtbaren Effekten entsprechend variiert und kombiniert, um so die Varianten im Hinblick auf einen maximalen „*cis/trans*“-Effekt zu optimieren (Tab. 3-9). Als Kontrolle wurden drei unmodifizierte Varianten einem Aktivitätstest unter spezifischer Belichtung unterzogen. Sowohl scPvuII als auch die Varianten sc(C49 C62)<sub>2</sub> und sc(C49 C62)<sub>2</sub>(F94)<sub>2</sub> zeigten dabei keinen Aktivitätsunterschied aufgrund der verschiedenen Belichtungszustände („*cis/trans*“-Effekt = 1,0). Die enzymatische Aktivität des Proteins alleine wird somit nicht durch Licht beeinflusst und das gewählte Belichtungssetup liefert reproduzierbare Ergebnisse, so dass die gemessenen Effekte der modifizierten Varianten alleine auf die jeweiligen Azobenzol-Schalter zurückzuführen sind.

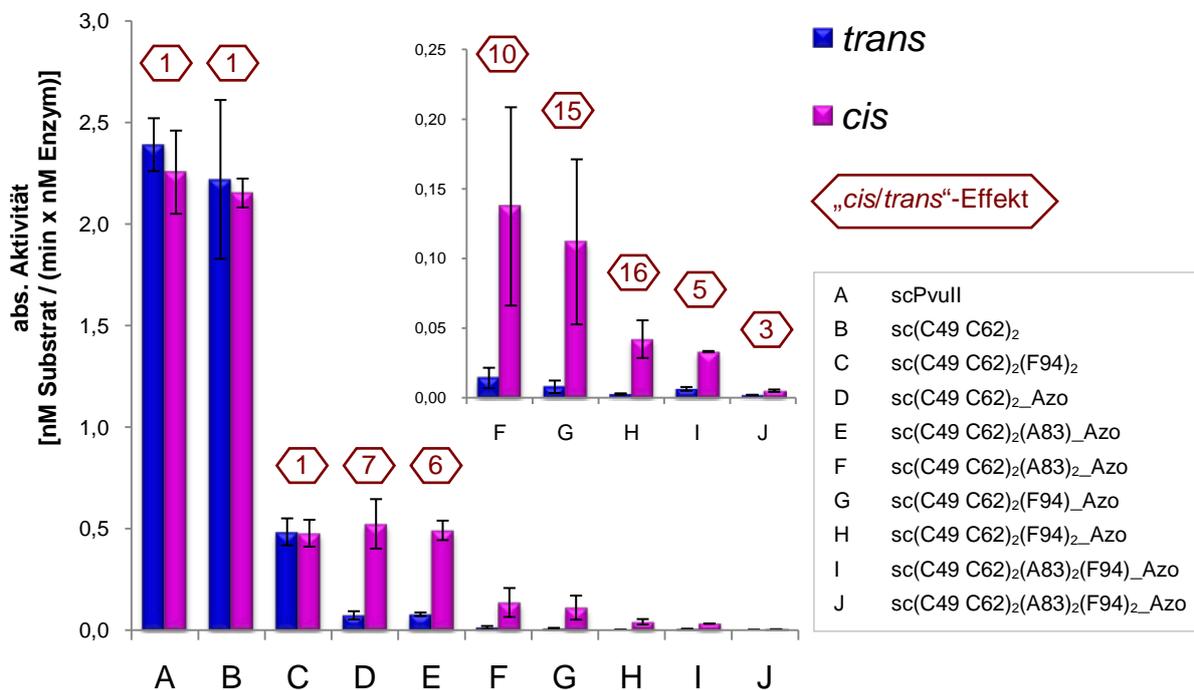
Betrachtet man zunächst die Varianten mit einem bzw. zwei Azobenzol-Schaltern, so zeigen die Varianten mit der Modifikation auf  $\alpha$ -Helices nahe der DNA-Bindungsstelle verschwindend kleine Effekte. Im Vergleich zu kleinen helikalen Proteinen scheint der mechanische Stress, der durch die Photoisomerisierung der Azobenzol-Schalter innerhalb von Picosekunden erzeugt wird, nicht ausreichend zu sein, um eine Helix, die in eine komplexe

tertiäre Struktur eingebunden ist, partiell zu entfalten, oder aber die lichtinduzierte Konformationsänderung ist entsprechend klein und mit dem Erhalt der enzymatischen Aktivität kompatibel. Dagegen zeigen die Varianten, die die Ausbildung des aktiven Zentrums beeinflussen sollen, lichtabhängige Aktivitätsunterschiede, die bei zwei symmetrisch abgebrachten Azobenzol-Schaltern entsprechend größer sind als bei nur einem Schalter in der N-terminalen Hälfte des Proteins. Insbesondere konnte für die Variante sc(C49 C62)<sub>2</sub>\_Azo bzw. sc(C49 C62)<sub>2</sub>\_Azo der „*cis/trans*“-Effekt beim Übergang von einem zu zwei Azobenzol-Schaltern von 2,2 auf 7,2 gesteigert werden. Daraus kann geschlossen werden, dass die Region nahe des aktiven Zentrums sensitiv auf geringe Konformationsänderungen, die durch die Isomerisierung des angehängten Azobenzols hervorgerufen werden, reagiert (Abb. 3-9).

Aufgrund dieser Resultate wurden die Crosslink-Stellen nahe des aktiven Zentrums zur weiteren Optimierung miteinander kombiniert, wobei Varianten mit vier Azobenzol-Crosslink-Stellen erhalten wurden. Jedoch ging der gemessene „*cis/trans*“-Effekt für diese Varianten wieder deutlich zurück (< 2,4). Allerdings ist fraglich, ob der gemessene Effekt tatsächlich auf die Varianten mit vier querverknüpften Azobenzol-Schaltern zurückzuführen ist, da sich evtl. auch unspezifische Querverknüpfungen zwischen den Cysteinen unterschiedlicher Crosslink-Stellen ausbilden können. Insgesamt scheint das Enzym mit der Modifikation von vier hydrophoben Azobenzol-Molekülen jedoch bereits überladen zu sein, was auch die erheblichen Löslichkeitsprobleme der modifizierten Varianten in wässrigem Milieu belegen.

Daher wurde im Weiteren wieder mit zwei Azobenzol-Schaltern gearbeitet und die Variante mit dem dahin besten Effekt (sc(C49 C62)<sub>2</sub>\_Azo) mit zusätzlichen Mutationen kombiniert, welche die Aktivität von scPvuII bekanntermaßen mindern. Als zusätzliche Mutationen wurden die Substitutionen H83A, welche die Substrat-Bindung von PvuII beeinflusst und dadurch die Aktivität um  $\sim 10^2$  reduziert (109), und Y94F, welches die Katalyse von PvuII beeinträchtigt (Y94 ist an der Bindung eines  $Mg^{2+}$ -Ions außerhalb der aktiven Zentrums beteiligt, das in Folge der kooperativen spezifischen Substratbindung auf D58 und E68 im aktiven Zentrum übertragen wird) und infolgedessen die Aktivität um  $\sim 10^1$  reduziert (103), entsprechend in das Enzym eingeführt (Abb. 3-1 D). Der gemessene „*cis/trans*“-Effekt konnte dabei bei der zusätzlichen Mutation (A83)<sub>2</sub> in beiden Hälften auf einen Wert von  $\sim 10$  und bei (F94)<sub>2</sub> sogar auf  $\sim 16$  gesteigert werden. Demnach scheinen die zusätzlichen Mutationen die Spaltungsraten des Enzyms im *cis*- und im *trans*-Zustand unterschiedlich zu beeinflussen, wodurch der „*cis/trans*“-Effekt insgesamt erhöht wird. Dies wird auch insbesondere beim Blick auf die absoluten Aktivitäten in *trans* und *cis* deutlich (Abb. 4-1).

Zudem kann man daraus entnehmen, dass die absolute Aktivität der Variante  $sc(C49\ C62)_2$  im modifizierten Zustand mit den zusätzlichen  $(F94)_2$ -Mutationen (Abb. 4-1 Spur G/H)



**Abb. 4-1 Absolute Aktivitäten von modifizierten Varianten von scPvuII mit zwei Azobenzol-Schaltern und zusätzlichen Mutationen in der *trans*- und der *cis*-Konfiguration des angehängten Azobenzols:** Zusätzlich ist für jede Variante der gemessene „cis/trans“-Effekt angegeben.

insgesamt gesehen stärker reduziert ist als die Variante mit den zusätzlichen  $(A83)_2$ -Mutationen (Abb. 4-1 Spur E/F), im Gegensatz zur Aktivität der unmodifizierten Varianten (Tab. 3-1). Folglich scheint die absolute Aktivität der Variante  $sc(C49\ C62)_2(F94)_2\_Azo$  durch die Kombination aus zwei Azobenzol-Schaltern nahe des aktiven Zentrums und zusätzlichen Katalyse-beeinflussenden Mutationen stark beeinträchtigt zu sein, insbesondere im *trans*-Zustand, so dass man insgesamt eine 16-fach höhere Aktivität durch Belichtung mit UV-Licht gegenüber der mit blauem Licht erhält. Bei Kombination der Mutationen A83 und F94 ist der gemessene Effekt jedoch wieder rückläufig, vermutlich da die absolute Aktivität der modifizierten Varianten insgesamt gesehen bereits zu stark beeinträchtigt ist und somit das Limit für die Einführung zusätzlicher Mutationen damit bereits überschritten zu sein scheint.

Da die Crosslink-Stelle C49-C62 die bisher besten Ergebnisse geliefert hat, wurde in einer weiteren Teilstrategie dessen Ansatzpunkt nahe des aktiven Zentrums (C61 und C62) erneut verwendet und diesmal mit verschiedenen Ansatzpunkten innerhalb der Linker-Sequenz ( $L_1 - L_4$ ) kombiniert. Da der Linker die an sich flexiblen Enden von PvuII verbindet, ist zu erwarten, dass dieser in scPvuII einen weitgehend unflexiblen Teil des Proteins ausbildet und

somit ideal als Fixpunkt für einen Azobenzol-Schalter dienen kann, um so den mechanischen Stress auf die Region des aktiven Zentrums zu übertragen. Dabei zeigte der Linker L<sub>4</sub> in Kombination mit der Position C61 die beste Ausrichtung zueinander, da sich insbesondere in Kombination mit der Crosslink-Stelle C49\*-C62\* in der C-terminalen Hälfte (sc(C61 L<sub>4</sub>)(C49\* C62\*)\_Azo) der größte messbare „*cis/trans*“-Effekt dieser Linker-Varianten mit einem Wert von ~ 7 ergab (Abb. 3-11). Nimmt man diese Variante erneut als „Basis“ für die zusätzlichen Substitutionen (F94)<sub>2</sub>, so konnte der „*cis/trans*“-Effekt erneut auf einen Wert von ~ 16 gesteigert werden, wobei die absolute Aktivität insgesamt noch geringer ist als bei der Variante sc(C49 C62)<sub>2</sub>(F94)<sub>2</sub>\_Azo. Es scheint also, dass in den Varianten sc(C61 L<sub>4</sub>)(C49\* C62\*)\_Azo und sc(C49 C62)<sub>2</sub>(F94)<sub>2</sub>\_Azo neben dem identischen Schalter C49\*-C62\* in der C-terminalen Hälfte, die Azobenzol-Schalter C49-C62 und C61-L<sub>4</sub> vergleichbaren mechanischen Stress auf das aktive Zentrum übertragen, da bei beiden jeweils ein ähnlicher „*cis/trans*“-Effekt von ~ 16 bestimmt werden konnte.

Die symmetrischen Substitutionen in beiden Hälften von scPvuII ergaben die bisher besten Ergebnisse, wie gezeigt für sc(C49 C62)<sub>2</sub>\_Azo und sc(C49 C62)<sub>2</sub>(F94)<sub>2</sub>\_Azo. Führt man die identischen Substitutionen in den WT PvuII ein, so erhält man für die homodimeren WT - Varianten nicht so große „*cis/trans*“-Effekte wie bei den *single-chain* Varianten (Tab. 3-8). Dies mag darauf zurückzuführen sein, dass der WT PvuII den durch die Azobenzol-Schalter hervorgerufenen mechanischen Stress auf das aktive Zentrum aufgrund der höheren Flexibilität besser kompensieren kann als die scPvuII-Variante, die aufgrund des eingeführten Linkers insgesamt eine höhere Steifheit besitzt.

