

## Summary

Orthogonal aminoacyl-tRNA synthetase (aaRS)-tRNA pairs have enabled the expansion of the genetic code with non-canonical amino acids (ncAAs) providing chemistries beyond the 20 canonical building blocks. In this study, novel aaRSs based on *Methanocaldococcus jannaschii* tyrosyl-tRNA synthetase (*M*/TyrRS) were selected to site-specifically incorporate two ncAAs for the first time into proteins via stop codon suppression (SCS).

In the first project, a novel strategy for recombinant production of mussel-adhesive proteins (MAPs), rich in the ncAA 3,4-dihydroxy-phenylalanine (Dopa), was developed. Dopa's catechol side chain is crucial for adhesive abilities of marine mussels in wet environments, and is posttranslationally formed via tyrosine hydroxylation in nature, posing a challenge to conventional recombinant production systems. To overcome this problem, aaRSs activating the photocaged Dopa analog *ortho*-nitrobenzyl Dopa (ONB-Dopa) were selected from a computationally designed aaRS library in order to produce photocaged adhesive mussel proteins via multi-site incorporation of ONB-Dopa. The substrate-bound crystal structure of one aaRS variant elucidated the substrate binding mode based on a markedly expanded aaRS active site. Furthermore, this aaRS allowed efficient multi-site incorporation of ONB-Dopa into MAP type 5 via SCS in genomically recoded bacterial strains. For MAPs equipped with five instances of ONB-Dopa, a 12-fold increased underwater adhesion on mica surfaces was demonstrated via atomic force microscopy after removal of the ONB photocages via UV light. Thus, this study is the first to report specific multi-site incorporation of Dopa analogs into MAPs *in vivo*, conferring photoactivatable wet adhesion properties. The herein established photoactivatable bioglue has great potential for future applications in material sciences or biomedicine. Additionally, an efficient aaRS was selected for the structurally similar ncAA *ortho*-nitrobenzyl tyrosine (ONBY) utilizing the same computationally designed aaRS library. The obtained aaRS outperformed previously reported ONBY-specific aaRSs isolated from traditionally designed libraries. This finding thus indicates an improved general strategy for engineering novel aaRSs.

In the second project, novel aaRSs were selected for co-translational incorporation of the fluorescent ncAA  $\beta$ -(1-azulenyl)-alanine (AzAla) into proteins, thus broadening the experimental toolkit with a spectral probe pseudoisosteric to tryptophan. Mass spectrometry demonstrated the incorporation of AzAla via SCS into proteins, representing the first site-specific incorporation of the ncAA into proteins so far. Moreover, the substrate-bound crystal structure was solved and highlighted the mode of substrate accommodation involving unique aromatic interaction with both a tryptophan and a tyrosine residue of the aaRS active site. Additionally, by site-specific incorporation of AzAla into the chromophore of the KillerOrange protein, an unprecedented chromophore was engineered showing novel fluorescent properties. Due to AzAla's unique vibrational properties upon excitation with 600 nm light, the novel AzAlaRS variants will pave the way towards investigating vibrational energy transfer in proteins via site-specific labeling with the ncAA.

## Zusammenfassung

Orthogonale Aminoacyl-tRNA Synthetase (aaRS)-tRNA Paare ermöglichen die Erweiterung des genetischen Codes mittels nicht-kanonischer Aminosäuren (ncAAs), die chemische Funktionalitäten jenseits der 20 kanonischen Grundbausteine einbringen. In der vorliegenden Arbeit wurden neuartige, auf der *Methanocaldococcus jannaschii* Tyrosyl-tRNA Synthetase (*Mj*TyrRS) basierende aaRS Varianten selektiert um zwei ncAAs zum ersten Mal ortsspezifisch in Proteine mittels Suppression von Stopp-Codons (SCS) einzubauen.

Im ersten Projekt wurde eine neue Strategie zur rekombinanten Produktion von Muschel-adhäsiven Proteinen (MAPs) entwickelt, die reich an der ncAA 3,4-Dihydroxyphenylalanin (Dopa) sind. Die Catechol-Seitenkette von Dopa ist von zentraler Bedeutung für die Adhäsion mariner Muscheln in wässriger Umgebung und wird in der Natur posttranslational durch Tyrosin-Hydroxylierung gebildet, was eine Herausforderung für konventionelle rekombinante Produktionssysteme darstellt. Zur Lösung dieses Problems wurden aaRS Varianten aus einer mit Computer-gestützten Methoden entwickelten aaRS Bibliothek selektiert, die das fotoaktivierbare Dopa Analogon *ortho*-Nitrobenzyl-Dopa (ONB-Dopa) aktivieren und die Produktion fotoaktivierbarer MAPs erlauben. Die Substrat-gebundene Kristallstruktur einer aaRS Variante wurde gelöst und zeigte eine deutlich vergrößerte Bindetasche als Grundlage der Substratbindung. Die aaRS erlaubte den effizienten Einbau von ONB-Dopa in MAP Typ 5 an mehreren Positionen mittels SCS in genomisch neukodierten bakteriellen Stämmen. In Rasterkraftmikroskopie Messungen zeigten MAPs mit fünf ONB-Dopa Resten nach Entfernung der ONB Schutzgruppen durch UV-Licht eine 12-fache Zunahme der Adhäsion auf wässrigen Mica Oberflächen. Somit konnte in der vorliegenden Arbeit zum ersten Mal ein ortsspezifischer Einbau von Dopa-Analoga an mehreren Positionen in MAPs einhergehend mit fotoaktivierbaren Eigenschaften gezeigt werden. Der fotoaktivierbare Bioklebstoff verfügt über großes Potential für künftige Anwendungen im Bereich der Materialwissenschaften oder der Biomedizin. Darüber hinaus wurde eine effiziente aaRS für die strukturell ähnliche ncAA *ortho*-Nitrobenzyl Tyrosin (ONBY) selektiert, wobei dieselbe mit Computer-gestützten Methoden entwickelte aaRS Bibliothek als Ausgangspunkt genutzt wurde. Die aaRS übertraf die Effizienz bekannter ONBY-spezifischer Varianten, die aus traditionell konstruierten aaRS Bibliotheken selektiert wurden. Dies deutet darauf hin, dass Computer-gestütztes Design von Bibliotheken eine verbesserte generelle Strategie zur Entwicklung neuer aaRSs darstellt.

Im zweiten Projekt wurden neue aaRS Varianten selektiert, die den kotranslationalen Einbau der fluoreszenten ncAA  $\beta$ -(1-azulenyl)-alanine (AzAla) in Proteine ermöglichen. Hierdurch wurde das experimentelle Instrumentarium um eine spektrale Sonde erweitert, die pseudo-isoster zur Aminosäure Tryptophan ist. Der Einbau von AzAla in Proteine mittels SCS wurde durch Massenspektrometrie verifiziert und stellt den bisher ersten ortsspezifischen Einbau der ncAA in Proteine dar. Die Substrat-gebundene Kristallstruktur einer AzAlaRS Variante wurde gelöst und zeigte aromatische Wechselwirkungen der ncAA mit einem Tryptophan- und Tyrosin-Rest des aktiven Zentrums der aaRS. Durch den Einbau von AzAla in das Chromophor des KillerOrange Proteins wurde ein Chromophor mit neuen Fluoreszenzeigenschaften entwickelt. Aufgrund der Vibrationseigenschaften von AzAla bei Anregung mit Licht der Wellenlänge 600 nm, werden die neuen AzAlaRS Varianten den Weg für die Untersuchung des Vibrations-Energietransfers in Proteinen durch ortsspezifischen Einbau der ncAA ebnet.