### 4.1.4 Charakterisierung von lichtschtbaren scPvuII - Varianten

Die Variante sc(C49 C62)<sub>2</sub>\_Azo, die alleine durch zwei Azobenzol-Schalter einen „*cis/trans*“-Effekt von ~ 7 zeigte und folglich als Basis für das Einbringen zusätzlicher, die Aktivität von scPvuII beeinflussender Mutationen diente, wurde zunächst im Bezug auf die Lichtschaltung mechanistisch charakterisiert. Des Weiteren wurden auch die lichtabhängigen Aktivitätsunterschiede der auf dieser Basis aufbauenden Variante mit dem bisher höchsten erreichten „*cis/trans*“-Effekt von ~ 16, sc(C49 C62)<sub>2</sub>(F94)<sub>2</sub>\_Azo, näher untersucht.

Für beide Varianten konnte dabei festgestellt werden, dass die Aktivität jeweils über mehrere Schaltprozesse hinweg (Blaues Licht → UV-Licht → Blaues Licht → UV-Licht) reversibel und reproduzierbar reguliert werden konnte (vgl. Abb. 3-12 und Abb. 3-14). Insbesondere konnte dabei jeweils konstant zwischen dem niedrigeren Aktivitätslevel im *trans*-Zustand und dem höheren Aktivitätslevel im *cis*-Zustand über mehrere Runden hin und her geschaltet werden, was zeigt, dass die Photoisomerisierung der modifizierten Varianten zu keiner

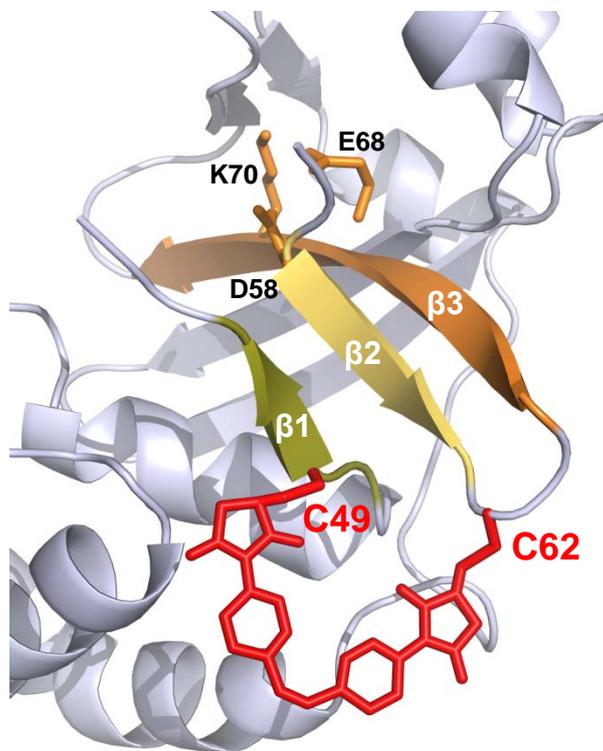
absoluten Inaktivierung oder Aggregation des Proteins führt und auch der Azobenzol-Schalter über mehrere Schaltprozesse hinweg jeweils einen vergleichbaren mechanischen Stress auf das Protein überträgt. Dementsprechend konnte die an die Lichtschaltung gestellte Anforderung der Reversibilität erfüllt werden. Die Abhängigkeit der Aktivität von spezifischer Belichtung wurde dabei anhand der Linearisierung von Plasmid-DNA nachgewiesen (Abb. 3-10), jedoch konnten derselbe Effekt auch durch Spaltung von zuvor mit Mva1269I linearisiertem Substratplasmid (Spaltung von pAT153 tri an der Position 1360) (nicht gezeigt) und durch die Spaltung eines PCR-Produktes (Abb. 3-15 A) in jeweils zwei Fragmente reproduziert werden. Die modifizierten Varianten vollführen demnach erwartungsgemäß kein *nicking* von Einzelsträngen an verschiedenen Positionen des DNA-Substrats, sondern einen gezielten Doppelstrangbruch an der spezifischen PvuII-Erkennungssequenz. Insgesamt gesehen konnte auch bei keiner der modifizierten Varianten eine belichtungsspezifische Anreicherung des *open circle* - Produkt des Substratplasmids beobachtet werden, es erfolgte jeweils der Übergang in das gespaltene lineare Produkt in einer konzertierten Spaltung beider Stränge des DNA-Duplex.

Die reversible Lichtschaltung konnte des Weiteren auch während einer Spaltreaktion *in situ* durch Variation der Belichtung in Anwesenheit von DNA belegt werden (Abb. 3-13). Dabei zeigte sich, dass die durch die Photoisomerisierung der Azobenzol-Schalter hervorgerufene Aktivitätsänderung sehr schnell ist, da sich der jeweilige Aktivitätslevel direkt nach dem Wechsel der spezifischen Belichtung entsprechend einstellt. Im Gegensatz dazu war die *trans* → *cis* Isomerisierung von freiem Azobenzol in Labeling-Puffer erst nach 3 Minuten UV-Licht-Belichtung vollendet (Abb. 3-2 C). Dies mag auf Verzögerungen bei der Messung der Absorption in Abhängigkeit der Belichtung zurückzuführen sein. Jedoch wird anhand des mechanischen Stresses, der durch den *cis/trans*-Übergang des Azobenzol-Schalters direkt auf die Aktivität des modifizierten Enzyms übertragen wird, die eigentlich sehr schnelle und gemäß der Theorie in Picosekunden ablaufende Photoisomerisierung des angehängten Azobenzols ersichtlich. Eine Verfolgung der Isomerisierung anhand der Absorptionsänderung der angehängten Azobenzol-Schalter ist aufgrund der zu geringen Konzentration an dem erwünschten querverknüpften Produkt nach Aufreinigung nicht direkt möglich.

Zur weiteren Charakterisierung wurde die Variante sc(C49 C62)<sub>2</sub>(F94)<sub>2</sub>\_Azo mit dem bisher besten erhaltenen Effekt Relaxationsexperimenten im Dunkeln unterzogen (Abb. 3-14). Dabei stellte sich heraus, dass auch die enzymatische Aktivität, die durch UV-Licht in den höheren *cis*-Aktivitätslevel geschaltet wurde, bedingt durch die thermische Relaxation der angehängten Azobenzol-Schalter durch Inkubation im Dunkeln mit einer Halbwertszeit von ~ 6 h (bei 4 °C) entsprechend abnimmt. Dies bedeutet, dass die Photoisomerisierung der Azobenzol-

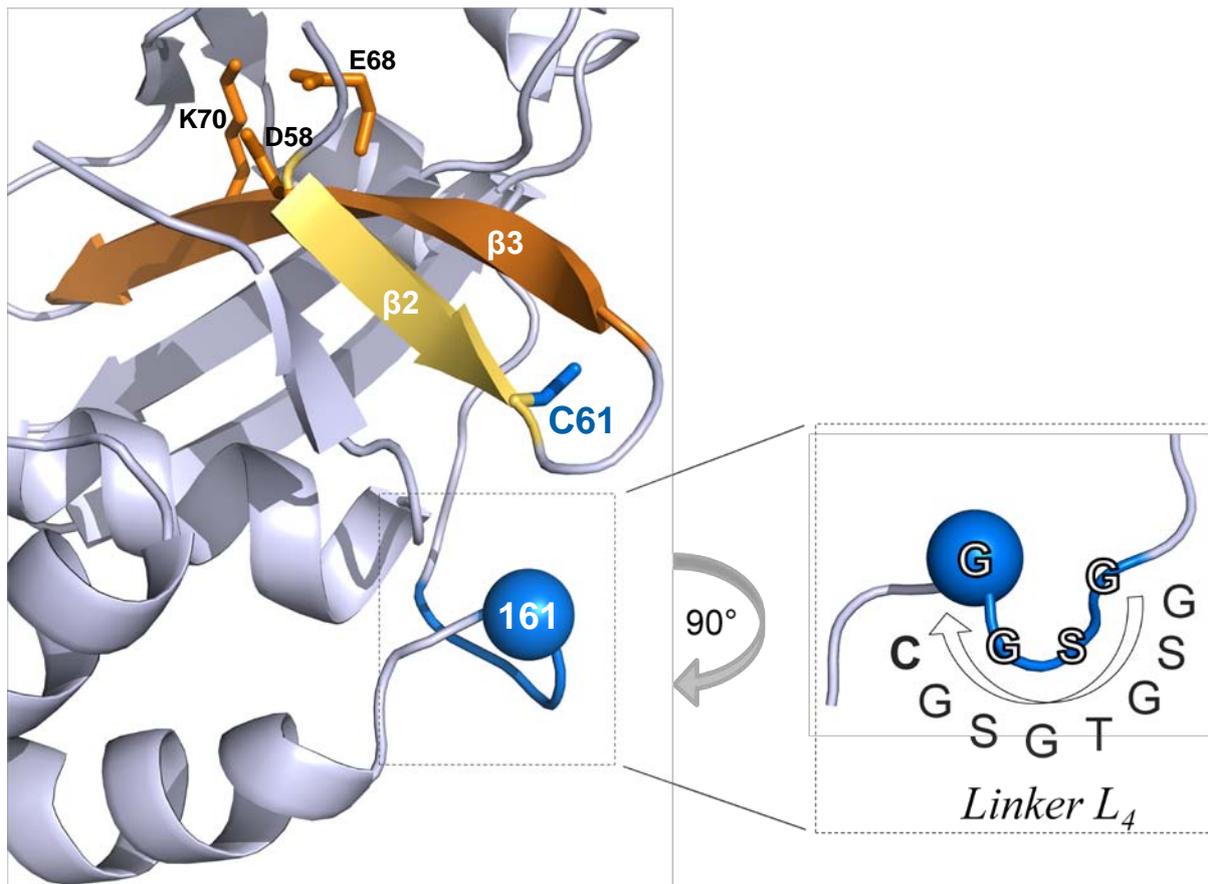
Schalter der treibende, auf die Aktivität der Variante einflussnehmende Prozess ist und dass Fluktuationen der Proteinkonformation, die durch thermische Molekularbewegung oder auch durch Substratbindung induziert werden, nicht zu einer mechanischen Isomerisierung der angehängten Schalter führen. Dabei stimmt die Halbwertszeit der modifizierten Variante in etwa mit der Halbwertszeit des freien AzoMal-Crosslinkers überein (~ 4 - 5 h bei 24 °C) (43).

Um den mechanistischen Hintergrund der Lichtschaltung zu untersuchen, wurde eine *steady-state* kinetische Analyse nach Michaelis-Menten unter spezifischer Belichtung mit der besten grundlegenden Variante mit zwei Azobenzol-Schaltern, sc(C49 C62)<sub>2</sub>Azo, durchgeführt. Der erhaltene lichtabhängige Effekt ist damit, entsprechend dieser Analyse, hauptsächlich auf eine Änderung von  $V_{\max}$  zurückzuführen, während  $K_m$  unter den beiden Belichtungszuständen weitgehend gleich bleibt. Somit ist der Einfluss der Azobenzol-Schalter bei dieser Variante direkt auf den katalytischen Umsatz des Enzyms gerichtet, während die durch den  $K_m$ -Wert definierte Substrataffinität durch die beiden Schaltpositionen des Azobenzols kaum beeinträchtigt wird. Diese Beobachtungen decken sich mit den Erwartungen an die C49-C62 Crosslink-Stelle, die nahe des aktiven Zentrums durch Isomerisierung des angebrachten Schalters direkt auf die Ausbildung des aktiven Zentrums einwirken sollte.



**Abb. 4-2 Modell der Modifikation der Crosslink-Stelle C49-C62 mit AzoMal:** Daneben sind die Reste des aktiven Zentrums, sowie die Faltschichten  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  und  $\beta 3$  hervorgehoben.

Betrachtet man das Modell eines in der *cis*-Konfiguration an die Crosslink-Stelle C49-C62 angebrachten Azobenzol-Schalters (Abb. 4-2), so kann die Photoisomerisierung des Schalter-Moleküls in den *trans*-Zustand zu einem „Auseinander-Drücken“ bzw. einer Spreizung des Faltblattstrangs  $\beta 1$  und der die katalytisch aktiven Reste tragenden Faltblattstränge  $\beta 2$  und  $\beta 3$  führen, was die Integrität des katalytischen Zentrums stört und somit zu einer Absenkung der enzymatischen Aktivität führt. Überträgt man dieses Konzept auf die Crosslink-Stelle C61-L<sub>4</sub> (Abb. 4-3), so könnte die Isomerisierung eines angehängten Azobenzol-Schalters in den *trans*-Zustand erneut zu einer von dem Linker als Fixpunkt ausgehenden Spreizung der Faltblattstränge  $\beta 2$  und  $\beta 3$  führen, die in der Inaktivierung der katalytischen Aktivität resultiert. Vergleicht man dabei die verschiedenen Linker-Varianten, so fällt auf, dass sich umso größere „*cis/trans*“-Effekte ergeben, je weiter sich das eingeführte Cystein in Richtung der C-terminalen Hälfte verschiebt ( $L_4 > L_3 > L_2$ ). Die Position und der Winkel für den Kraftübertrag auf die Faltblätter des aktiven Zentrums durch den angebrachten Azobenzol-Schalter scheinen somit für den Linker<sub>4</sub> in Kombination mit C61 optimal zu sein.



**Abb. 4-3** Ausschnitt der Crosslink-Stelle C61-L<sub>1</sub>: Hervorgehoben sind neben den Positionen C61 und C161 die Reste des aktiven Zentrums zusammen mit den Faltblattsträngen  $\beta 2$  und  $\beta 3$ . Daneben ist eine Vergrößerung der Linker-Region unter Angabe der Orientierung des ursprünglichen Linkers (-GSGG-) und des eingeführten Linkers L<sub>4</sub> (-GSGTGSGC-) dargestellt.

Betrachtet man abschließend die Varianten  $sc(C49\ C62)_2(F94)_2\_Azo$  und  $sc(C61\ L4)(C49^*\ C62^*)\_Azo$ , so scheint der Kraftübertrag des Azobenzol-Schalters an C49-C62 bzw. C61-L4 einen vergleichbaren mechanischen Stress auf die Faltblattstränge  $\beta 2$  und  $\beta 3$  mit dem aktiven Zentrum zu übertragen, da beide in Anbetracht des zweiten Azobenzol-Schalters an C49\*-C62\* und den zusätzlichen (F94)<sub>2</sub>-Mutationen jeweils eine 16-fach erhöhte Aktivität im *cis*-Zustand bezogen auf die Aktivität im *trans*-Zustand aufweisen.

Da der durch die Photoisomerisierung bedingte Kraftstoß der Azobenzol-Schalter innerhalb von Picosekunden stattfindet, muss eine ideale Crosslink-Stelle zum einen so flexibel sein, dass dieser zeitlich kurze Kraftstoß seine lichtinduzierte mechanische Kraft auch auf die verknüpfte Region übertragen kann. Zum anderen muss sie aber auch so sterisch fixiert sein, dass der übertragene mechanische Stress auch eine ausreichende Konformationsänderung bewirken kann, so dass die Ausbildung des aktiven Zentrums je nach Belichtungszustand entscheidend beeinflusst wird. Bei den beiden besten gefundenen Azobenzol-Crosslink-Stellen scheint dies jeweils gegeben zu sein, so dass der Kraftstoß zwischen einem relativ fixierten Ansatzpunkt (C49 bzw. L4) und einem etwas flexibleren Ansatzpunkt (C62 bzw. C61) ideal auf die Faltblattstränge  $\beta 2$  und  $\beta 3$  des aktiven Zentrums übertragen wird und somit die Aktivität des Enzym über die Belichtung der Azobenzol-Schalter reguliert werden kann.

### **4.2 Photogate-Strategie von scPvuII**

Die Modifikation mit mono-funktionellen Azobenzol-Schaltern in dieser Strategie bietet den Vorteil, dass die lichtinduzierte Isomerisierung den Zugang der DNA zur DNA-Bindungsstelle als mechanische, durch Licht steuerbare Barriere blockieren soll, wobei dieses Konzept bei Funktionalität leicht auf andere Proteine übertragen werden könnte. Zudem kann die Modifikation mit einem höheren Überschuss an Azobenzol-Derivat durchgeführt werden, da anders als bei bi-funktionellen Crosslinkern hier keine intra- oder intermolekularen Querverknüpfungen zu erwarten sind, was insgesamt zu höheren Modifikationsausbeuten führt.

#### **4.2.1 Auswahl der Positionen**

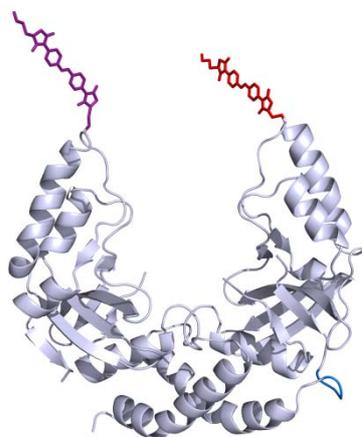
Für die Auswahl der Positionen für das Anbringen der mono-funktionellen Azobenzol-Derivate ist man weitgehend auf die *Loop*-Region am Eingang der DNA-Bindungsstelle begrenzt. Die Positionen G135 und K137 dieses Loops wurden dafür ausgewählt, durch Cysteine ausgetauscht und entsprechend miteinander kombiniert. Die Aminosäure-Reste von K137 und K137\* zeigen direkt in die DNA-Bindungsstelle hinein und sind entsprechend aufeinander ausgerichtet und auch die Positionen G135 und G135\* sind so positioniert, dass

ein Blockieren der DNA-Bindungsstelle durch beidseitige Azobenzol-Modifikationen denkbar ist.

#### 4.2.2 Analyse der Schalt-Effekte

Für die *Photogate*-Strategie kamen verschiedene mono-funktionelle Azobenzol-Derivate zum Einsatz, die sich in der Endgruppe, die nach Modifikation in die DNA-Bindungsstelle hineinreicht, funktionell unterscheiden. Als Endgruppen dienten dabei eine Hydroxyl-Gruppe (AzoOH), der kein direkter Einfluss auf das Blockieren der DNA-Bindung zugeschrieben wird, eine Carboxyl-Gruppe (AzoCOOH), die über die negative Ladung zu einer elektrostatischen Abstoßung der negativ geladenen DNA führen könnte, und ein über das Thiol verknüpftes Cystein (AzoCys), welches über die positive und negative Ladung elektrostatischen Einfluss auf die DNA-Bindung nehmen könnte. Betrachtet man die gemessenen Schalt-Effekte, so zeigen sämtliche Varianten, die mit diesen drei Azobenzol-Derivaten modifiziert wurden, lediglich sehr kleine Aktivitätsunterschiede durch Belichtung mit blauem Licht bzw. mit UV-Licht („*cis/trans*“-Effekt < 1,9).

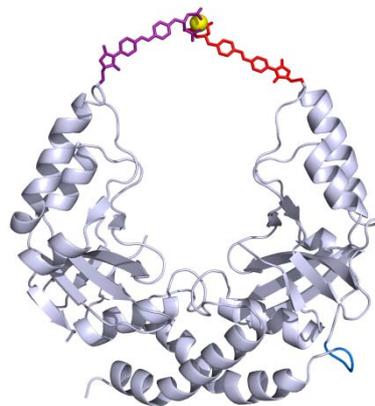
Da die Belichtungsexperimente mit dem modifizierten Protein erwiesen, dass die lichtinduzierte Isomerisierung des angehängten Azobenzol-Moleküls unter den gewählten Bedingungen stattfindet, kann daraus geschlossen werden, dass es zu keinem eigentlichen mechanischen Blockieren der DNA-Bindung gekommen ist, da sich ansonsten größere „*cis/trans*“-Effekte aufgrund eines stark reduzierten Aktivitätslevel in *trans* ergeben hätten. Die Ursache hierfür könnte die Rotation der angehängten Azobenzol-Moleküle um die bei der Kopplung entstandene Einfachbindung in der *trans*-Konfiguration des Crosslinkers.



**Abb. 4-4** Darstellung der Rotation von angehängten mono-funktionellen Azobenzol-Molekülen um die bei der Kopplung entstandene Einfachbindung in der *trans*-Konfiguration des Crosslinkers.

Modifikation entstandene Einfachbindung sein (Abb. 4-4). Insbesondere in der *trans*-Konfiguration könnten sich die Azobenzole nach außen wegrehen, den DNA-Zugang zur DNA-Bindungsstelle freigeben und somit diesen nicht wie geplant als mechanische Barriere blockieren (Abb. 1-10 A), wodurch sich kein großer Aktivitätsunterschied (auch nicht durch die eingeführten Ladungen der Azobenzol-Endgruppen) im *trans*-Zustand bezogen auf den *cis*-Zustand ergibt. Um den Zugang zur DNA-Bindungsstelle somit tatsächlich blockieren zu können, müssten die beiden Azobenzol-Moleküle in der *trans*-Konfiguration durch eine Art von gegenseitiger Interaktion verbunden werden, die die Rotation um die frei drehbare Einzelbindung reduziert und die Azobenzole entsprechend über der DNA-Bindungsstelle als Barriere fixiert, die aber auch durch Isomerisierung in die *cis*-Konfiguration wieder gelöst werden kann.

Möglich wäre das Anbringen von funktionellen Chelatoren an das Ende des Azobenzol-Moleküls. Durch die Isomerisierung in den *trans*-Zustand könnten diese Komplexbildungsgruppen der Azobenzol-Moleküle auf beiden Hälften des Enzyms zueinander in räumliche Nähe gebracht werden, so dass sie zentral über der DNA-Bindungsstelle einen Komplex mit zweiwertigen Metallionen ( $Mg^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ) ausbilden können (Abb. 4-5). Da gezeigt wurde, dass die Komplexbildung durch zwei Chelatoren am 5'- und 3'- Ende



**Abb. 4-5 Darstellung der Modifikation von  $sc(C135)_2$  mit einem monofunktionellen Azobenzol-Derivat mit terminaler IDA-Gruppe:** Die in der *trans*-Konfiguration in räumliche Nähe gebrachten IDA-Endgruppen könnten einen Komplex mit zweiwertigen Ionen (gelb) ausbilden und das *Photogate* somit fest verschließen.

zweier zueinander ausgerichteter Oligonukleotide auf einem DNA-Strang als Matrize die thermische Stabilität dieses DNA-Fragments erhöht (147), ist diese angestrebte Komplexbildung und das damit verbundene Blockieren der DNA-Bindungsstelle auch auf der Proteinebene denkbar. Da zwei IDA-Moleküle als funktionelle Gruppe stabile Komplexe mit

zweiwertigen Ionen ausbilden können (148), könnte für die *Photogate*-Strategie entsprechend ein Maleimid-Azobenzol-IDA - Konstrukt verwendet werden. Jedoch konnte die Funktionalität eines solchen Konstrukts bislang noch nicht getestet werden, da bei der chemischen Synthese dieses Konstrukts bisher noch nicht überwindbare Probleme auftraten (Kollaboration mit Le Thi Hien / Oretskaya / Kubareva, Lomonossov Universität Moskau). Da jedoch auch Cystein stabile Komplexe mit zweiwertigen Ionen ausbilden kann (speziell mit  $Mg^{2+}$  und  $Co^{2+}$ ) (148, 149), wurden die mit AzoCys modifizierten Varianten mit 10 mM  $Mg^{2+}$  (die Variante sc(C135)2\_AzoCys auch mit  $1\mu M Co^{2+}$  und 10 mM  $Mg^{2+}$ ) vorinkubiert, um eine mögliche Komplexbildung zu ermöglichen. Jedoch konnte auch hier kein verminderter Aktivitätslevel im *trans*-Zustand gegenüber dem *cis*-Zustand beobachtet werden, was dafür spricht, dass der erstrebte Komplex nicht ausgebildet wurde oder aber das Binden der DNA nicht blockieren kann.

Als weitere Strategie, um die DNA-Bindung komplett zu blockieren, wurde versucht, an das Ende des Azobenzol-Moleküls ein Thiol(3')-modifiziertes, palindromes Oligonukleotid zu koppeln. Wenn dieses einzelsträngige Oligonukleotid somit von den Azobenzol-Molekülen auf beiden Hälften in die Mitte angereicht wird (entsprechend Abb. 4-5), dann könnte das Ausbilden eines doppelsträngigen Bereichs die DNA-Bindungsstelle vollständig versperren. Das gewählte Oligonukleotid besitzt eine Schmelztemperatur von 24 °C. Falls sich das *annealing* dieser palindromen, einzelsträngigen Sequenzen nur in einer Konfiguration des dazwischengeschalteten Azobenzol-Schalters ergeben sollte, könnte der Zugang zur DNA-Bindungsstelle und somit die Aktivität von scPvuII über eine Kombination aus spezifischer Belichtung und gewählter Temperatur gesteuert werden. Da das angehängte Oligonukleotid bei 37 °C (der idealen Spalttemperatur von scPvuII) einzelsträngig vorliegt, wäre eine Barriere der DNA-Bindungsstelle durch Doppelstrangbildung der Oligonukleotide bei Temperaturen von 4 °C bis 24 °C denkbar. Da die katalytische Aktivität von scPvuII bei dieser Strategie nicht direkt beeinflusst wird, ist auch eine Anwendung bei tieferen Temperaturen möglich, da scPvuII bei Temperaturen bis zu 4 °C zwar verminderte aber ausreichende DNA Spaltaktivität besitzt.

Es zeigte sich im Experiment, dass das halbseitige Koppeln von AzoMal mit einem Thiol-modifizierten Oligonukleotid (gemäß Punkt 2.6.1) und anschließender Modifikation von scPvuII-Varianten zu dem gewünschten modifizierten Produkt führt, allerdings in nur sehr geringer Ausbeute (Abb. 3-18), und die entsprechende Aufreinigung über Anionenaustauschchromatographie das gewünschte Produkt nur auf ~ 30 % anreichern kann. Erste Experimente bei spezifischer Belichtung und unterschiedlichen Temperaturen dieser angereicherten Proben ergaben keine auftretenden „*cis/trans*“-Effekte, jedoch ist für eine eindeutige Evaluation

dieser Teilstrategie eine zukünftige Optimierung der Aufreinigung des gewünschten modifizierten Produktes notwendig.

Einen Hinweis, dass Azobenzol als mechanische Barriere die Bindung von Substrat-DNA tatsächlich verhindern könnte, liefert die Tatsache, dass bei der Variante  $sc(C135)_2(C137)_2$  nach der Modifikation mit AzoOH bzw. AzoCOOH schon bei geringem Überschuss an Protein über DNA *star*-Aktivität (d.h. Spaltung an Sequenzen, die sich in einem Basenpaar von der Erkennungssequenz unterscheiden) beobachtet werden konnte (Abb. 3-21). Eine denkbare Erklärung hierfür ist, dass nach erfolgter unspezifischer Bindung die Dissoziation des Proteins von der DNA durch die insgesamt vier Azobenzol-Moleküle (zwei pro Hälfte) gestört wird. Dadurch ist die lokale Konzentration von dem Enzym auf der DNA so erhöht, dass auch *star*-Spaltsequenzen geschnitten werden. Ähnliche Beobachtungen konnten für EcoRV, dessen Dissoziation von unspezifisch gebundener DNA durch Querverknüpfung verhindert wurde, gemacht werden (150). Da die *star*-Aktivität der modifizierten scPvuII-Variante jedoch unabhängig von dem Belichtungszustand ist (Abb. 3-21 A), ist nicht die Konfiguration sondern alleine das Vorhandensein dieser vier Azobenzol-Modifikationen für die Behinderung der Dissoziation verantwortlich. Weil aber der Zugang durch die Modifikationen gewissermaßen sterisch blockiert zu sein scheint, könnte die *Photogate*-Strategie über die Licht-Schaltung mit einer fixierten Barriere im *trans*-Zustand, entsprechend der beschriebenen, aber weiter optimierten Methoden, die DNA-Bindung vollständig verhindern, und somit die Aktivität des Enzyms durch Licht regulieren.

### 4.3 Lichtschaltbares scPvuII - Fazit und Grenzen

Betrachtet man abschließend die Ergebnisse der gewählten Strategien, so konnte in der *Photogate*-Strategie bisher keine mit mono-funktionellen Azobenzol-Derivaten modifizierte Variante mit größeren „*cis/trans*“-Effekten gefunden werden, vermutlich weil der Zugang zur DNA-Bindungsstelle durch die Modifikation - wie diskutiert - im *trans*-Zustand nicht vollständig blockiert ist. Dagegen konnte in der *Photoswitch*-Strategie der gemessene „*cis/trans*“-Effekt durch Variation der Azobenzol-Crosslink-Stellen und durch das Einführen zusätzlicher Mutationen schrittweise auf einen maximalen Wert von  $\sim 16$  optimiert werden, wenn die angebrachten Azobenzol-Schalter die von der Photoisomerisierung herrührende Kraft direkt auf die Region des aktiven Zentrums übertragen.

Durch nähere Charakterisierung konnte gezeigt werden, dass der erhaltene Lichtschalter-Effekt in An- und Abwesenheit von DNA-Substrat reversibel ist, der thermischen Relaxation der angehängten Azobenzol-Schalter folgt und mechanistisch hauptsächlich auf einer Änderung von  $V_{\max}$  beruht. Der maximale „*cis/trans*“-Effekt von  $\sim 16$  konnte dabei mit zwei

verschiedenen Varianten,  $sc(C49\ C62)(F94)_2\_Azo$  und  $sc(C61\ L_4)(C49^*\ C62^*)(F94)_2\_Azo$ , erzielt werden. Somit konnte als „*proof-of-principle*“ bewiesen werden, dass das Konzept, Proteine und insbesondere deren enzymatische Aktivität durch das Anbringen von externen bi-funktionellen Azobenzol-Schalter zu regulieren, funktionell umsetzbar ist und durchaus in einer universellen Art und Weise durch die Wahl der „richtigen“ Azobenzol-Crosslink-Stellen auf andere Proteine übertragen werden kann.

Zur Beurteilung des erhaltenen Effekts müssen die Grenzen, die durch die Photochemie von Azobenzol auferlegt sind, berücksichtigt werden. Denn aufgrund der Überlappung der Absorptionsspektren von Azobenzol in der *cis*- und *trans*-Konfiguration kann durch Belichtung, gleichgültig bei welcher Wellenlänge, niemals eine 100%ige Ausbeute eines photo-stationären Zustands erreicht werden. Dabei entstehen typischerweise maximale Verteilungen der beiden Konfigurationen von ~ 80 % *cis* durch Belichtung mit UV-Licht und ~ 95 % *trans* durch Belichtung mit blauem / sichtbarem Licht (18, 64). Schreibt man im modifizierten Protein somit der *cis*-Konfiguration den aktiven Zustand und der *trans*-Konfiguration den inaktiven Zustand zu, so kann der Anteil an der *cis*-Konfiguration durch spezifische Belichtung von ~ 5 auf 80 % gesteigert werden, was einem ~ 10 - 20 - fachen theoretischen Aktivitätsunterschied entspricht (25). Dementsprechend befindet sich der Licht-Schalt-Effekt von scPvuII mit einem 16-fachen Unterschied in der enzymatischen Aktivität im oberen Bereich dieses Limits und zeigt, dass die enzymatische Aktivität von scPvuII somit im Rahmen der auferlegten Grenzen durch die Photochemie von Azobenzol durch das Anbringen von externen Azobenzol-Schaltern durch Licht erfolgreich reguliert werden kann.

Um den Aktivitätsunterschied über diese Grenze hinaus weiter zu steigern, könnte nach dem Beispiel natürlich vorkommender Licht-Schalter (z.B. bei PYP oder Phytochromen) die thermische Relaxation als „Aus“-Schalter benutzt werden (151, 152), da durch den thermischen Übergang in den stabileren *trans*-Zustand Anteile von > 99,99 % an *trans*-Isomer erzielt werden können (19). Davon ausgehend könnte folglich insgesamt ein größerer Unterschied des durch Belichtung kontrollierten Anteils an dem aktiven *cis*-Isomer (von < 0,1 % auf 80 %) erreicht werden. Voraussetzung hierfür ist es aber, insbesondere für *in vivo* Anwendungen, dass sich die thermische Relaxation in einem Bereich von Sekunden bis Minuten befindet, damit ein Zielprotein im Zeitrahmen biologisch ablaufender Prozesse durch Relaxation inaktiviert werden kann. Die Relaxation von AzoMal-modifiziertem scPvuII wäre dabei mit einer Halbwertszeit von ~ 6 h bei 4 °C zu langsam für das „Aus“-Schalten durch thermische Inaktivierung. Da unterschiedliche Substituenten an den Phenyl-Ringen des Azobenzols die Halbwertszeit im Bereich von Sekunden zu Stunden variieren können (19), könnte die Verwendung eines entsprechenden substituierten Azobenzol-Crosslinkers, der

innerhalb von Sekunden in den *trans*-Zustand relaxiert (vgl. (64)), mit den bestehenden scPvuII-Varianten den messbaren „*cis/trans*“-Effekt weiter steigern, wobei hierbei die Aktivierung durch Belichtung mit UV-Licht und die anschließende Inaktivierung allein durch rasche thermische Relaxation erfolgen würde.

### 4.4 Lichtschaltbares scPvuII - Anwendung in der Zelle und in der Gentherapie

Für eine funktionelle Anwendung von lichtschaltbaren Proteinen auf Basis von Azobenzol-Modifikationen *in vivo* muss gewährleistet sein, dass die Photoisomerisierung des Azobenzols in zellulärem Milieu ausgeführt werden kann und dass die Belichtung selbst keine größeren Schäden auf die Zelle ausübt. Diskutiert man zunächst den Einfluss der Belichtung auf die Integrität der Zelle, so ist die DNA schädigende Wirkung durch UV-Licht insbesondere durch die Ausbildung von Thymin-Dimeren bekannt, die durch die zelleigenen Reparaturmechanismen zwar behoben werden können (153), bei übermäßiger Akkumulation jedoch letztendlich zur Apoptose der Zelle führt (154). Bei darauf abzielenden Studien zeigte sich diese schädigende Wirkung vor allem bei dem kurzwelligen UV-B Licht (290 - 320 nm), während durch Belichtung mit langwelligerem UV-A Licht (320 - 400 nm) der schädigende Effekt deutlich reduziert war ( $\sim 10^3 \downarrow$ ) (155). Die in dieser Arbeit verwendeten Belichtungs Dosen ( $< \sim 10 \text{ J/cm}^2$ ) bei einer Wellenlänge von 365 nm zeigten dabei im Zellversuch nur eine minimal erhöhte Mutationsrate, wobei die Zellen die Bestrahlung weitestgehend überlebten (154, 155). Um dem Problem der Belichtung mit UV-Licht trotz der nur geringfügig schädigenden Wirkung von UV-A Einstrahlung gänzlich aus dem Weg zu gehen, könnten für zukünftige Anwendungen zusätzliche *ortho*-Amino-Substitutionen am verwendeten Azobenzol-Derivat eingeführt werden, die die Anregungswellenlänge für die Isomerisierung in die *cis*-Konfiguration in Bereiche größer 400 nm verschieben (156).

Betrachtet man des Weiteren die Stabilität der Photoisomerisierung von Azobenzol *in vivo*, so muss das reduzierende Milieu der Zelle durch millimolare Konzentrationen an Glutathion berücksichtigt werden. In einer Studie dazu wurde die Reduktion der zentralen Diazenbindung eines in ein Tripeptid - inkorporierten Azobenzols durch eine zelluläre Konzentration an Glutathion in das entsprechende Dihydro-Azobenzol *in vitro* demonstriert (157). Im Gegensatz dazu konnte jedoch auch gezeigt werden, dass bei der Verwendung von Elektronenreicheren Azobenzol-Derivaten die Inkubation mit Glutathion die Isomerisierung in keinsten Weise beeinflusst, was bedeutet, dass diese Derivate gegenüber einer Reduktion durch eine zelluläre Glutathion-Konzentration resistent sind (64, 156). In einer zellulären Anwendung, bei der eine Azobenzol-enthaltene Aminosäure *in vivo* in ein Protein inkorporiert wurde, konnte ebenfalls keine Beeinträchtigung der Photoisomerisierung des Azobenzol-Derivats

festgestellt werden (30). Folglich sollte die funktionelle Anwendung von lichtschtbaren Proteinen auf Basis von Azobenzol-Modifikationen *in vivo* grundsätzlich möglich sein. Das in dieser Arbeit verwendete Azobenzol-Derivat AzoMal sollte demnach prinzipiell auch für *in vivo*-Applikation benutzbar sein, könnte jedoch noch speziell für diese Anwendung - wie diskutiert - optimiert werden.

Ein lichtschtbares scPvuII in Kombination mit einem Tripel-Helix-Formenden Oligonukleotid (TFO), wie in Punkt 1.3.4 einleitend beschrieben, könnte somit durchaus für die Gen-Ersatz-Therapie zum Einsatz kommen. Dabei muss jedoch beachtet werden, dass sowohl das Anbringen von Azobenzol-Schaltern als auch das Anhängen des TFOs (124) bisher einzeln jeweils über die Modifikation von Cysteinen erfolgt ist und somit eine direkte Kombination nicht möglich ist. Abhilfe könnte dadurch geschaffen werden, dass scPvuII zunächst über Cystein-Modifikation mit Azobenzol-Schaltern versehen wird, und anschließend das TFO über Intein-vermittelte Protein-Ligation an das C-terminale Ende angehängt werden könnte (158). Die Anwendung dieser lichtschtbaren Meganuklease in die Zelle wäre durch Profektion möglich, wobei dabei Proteine unter anderem durch Verwendung von kationischen amphiphilen Lipiden (159) oder Zell-eindringenden Peptiden (160) in die Zelle und speziell auch in den Nukleus eingebracht werden können. Bei der konkreten Anwendung am Menschen ist dabei weniger eine Anwendung *in vivo* denkbar, sondern vielmehr könnte die Rekonstitution eines defekten Gens *ex vivo* erfolgen, wobei einzelne Zellen, z.B. Fibroblasten des Patienten entnommen und kultiviert werden und nach erfolgtem Austausch des entsprechenden Gens wieder in den Patienten überführt werden (126). Eine lichtsteuerbare Meganuklease könnte in solch kultivierte Zellen im inaktiven Zustand eingebracht werden und die Aktivierung nach entsprechender Zeit zur Ausbildung einer spezifischen Tripel-Helix durch das TFO an einer adressierten Spaltsequenz, durch einen kurzen UV-Lichtimpuls erfolgen. Die Inaktivierung nach erfolgtem Doppelstrangbruch kann dann wiederum durch thermische Relaxation oder durch einen Impuls mit blauem Licht erfolgen, denn wie gezeigt wurde, stellt sich der Aktivitätslevel eines jeden Belichtungszustands unmittelbar nach Beginn der Belichtung mit der jeweiligen Wellenlänge ein.

Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass sich für die besten lichtschtbaren Varianten von scPvuII ein 16-facher Unterschied zwischen dem „An“- und „Aus“-Level *in vitro* ergibt. Ob dieser Effekt ausreichend für eine Regulation der DNA-Spaltaktivität *in vivo* ist, müsste dabei konkret im Experiment nachgewiesen werden, jedoch wäre eine Steigerung bestenfalls auf ein Alles-oder-Nichts Level dabei durchaus zielorientierter. Dies könnte - wie in Punkt 4.3 diskutiert - insbesondere durch Verwendung substituierter Azobenzol-Derivate erreicht

werden. Zudem ist es aber wegen der in mehreren Schritten verlaufenden Aufreinigung der modifizierten scPvuII-Varianten zurzeit noch schwierig, ausreichende Mengen an lichtschalbarem Protein für *ex vivo* - Experimente zu produzieren.

Insgesamt gesehen bietet der in dieser Arbeit entwickelte Licht-Schalt-Effekt mit einem 16-fachen Aktivitätsunterschied zwischen dem „An“ und „Aus“ - Level großes Potential für die Gen-Ersatz-Therapie. Durch zukünftiges Koppeln mit DNA-Bindungsmodulen und *in vivo* - Spaltexperimenten müsste jedoch belegt werden, ob dieser in der *Photoswitch*-Strategie maximal erreichte Effekt für die *in vivo* Anwendung bereits ausreicht, oder ob auf Grundlage des erhaltenen Effekts dieser durch den Einsatz von modifizierten Azobenzol-Derivaten - wie diskutiert - noch gesteigert werden müsste. Jedoch würde dieser bisher erreichte Faktor (> 10) übertragen auf andere Proteine theoretisch durchaus ausreichen, um Stoffwechsel-Wege oder Signal-Transduktionskaskaden, beispielsweise durch Regulation einer Protein-Kinase (vgl. (161)), auf zellulärer Ebene zu kontrollieren.

## 5. Zusammenfassung

In dieser Arbeit konnte in Form eines „*proof-of-principle*“ bewiesen werden, dass es funktionell möglich ist, die Aktivität des Restriktionsenzym *scPvuII* durch chemische Modifikation mit lichtschtbaren Azobenzol-Derivaten mit Hilfe von Licht zu regulieren. Dabei wurden insgesamt 38 Varianten von *scPvuII* mit Azobenzol-Derivaten modifiziert und nach einer optimierten Aufreinigung des erwünschten Modifikationsprodukts auf licht-sensitive Effekte der Aktivität hingehend untersucht.

In der gewählten *Photogate*-Strategie konnten bisher keine größeren Licht-Schalt-Effekte erzielt werden, da es nicht gelungen ist, eine lichtschtbare mechanische Barriere am Eingang der DNA-Bindungsstelle durch Modifikation mit mono-funktionellen Azobenzol-Derivaten zu errichten.

Dagegen konnten in der *Photoswitch*-Strategie durch das Anbringen von bi-funktionellen Azobenzol-Schaltern insbesondere in die Region des aktiven Zentrums deutliche Aktivitätsunterschiede aufgrund spezifischer Belichtung festgestellt werden, während das Anbringen der Schalter in helikalen Regionen der DNA-Bindungsstelle wiederum nur verschwindend kleine Effekte zeigte. Der bisher beste Licht-Schalter-Effekt konnte bei zwei verschiedenen Varianten von *scPvuII* unabhängig voneinander durch jeweils zwei Azobenzol-Schalter im Bereich des aktiven Zentrums in Kombination mit einer die katalytische Aktivität beeinflussenden zusätzlichen Mutation gefunden werden, mit einem 16-fach höheren Aktivitätslevel in der durch UV-Licht induzierten *cis*-Konfiguration gegenüber der durch blaues Licht induzierten *trans*-Konfiguration der angehängten Azobenzol-Schalter.

Es wurde gezeigt, dass die enzymatische Aktivität vollständig reversibel über mehrere Isomerisierungszyklen hinweg und zeitlich unmittelbar durch spezifische Belichtung reguliert werden konnte, dass aber die enzymatische Aktivität auch vom hohen Aktivitätslevel im *cis*-Zustand durch thermische Relaxation, die über die angehängten Azobenzol-Schalter vermittelt wird, in das Aktivitätslevel des *trans*-Zustands vollständig zurückgeführt werden kann. Der lichtabhängige Aktivitätsunterschied beruht dabei hauptsächlich auf einer direkten Beeinflussung der Katalyse ( $V_{\max}$ ), wobei der durch die Photoisomerisierung von der *cis*- in die *trans*-Konfiguration hervorgerufene mechanische Stress aller Wahrscheinlichkeit nach einen aktiven Druck auf die Faltblattstränge im aktiven Zentrum ausübt und so zu einer Inaktivierung des Enzyms führt.

Insgesamt gesehen befindet sich der in dieser Arbeit erfolgreich entwickelte Licht-Schalt-Effekt von 16 an der oberen Grenze des theoretisch Möglichen dieses Konzepts, das durch die

Photochemie von Azobenzol begrenzt ist, spiegelt aber dennoch die Möglichkeit wieder, das Konzept der *Photoswitch*-Strategie universell auf andere Proteine übertragen zu können.

Überdies bietet das generierte lichtsichtbare Restriktionsenzym durch Konjugation mit zusätzlichen DNA-Bindemodulen, wie beispielsweise Zink-Finger-Domänen, für zukünftige Applikationen das Potential, das Adressieren definierter genomischer Bereiche auf zellulärer Ebene gezielt zeitlich und räumlich kontrollieren zu können.

## 6. Literatur

1. Wald G (1968) The molecular basis of visual excitation. *Nature* 219(5156):800-807
2. Mayer G & Heckel A (2006) Biologically active molecules with a "light switch". *Angew Chem Int Ed Engl* 45(30):4900-4921
3. Gorostiza P & Isacoff EY (2008) Optical switches for remote and noninvasive control of cell signaling. *Science* 322(5900):395-399
4. Ikeda T, Mamiya J, & Yu Y (2007) Photomechanics of liquid-crystalline elastomers and other polymers. *Angew Chem Int Ed Engl* 46(4):506-528
5. Knor G (2009) Artificial enzyme catalysis controlled and driven by light. *Chemistry* 15(3):568-578
6. Renner C & Moroder L (2006) Azobenzene as conformational switch in model peptides. *Chembiochem* 7(6):868-878
7. Willner I & Rubin S (1996) Control of the Structure and Functions of Biomaterials by Light. *Angewandte Chemie International Edition in English* 35(4):367-385
8. Yu Y, Nakano M, & Ikeda T (2003) Photomechanics: directed bending of a polymer film by light. *Nature* 425(6954):145
9. Edwards WF, Young DD, & Deiters A (2009) Light-activated Cre recombinase as a tool for the spatial and temporal control of gene function in mammalian cells. *ACS Chem Biol* 4(6):441-445
10. McCray JA & Trentham DR (1989) Properties and uses of photoreactive caged compounds. *Annu Rev Biophys Biophys Chem* 18:239-270
11. Rathert P, Rasko T, Roth M, Slaska-Kiss K, Pingoud A, Kiss A, & Jeltsch A (2007) Reversible inactivation of the CG specific SssI DNA (cytosine-C5)-methyltransferase with a photocleavable protecting group. *Chembiochem* 8(2):202-207
12. Lee HM, Larson DR, & Lawrence DS (2009) Illuminating the chemistry of life: design, synthesis, and applications of "caged" and related photoresponsive compounds. *ACS Chem Biol* 4(6):409-427
13. Strickland D, Moffat K, & Sosnick TR (2008) Light-activated DNA binding in a designed allosteric protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(31):10709-10714
14. Wu YI, Frey D, Lungu OI, Jaehrig A, Schlichting I, Kuhlman B, & Hahn KM (2009) A genetically encoded photoactivatable Rac controls the motility of living cells. *Nature* 461(7260):104-108
15. Fujimoto K, Amano M, Horibe Y, & Inouye M (2006) Reversible photoregulation of helical structures in short peptides under indoor lighting/dark conditions. *Org Lett* 8(2):285-287
16. Willner I (1997) Photoswitchable Biomaterials: En Route to Optobioelectronic Systems. *Accounts of Chemical Research* 30(9):347-356
17. Crecca CR & Roitberg AE (2006) Theoretical study of the isomerization mechanism of azobenzene and disubstituted azobenzene derivatives. *J Phys Chem A* 110(26):8188-8203
18. Rau H (1990) in *Studies in Organic Chemistry: Photochromism, Molecules and Systems. Vol. 40* Elsevier, Amsterdam:165-192

19. Pozhidaeva N, Cormier ME, Chaudhari A, & Woolley GA (2004) Reversible photocontrol of peptide helix content: adjusting thermal stability of the cis state. *Bioconjug Chem* 15(6):1297-1303
20. Cembran A, Bernardi F, Garavelli M, Gagliardi L, & Orlandi G (2004) On the mechanism of the cis-trans isomerization in the lowest electronic states of azobenzene: S0, S1, and T1. *J Am Chem Soc* 126(10):3234-3243
21. Shao J, Lei Y, Wen Z, Dou Y, & Wang Z (2008) Nonadiabatic simulation study of photoisomerization of azobenzene: detailed mechanism and load-resisting capacity. *J Chem Phys* 129(16):164111
22. Fujino T, Arzhantsev SY, & Tahara T (2001) Femtosecond Time-Resolved Fluorescence Study of Photoisomerization of trans-Azobenzene. *The Journal of Physical Chemistry A* 105(35):8123-8129
23. Nägele T, Hoche R, Zinth W, & Wachtveitl J (1997) Femtosecond photoisomerization of cis-azobenzene. *Chemical Physics Letters* 272(5-6):489-495
24. Dong SL, Loweneck M, Schrader TE, Schreier WJ, Zinth W, Moroder L, & Renner C (2006) A photocontrolled beta-hairpin peptide. *Chemistry* 12(4):1114-1120
25. James DA, Burns DC, & Woolley GA (2001) Kinetic characterization of ribonuclease S mutants containing photoisomerizable phenylazophenylalanine residues. *Protein Eng* 14(12):983-991
26. Nomura A & Okamoto A (2009) Photoresponsive tandem zinc finger peptide. *Chem Commun (Camb)* (14):1906-1908
27. Parisot J, Kurz K, Hilbrig F, & Freitag R (2009) Use of azobenzene amino acids as photo-responsive conformational switches to regulate antibody-antigen interaction. *J Sep Sci* 32(10):1613-1624
28. Muranaka N, Hohsaka T, & Sisido M (2002) Photoswitching of peroxidase activity by position-specific incorporation of a photoisomerizable non-natural amino acid into horseradish peroxidase. *FEBS Lett* 510(1-2):10-12
29. Nakayama K, Endo M, & Majima T (2004) Photochemical regulation of the activity of an endonuclease BamHI using an azobenzene moiety incorporated site-selectively into the dimer interface. *Chem Commun (Camb)* (21):2386-2387
30. Bose M, Groff D, Xie J, Brustad E, & Schultz PG (2006) The incorporation of a photoisomerizable amino acid into proteins in E. coli. *J Am Chem Soc* 128(2):388-389
31. Gorostiza P & Isacoff EY (2008) Nanoengineering ion channels for optical control. *Physiology (Bethesda)* 23:238-247
32. Woolley GA (2005) Photocontrolling peptide alpha helices. *Acc Chem Res* 38(6):486-493
33. Kim Y, Phillips JA, Liu H, Kang H, & Tan W (2009) Using photons to manipulate enzyme inhibition by an azobenzene-modified nucleic acid probe. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(16):6489-6494
34. Liu M, Asanuma H, & Komiyama M (2006) Azobenzene-tethered T7 promoter for efficient photoregulation of transcription. *J Am Chem Soc* 128(3):1009-1015
35. Pearson D, Alexander N, & Abell AD (2008) Improved Photocontrol of alpha-Chymotrypsin Activity: Peptidomimetic Trifluoromethylketone Photoswitch Enzyme Inhibitors. *Chemistry* 14(24):7358-7365

36. Westmark P, Kelly J, & Smith B (1993) Photoregulation of enzyme activity. Photochromic, transition-state-analog inhibitors of cysteine and serine proteases. *J Am Chem Soc* 115(9):3416-3419
37. Muramatsu S, Kinbara K, Taguchi H, Ishii N, & Aida T (2006) Semibiological molecular machine with an implemented "AND" logic gate for regulation of protein folding. *J Am Chem Soc* 128(11):3764-3769
38. Yamada MD, Nakajima Y, Maeda H, & Maruta S (2007) Photocontrol of kinesin ATPase activity using an azobenzene derivative. *J Biochem* 142(6):691-698
39. Gorostiza P, Volgraf M, Numano R, Szobota S, Trauner D, & Isacoff EY (2007) Mechanisms of photoswitch conjugation and light activation of an ionotropic glutamate receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(26):10865-10870
40. Numano R, Szobota S, Lau AY, Gorostiza P, Volgraf M, Roux B, Trauner D, & Isacoff EY (2009) Nanosculpting reversed wavelength sensitivity into a photoswitchable iGluR. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(16):6814-6819
41. Volgraf M, Gorostiza P, Numano R, Kramer RH, Isacoff EY, & Trauner D (2006) Allosteric control of an ionotropic glutamate receptor with an optical switch. *Nat Chem Biol* 2(1):47-52
42. Kusebauch U, Cadamuro SA, Musiol HJ, Moroder L, & Renner C (2007) Photocontrol of the collagen triple helix: synthesis and conformational characterization of bis-cysteinyl collagenous peptides with an azobenzene clamp. *Chemistry* 13(10):2966-2973
43. Umeki N, Yoshizawa T, Sugimoto Y, Mitsui T, Wakabayashi K, & Maruta S (2004) Incorporation of an azobenzene derivative into the energy transducing site of skeletal muscle myosin results in photo-induced conformational changes. *J Biochem* 136(6):839-846
44. Guerrero L, Smart OS, Weston CJ, Burns DC, Woolley GA, & Allemann RK (2005) Photochemical regulation of DNA-binding specificity of MyoD. *Angew Chem Int Ed Engl* 44(47):7778-7782
45. Woolley GA, Jaikaran AS, Berezovski M, Calarco JP, Krylov SN, Smart OS, & Kumita JR (2006) Reversible photocontrol of DNA binding by a designed GCN4-bZIP protein. *Biochemistry* 45(19):6075-6084
46. Zhang F, Zarrine-Afsar A, Al-Abdul-Wahid MS, Prosser RS, Davidson AR, & Woolley GA (2009) Structure-based approach to the photocontrol of protein folding. *J Am Chem Soc* 131(6):2283-2289
47. Jog PV & Gin MS (2008) A Light-Gated Synthetic Ion Channel. *Org Lett*
48. Ludwig S & Bayley H (2006) Photoisomerization of an individual azobenzene molecule in water: an on-off switch triggered by light at a fixed wavelength. *J Am Chem Soc* 128(38):12404-12405
49. Shishido H, Yamada MD, Kondo K, & Maruta S (2009) Photocontrol of calmodulin interaction with target peptides using azobenzene derivative. *J Biochem*
50. Banghart M, Borges K, Isacoff E, Trauner D, & Kramer RH (2004) Light-activated ion channels for remote control of neuronal firing. *Nat Neurosci* 7(12):1381-1386
51. Chambers JJ, Banghart MR, Trauner D, & Kramer RH (2006) Light-induced depolarization of neurons using a modified Shaker K(+) channel and a molecular photoswitch. *J Neurophysiol* 96(5):2792-2796

52. Szobota S, Gorostiza P, Del Bene F, Wyart C, Fortin DL, Kolstad KD, Tulyathan O, Volgraf M, Numano R, Aaron HL, Scott EK, Kramer RH, Flannery J, Baier H, Trauner D, & Isacoff EY (2007) Remote control of neuronal activity with a light-gated glutamate receptor. *Neuron* 54(4):535-545
53. Harvey JH & Trauner D (2008) Regulating enzymatic activity with a photoswitchable affinity label. *Chembiochem* 9(2):191-193
54. Willner I, Rubin S, & Riklin A (1991) Photoregulation of papain activity through anchoring photochromic azo groups to the enzyme backbone. *Journal of the American Chemical Society* 113(9):3321-3325
55. Kumita JR, Smart OS, & Woolley GA (2000) Photo-control of helix content in a short peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(8):3803-3808
56. Flint DG, Kumita JR, Smart OS, & Woolley GA (2002) Using an azobenzene cross-linker to either increase or decrease peptide helix content upon trans-to-cis photoisomerization. *Chem Biol* 9(3):391-397
57. Kumita JR, Flint DG, Smart OS, & Woolley GA (2002) Photo-control of peptide helix content by an azobenzene cross-linker: steric interactions with underlying residues are not critical. *Protein Eng* 15(7):561-569
58. Kumita JR, Flint DG, Woolley GA, & Smart OS (2002) Achieving photo-control of protein conformation and activity: producing a photo-controlled leucine zipper. *Faraday Discuss* 122:89-103; discussion 171-190
59. Zhang Z, Burns DC, Kumita JR, Smart OS, & Woolley GA (2003) A water-soluble azobenzene cross-linker for photocontrol of peptide conformation. *Bioconjug Chem* 14(4):824-829
60. Burns DC, Flint DG, Kumita JR, Feldman HJ, Serrano L, Zhang Z, Smart OS, & Woolley GA (2004) Origins of helix-coil switching in a light-sensitive peptide. *Biochemistry* 43(49):15329-15338
61. Guerrero L, Smart OS, Woolley GA, & Allemann RK (2005) Photocontrol of DNA binding specificity of a miniature engrailed homeodomain. *J Am Chem Soc* 127(44):15624-15629
62. Chi L, Sadovski O, & Woolley GA (2006) A blue-green absorbing cross-linker for rapid photoswitching of peptide helix content. *Bioconjug Chem* 17(3):670-676
63. Kusebauch U, Cadamuro SA, Musiol HJ, Lenz MO, Wachtveitl J, Moroder L, & Renner C (2006) Photocontrolled folding and unfolding of a collagen triple helix. *Angew Chem Int Ed Engl* 45(42):7015-7018
64. Beharry AA, Sadovski O, & Woolley GA (2008) Photo-control of peptide conformation on a timescale of seconds with a conformationally constrained, blue-absorbing, photo-switchable linker. *Org Biomol Chem* 6(23):4323-4332
65. Kneissl S, Loveridge EJ, Williams C, Crump MP, & Allemann RK (2008) Photocontrollable peptide-based switches target the anti-apoptotic protein Bcl-xL. *Chembiochem* 9(18):3046-3054
66. Fortin DL, Banghart MR, Dunn TW, Borges K, Wagenaar DA, Gaudry Q, Karakossian MH, Otis TS, Kristan WB, Trauner D, & Kramer RH (2008) Photochemical control of endogenous ion channels and cellular excitability. *Nat Methods* 5(4):331-338

67. Ueda T, Murayama K, Yamamoto T, Kimura S, & Imanishi Y (1994) Photo-regulation of hydrolysis activity of semisynthetic mutant phospholipases A<sub>2</sub> replaced by non-natural aromatic amino acids. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* (2):225-230
68. Liu D, Karanicolas J, Yu C, Zhang Z, & Woolley GA (1997) Site-specific incorporation of photoisomerizable azobenzene groups into ribonuclease S. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 7(20):2677-2680
69. Shimoboji T, Larenas E, Fowler T, Kulkarni S, Hoffman AS, & Stayton PS (2002) Photoresponsive polymer-enzyme switches. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(26):16592-16596
70. Matsunaga D, Asanuma H, & Komiyama M (2004) Photoregulation of RNA digestion by RNase H with azobenzene-tethered DNA. *J Am Chem Soc* 126(37):11452-11453
71. Nakayama K, Endo M, & Majima T (2005) A hydrophilic azobenzene-bearing amino acid for photochemical control of a restriction enzyme BamHI. *Bioconjug Chem* 16(6):1360-1366
72. Kuil J, van Wandelen LT, de Mol NJ, & Liskamp RM (2008) A photoswitchable ITAM peptidomimetic: synthesis and real time surface plasmon resonance (SPR) analysis of the effects of cis-trans isomerization on binding. *Bioorg Med Chem* 16(3):1393-1399
73. Gregory JD (1955) The Stability of N-Ethylmaleimide and its Reaction with Sulfhydryl Groups. *Journal of the American Chemical Society* 77(14):3922-3923
74. Roberts RJ, Belfort M, Bestor T, Bhagwat AS, Bickle TA, Bitinaite J, Blumenthal RM, Degtyarev S, Dryden DT, Dybvig K, Firman K, Gromova ES, Gumport RI, Halford SE, Hattman S, Heitman J, Hornby DP, Janulaitis A, Jeltsch A, Josephsen J, Kiss A, Klaenhammer TR, Kobayashi I, Kong H, Kruger DH, Lacks S, Marinus MG, Miyahara M, Morgan RD, Murray NE, Nagaraja V, Piekarowicz A, Pingoud A, Raleigh E, Rao DN, Reich N, Repin VE, Selker EU, Shaw PC, Stein DC, Stoddard BL, Szybalski W, Trautner TA, Van Etten JL, Vitor JM, Wilson GG, & Xu SY (2003) A nomenclature for restriction enzymes, DNA methyltransferases, homing endonucleases and their genes. *Nucleic Acids Res* 31(7):1805-1812
75. Pingoud A, Fuxreiter M, Pingoud V, & Wende W (2005) Type II restriction endonucleases: structure and mechanism. *Cell Mol Life Sci* 62(6):685-707
76. Ehbrecht HJ, Pingoud A, Urbanke C, Maass G, & Gualerzi C (1985) Linear diffusion of restriction endonucleases on DNA. *J Biol Chem* 260(10):6160-6166
77. Jack WE, Terry BJ, & Modrich P (1982) Involvement of outside DNA sequences in the major kinetic path by which EcoRI endonuclease locates and leaves its recognition sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79(13):4010-4014
78. Terry BJ, Jack WE, & Modrich P (1985) Facilitated diffusion during catalysis by EcoRI endonuclease. Nonspecific interactions in EcoRI catalysis. *J Biol Chem* 260(24):13130-13137
79. Bonnet I, Biebricher A, Porte PL, Loverdo C, Benichou O, Voituriez R, Escude C, Wende W, Pingoud A, & Desbiolles P (2008) Sliding and jumping of single EcoRV restriction enzymes on non-cognate DNA. *Nucleic Acids Res* 36(12):4118-4127
80. Berkhout B & van Wamel J (1996) Accurate scanning of the BssHII endonuclease in search for its DNA cleavage site. *J Biol Chem* 271(4):1837-1840

81. Jeltsch A, Alves J, Wolfes H, Maass G, & Pingoud A (1994) Pausing of the restriction endonuclease EcoRI during linear diffusion on DNA. *Biochemistry* 33(34):10215-10219
82. Jeltsch A & Pingoud A (1998) Kinetic characterization of linear diffusion of the restriction endonuclease EcoRV on DNA. *Biochemistry* 37(8):2160-2169
83. Jeltsch A, Wenz C, Wende W, Selent U, & Pingoud A (1996) Engineering novel restriction endonucleases: principles and applications. *Trends Biotechnol* 14(7):235-238
84. Gowers DM & Halford SE (2003) Protein motion from non-specific to specific DNA by three-dimensional routes aided by supercoiling. *Embo J* 22(6):1410-1418
85. Halford SE (2001) Hopping, jumping and looping by restriction enzymes. *Biochem Soc Trans* 29(Pt 4):363-374
86. Halford SE & Marko JF (2004) How do site-specific DNA-binding proteins find their targets? *Nucleic Acids Res* 32(10):3040-3052
87. Halford SE & Szczelkun MD (2002) How to get from A to B: strategies for analysing protein motion on DNA. *Eur Biophys J* 31(4):257-267
88. Baldwin GS, Sessions RB, Erskine SG, & Halford SE (1999) DNA cleavage by the EcoRV restriction endonuclease: roles of divalent metal ions in specificity and catalysis. *J Mol Biol* 288(1):87-103
89. Bowen LM & Dupureur CM (2003) Investigation of restriction enzyme cofactor requirements: a relationship between metal ion properties and sequence specificity. *Biochemistry* 42(43):12643-12653
90. Vipond IB, Baldwin GS, & Halford SE (1995) Divalent metal ions at the active sites of the EcoRV and EcoRI restriction endonucleases. *Biochemistry* 34(2):697-704
91. Selent U, Ruter T, Kohler E, Liedtke M, Thielking V, Alves J, Oelgeschlager T, Wolfes H, Peters F, & Pingoud A (1992) A site-directed mutagenesis study to identify amino acid residues involved in the catalytic function of the restriction endonuclease EcoRV. *Biochemistry* 31(20):4808-4815
92. Venclovas C, Timinskas A, & Siksnys V (1994) Five-stranded beta-sheet sandwiched with two alpha-helices: a structural link between restriction endonucleases EcoRI and EcoRV. *Proteins* 20(3):279-282
93. Aggarwal AK (1995) Structure and function of restriction endonucleases. *Curr Opin Struct Biol* 5(1):11-19
94. Winkler FK (1992) Structure and function of restriction endonucleases. *Current Opinions in Structural Biology* 2:93-99
95. Lukacs CM, Kucera R, Schildkraut I, & Aggarwal AK (2000) Understanding the immutability of restriction enzymes: crystal structure of BglII and its DNA substrate at 1.5 Å resolution. *Nat Struct Biol* 7(2):134-140
96. Newman M, Strzelecka T, Dorner LF, Schildkraut I, & Aggarwal AK (1994) Structure of restriction endonuclease BamHI and its relationship to EcoRI. *Nature* 368(6472):660-664
97. Pingoud A & Jeltsch A (1997) Recognition and cleavage of DNA by type-II restriction endonucleases. *Eur J Biochem* 246(1):1-22
98. Conlan LH & Dupureur CM (2002) Dissecting the metal ion dependence of DNA binding by PvuII endonuclease. *Biochemistry* 41(4):1335-1342

99. Conlan LH & Dupureur CM (2002) Multiple metal ions drive DNA association by PvuII endonuclease. *Biochemistry* 41(50):14848-14855
100. Dupureur CM & Conlan LH (2000) A catalytically deficient active site variant of PvuII endonuclease binds Mg(II) ions. *Biochemistry* 39(35):10921-10927
101. Horton JR & Cheng X (2000) PvuII endonuclease contains two calcium ions in active sites. *J Mol Biol* 300(5):1049-1056
102. Jose TJ, Conlan LH, & Dupureur CM (1999) Quantitative evaluation of metal ion binding to PvuII restriction endonuclease. *J Biol Inorg Chem* 4(6):814-823
103. Spyridaki A, Matzen C, Lanio T, Jeltsch A, Simoncsits A, Athanasiadis A, Scheuring-Vanamee E, Kokkinidis M, & Pingoud A (2003) Structural and biochemical characterization of a new Mg(2+) binding site near Tyr94 in the restriction endonuclease PvuII. *J Mol Biol* 331(2):395-406
104. Xie F & Dupureur CM (2009) Kinetic analysis of product release and metal ions in a metallonuclease. *Arch Biochem Biophys* 483(1):1-9
105. Xie F, Qureshi SH, Papadakos GA, & Dupureur CM (2008) One- and two-metal ion catalysis: global single-turnover kinetic analysis of the PvuII endonuclease mechanism. *Biochemistry* 47(47):12540-12550
106. Beese LS & Steitz TA (1991) Structural basis for the 3'-5' exonuclease activity of Escherichia coli DNA polymerase I: a two metal ion mechanism. *Embo J* 10(1):25-33
107. Cowan JA (1998) Metal Activation of Enzymes in Nucleic Acid Biochemistry. *Chem Rev* 98(3):1067-1088
108. Athanasiadis A, Vlassi M, Kotsifaki D, Tucker PA, Wilson KS, & Kokkinidis M (1994) Crystal structure of PvuII endonuclease reveals extensive structural homologies to EcoRV. *Nat Struct Biol* 1(7):469-475
109. Nastri HG, Evans PD, Walker IH, & Riggs PD (1997) Catalytic and DNA binding properties of PvuII restriction endonuclease mutants. *J Biol Chem* 272(41):25761-25767
110. Simoncsits A, Tjornhammar ML, Rasko T, Kiss A, & Pongor S (2001) Covalent joining of the subunits of a homodimeric type II restriction endonuclease: single-chain PvuII endonuclease. *J Mol Biol* 309(1):89-97
111. Meramveliotaki C, Kotsifaki D, Androulaki M, Hountas A, Eliopoulos E, & Kokkinidis M (2007) Purification, crystallization, X-ray diffraction analysis and phasing of an engineered single-chain PvuII restriction endonuclease. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* 63(Pt 10):836-838
112. Cheng X, Balendiran K, Schildkraut I, & Anderson JE (1994) Structure of PvuII endonuclease with cognate DNA. *Embo J* 13(17):3927-3935
113. Baltimore D (1978) Limiting science: a biologist's perspective. *Daedalus* 107(2):37-45
114. Hacein-Bey-Abina S, Von Kalle C, Schmidt M, McCormack MP, Wulffraat N, Leboulch P, Lim A, Osborne CS, Pawliuk R, Morillon E, Sorensen R, Forster A, Fraser P, Cohen JI, de Saint Basile G, Alexander I, Wintergerst U, Frebourg T, Aurias A, Stoppa-Lyonnet D, Romana S, Radford-Weiss I, Gross F, Valensi F, Delabesse E, Macintyre E, Sigaux F, Soulier J, Leiva LE, Wissler M, Prinz C, Rabbitts TH, Le Deist F, Fischer A, & Cavazzana-Calvo M (2003) LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science* 302(5644):415-419

115. Porteus MH, Connelly JP, & Pruett SM (2006) A look to future directions in gene therapy research for monogenic diseases. *PLoS Genet* 2(9):e133
116. Pingoud A & Silva GH (2007) Precision genome surgery. *Nat Biotechnol* 25(7):743-744
117. Redondo P, Prieto J, Munoz IG, Alibes A, Stricher F, Serrano L, Cabaniols JP, Daboussi F, Arnould S, Perez C, Duchateau P, Paques F, Blanco FJ, & Montoya G (2008) Molecular basis of xeroderma pigmentosum group C DNA recognition by engineered meganucleases. *Nature* 456(7218):107-111
118. Bibikova M, Carroll D, Segal DJ, Trautman JK, Smith J, Kim YG, & Chandrasegaran S (2001) Stimulation of homologous recombination through targeted cleavage by chimeric nucleases. *Mol Cell Biol* 21(1):289-297
119. Bibikova M, Golic M, Golic KG, & Carroll D (2002) Targeted chromosomal cleavage and mutagenesis in *Drosophila* using zinc-finger nucleases. *Genetics* 161(3):1169-1175
120. Carroll D (2004) Using nucleases to stimulate homologous recombination. *Methods Mol Biol* 262:195-207
121. Carroll D (2008) Progress and prospects: zinc-finger nucleases as gene therapy agents. *Gene Ther* 15(22):1463-1468
122. Urnov FD, Miller JC, Lee YL, Beausejour CM, Rock JM, Augustus S, Jamieson AC, Porteus MH, Gregory PD, & Holmes MC (2005) Highly efficient endogenous human gene correction using designed zinc-finger nucleases. *Nature* 435(7042):646-651
123. Rusling DA, Powers VE, Ranasinghe RT, Wang Y, Osborne SD, Brown T, & Fox KR (2005) Four base recognition by triplex-forming oligonucleotides at physiological pH. *Nucleic Acids Res* 33(9):3025-3032
124. Eisenschmidt K, Lanio T, Simoncsits A, Jeltsch A, Pingoud V, Wende W, & Pingoud A (2005) Developing a programmed restriction endonuclease for highly specific DNA cleavage. *Nucleic Acids Res* 33(22):7039-7047
125. Cathomen T & Joung JK (2008) Zinc-finger nucleases: the next generation emerges. *Mol Ther* 16(7):1200-1207
126. Paques F & Duchateau P (2007) Meganucleases and DNA double-strand break-induced recombination: perspectives for gene therapy. *Curr Gene Ther* 7(1):49-66
127. Hugel T, Holland NB, Cattani A, Moroder L, Seitz M, & Gaub HE (2002) Single-molecule optomechanical cycle. *Science* 296(5570):1103-1106
128. Carrion-Vazquez M, Oberhauser AF, Fowler SB, Marszalek PE, Broedel SE, Clarke J, & Fernandez JM (1999) Mechanical and chemical unfolding of a single protein: a comparison. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(7):3694-3699
129. Oberhauser AF, Marszalek PE, Erickson HP, & Fernandez JM (1998) The molecular elasticity of the extracellular matrix protein tenascin. *Nature* 393(6681):181-185
130. Rief M, Gautel M, Oesterhelt F, Fernandez JM, & Gaub HE (1997) Reversible unfolding of individual titin immunoglobulin domains by AFM. *Science* 276(5315):1109-1112
131. Dias AR, Minas Da Piedade ME, Martinho Simoes JA, Simoni C, Teixeira C, & Diogo HP (1992) Enthalpies of formation of *cis*-azobenzene and *trans*-azobenzene. *J. Chem. Thermodynamics* 24(4):439-447

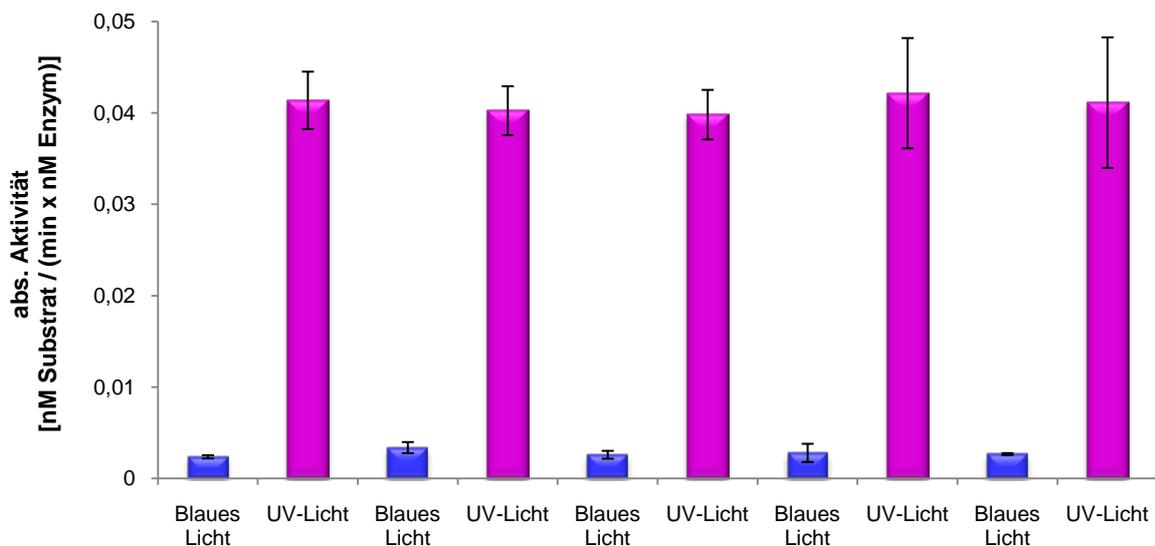
132. Simoncsits A, Chen J, Percipalle P, Wang S, Toro I, & Pongor S (1997) Single-chain repressors containing engineered DNA-binding domains of the phage 434 repressor recognize symmetric or asymmetric DNA operators. *J Mol Biol* 267(1):118-131
133. Stoker NG, Fairweather NF, & Spratt BG (1982) Versatile low-copy-number plasmid vectors for cloning in *Escherichia coli*. *Gene* 18(3):335-341
134. Bolivar F, Rodriguez RL, Greene PJ, Betlach MC, Heyneker HL, & Boyer HW (1977) Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. *Gene* 2(2):95-113
135. Le Thi H, Schierling B, Ryazanova AY, Zatsepin TS, Volkov EM, Kubareva EA, Velichko TI, Pingoud A, & Oretskaya TS (2009) New Azobenzene Derivatives for Directed Modification of Proteins. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry* 35(5):549-555
136. Birnboim HC & Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7(6):1513-1523
137. Mullis KB, Ferre F, & Gibbs RA (1994) *The polymerase chain reaction*. (Birkhäuser, Bosten.).
138. Wallace RB, Shaffer J, Murphy RF, Bonner J, Hirose T, & Itakura K (1979) Hybridization of synthetic oligodeoxyribonucleotides to phi chi 174 DNA: the effect of single base pair mismatch. *Nucleic Acids Res* 6(11):3543-3557
139. Kirsch RD & Joly E (1998) An improved PCR-mutagenesis strategy for two-site mutagenesis or sequence swapping between related genes. *Nucleic Acids Res* 26(7):1848-1850
140. Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259):680-685
141. Kang D, Gho SG, Suh M, & Kang C (2002) Highly Sensitive and Fast Protein Detection with Coomassie Brilliant Blue in Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *Bull. Korean Chem. Soc.* 23(11):1151-1152
142. Rabilloud T, Carpentier G, & Tarroux P (1988) Improvement and simplification of low-background silver staining of proteins by using sodium dithionite. *Electrophoresis* 9(6):288-291
143. Pace CN, Vajdos F, Fee L, Grimsley G, & Gray T (1995) How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Sci* 4(11):2411-2423
144. Michaelis M & Menten ML (1913) Die Kinetik der Invertinwirkung. *Biochem. Z.* 49:333-369
145. Woolley GA, Lee ES, & Zhang F (2006) sGAL: a computational method for finding surface exposed sites in proteins suitable for Cys-mediated cross-linking. *Bioinformatics* 22(24):3101-3102
146. Wei H, Therrien C, Blanchard A, Guan S, & Zhu Z (2008) The Fidelity Index provides a systematic quantitation of star activity of DNA restriction endonucleases. *Nucleic Acids Res* 36(9):e50
147. Bianke G, Chaurin V, Egorov M, Lebreton J, Constable EC, Housecroft CE, & Haner R (2006) Copper complex-assisted DNA hybridization. *Bioconjug Chem* 17(6):1441-1446
148. Furia TE (1972) Stability Constants (log  $K_1$ ) of Various Metal Chelates. *CRC Handbook of Food Additives:Chapter 6 - Sequestrants in Foods*

149. Masoud MS & Abd El-Hamid OH (1989) Structural chemistry of amino acid complexes. *Transition Met. Chem.* 14(3):233-234
150. Schulze C, Jeltsch A, Franke I, Urbanke C, & Pingoud A (1998) Crosslinking the EcoRV restriction endonuclease across the DNA-binding site reveals transient intermediates and conformational changes of the enzyme during DNA binding and catalytic turnover. *EMBO J* 17(22):6757-6766
151. Genick UK, Soltis SM, Kuhn P, Canestrelli IL, & Getzoff ED (1998) Structure at 0.85 Å resolution of an early protein photocycle intermediate. *Nature* 392(6672):206-209
152. Hellingwerf KJ, Hoff WD, & Crielaard W (1996) Photobiology of microorganisms: how photosensors catch a photon to initialize signalling. *Mol Microbiol* 21(4):683-693
153. Henriksen EK, Moan J, Kaalhus O, & Brunborg G (1996) Induction and repair of DNA damage in UV-irradiated human lymphocytes. Spectral differences and repair kinetics. *J Photochem Photobiol B* 32(1-2):39-48
154. Schindl A, Klosner G, Honigsmann H, Jori G, Calzavara-Pinton PC, & Trautinger F (1998) Flow cytometric quantification of UV-induced cell death in a human squamous cell carcinoma-derived cell line: dose and kinetic studies. *J Photochem Photobiol B* 44(2):97-106
155. Robert C, Muel B, Benoit A, Dubertret L, Sarasin A, & Sary A (1996) Cell survival and shuttle vector mutagenesis induced by ultraviolet A and ultraviolet B radiation in a human cell line. *J Invest Dermatol* 106(4):721-728
156. Sadvoski O, Beharry AA, Zhang F, & Woolley GA (2009) Spectral tuning of azobenzene photoswitches for biological applications. *Angew Chem Int Ed Engl* 48(8):1484-1486
157. Boulegue C, Loweneck M, Renner C, & Moroder L (2007) Redox potential of azobenzene as an amino acid residue in peptides. *Chembiochem* 8(6):591-594
158. Lovrinovic M, Seidel R, Wacker R, Schroeder H, Seitz O, Engelhard M, Goody RS, & Niemeyer CM (2003) Synthesis of protein-nucleic acid conjugates by expressed protein ligation. *Chem Commun (Camb)* (7):822-823
159. van der Gun BT, Monami A, Laarmann S, Rasko T, Slaska-Kiss K, Weinhold E, Wasserkort R, de Leij LF, Ruiters MH, Kiss A, & McLaughlin PM (2007) Serum insensitive, intranuclear protein delivery by the multipurpose cationic lipid SAINT-2. *J Control Release* 123(3):228-238
160. Deshayes S, Morris MC, Divita G, & Heitz F (2005) Cell-penetrating peptides: tools for intracellular delivery of therapeutics. *Cell Mol Life Sci* 62(16):1839-1849
161. Curley K & Lawrence DS (1999) Caged regulators of signaling pathways. *Pharmacol Ther* 82(2-3):347-354

## Addendum

Die wesentlichen Aspekte dieser Arbeit wurden als Publikation bei *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* eingereicht. In Folge des Revisionsprozesses sollten dazu noch Experimente nachgereicht werden, die allerdings erst nach der Fertigstellung dieser Doktorarbeit durchgeführt wurden. Da die daraus resultierenden Ergebnisse aber auch das in dieser Arbeit entwickelte System der Lichtschaltung enzymatischer Aktivität entsprechend unterstützen, werden sie in dieser Form als Addendum angehängt.

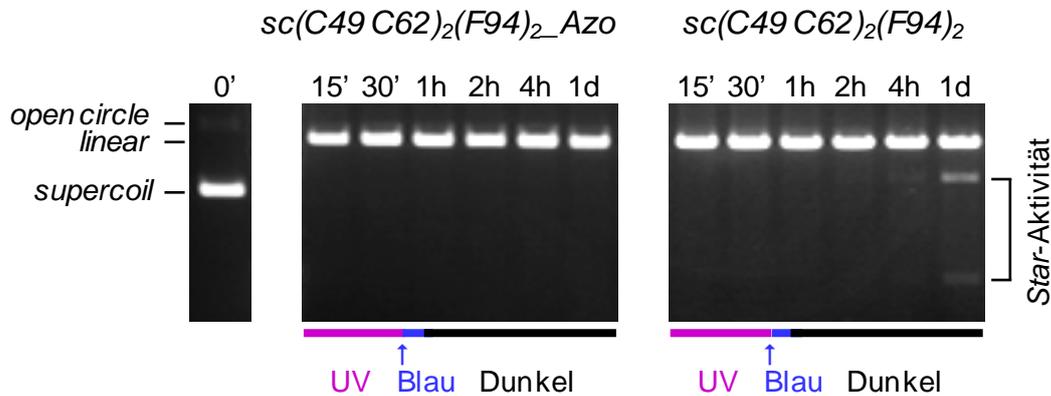
Abb. A-1 belegt, dass die enzymatische Aktivität der Variante *sc(C49 C62)<sub>2</sub>(F94)<sub>2</sub>Azo* in Analogie zu Abb. 3-16 über vier Schaltprozesse hinaus, nämlich über zehn Schaltprozesse hinweg reversibel zwischen den Aktivitätslevels im *cis*- und *trans*-Zustand hin und her geschaltet werden kann.



**Abb. A-1 Aktivitätstest unter spezifischer Belichtung von *sc(C49 C62)<sub>2</sub>(F94)<sub>2</sub>Azo* unter Vor-Belichtung der modifizierten Probe (blaues Licht → (UV-Licht → blaues Licht)<sub>4x</sub> → UV-Licht):** Gezeigt sind die absoluten Aktivitäten jedes Belichtungszustands innerhalb von zehn aufeinanderfolgenden Belichtungsänderungen (in Analogie zu Abb. 3-16).

Abb. A-2 zeigt, dass die Erkennungsspezifität der modifizierten Variante *sc(C49 C62)<sub>2</sub>(F94)<sub>2</sub>Azo* nicht vermindert ist, da das Substratplasmid auch bei längerer Inkubation des Enzyms mit entsprechend hoher Enzymkonzentration lediglich durch Spaltung an der PvuII-Erkennungssequenz linearisiert wird und darüber hinaus keine *star*-Aktivität (Spaltung

an der PvuII-Erkennungssequenz ähnlichen Erkennungssequenzen; vgl. Abb. 3-20) zu erkennen ist. Es konnte auch gezeigt werden, dass die bei der unmodifizierten Variante bei Inkubation > 4 h auftretende *star*-Aktivität bei der modifizierten Variante mit vergleichbarer Ausgangsaktivität nach Isomerisierung in den niedrigeren *trans*-Aktivitätslevel nicht auftritt.



**Abb. A-2 Vergleich der Spezifität von modifiziertem und unmodifiziertem  $sc(C49\ C62)_2(F94)_2$  durch Langzeit-Spaltung:** Gezeigt ist die gelelektrophoretische Analyse von Aliquots der Langzeitspaltung von pAT153 tri (4 nM) durch modifiziertes Enzym (70 nM; links) und unmodifiziertes Enzym (5,6 nM; rechts). Nach anfänglicher Spaltung im *cis*-Zustand unter Belichtung mit UV-Licht für 30 min, erfolgt eine Isomerisierung in den *trans*-Zustand durch Belichtung mit blauem Licht für 5 min. Anschließend erfolgt die weitere Spaltung im induzierten *trans*-Zustand im Dunkeln über Nacht. Die Inkubation erfolgt jeweils bei 37 °C. Die eingesetzten Enzymkonzentrationen sind so gewählt, dass die insgesamt eingesetzte Aktivität des modifizierten Enzyms im *cis*-Zustand der insgesamt eingesetzten Aktivität des unmodifizierten Enzyms entspricht (vgl. absolute Aktivitäten Tab. 3-9). Die anschließende Isomerisierung des modifizierten Enzyms in den 16-fach weniger aktiven *trans*-Zustand führt dazu, dass die bei dem unmodifizierten Enzym bei Inkubation > 4h über die Linearisierung hinausgehende, auftretenden *star*-Aktivität, hierbei unterdrückt wird.

Die zwei im Addendum aufgeführten Experimente stützen somit die Tatsache, dass ein System der Lichtschaltung geschaffen wurde, bei dem die enzymatische Aktivität eines Restriktionsenzym reversibel und exakt kontrollierbar durch Licht gesteuert werden kann.