

Abschließender Sachstandsbericht  
Leibniz-Wettbewerb

Titel: Controlling and Switching of Function of Peptide and Protein  
based BioSurfaces: From Fundamentals to Applications  
Projektnummer: K76/2017

---

**Berichtszeitraum:** 15.05.2018 – Mitte 2023

**Federführendes Leibniz-Institut:** Leibniz-Institut für Oberflächenmodifizierung (IOM)  
Koordination: Prof. Dr. Bernd Abel

**Projektleiter/innen:**

**Prof. Dr. Bernd Abel**, Leibniz-Institute of Surface Engineering (IOM), Permoserstr. 15,  
04318 Leipzig, Email: bernd.abel@iom-leipzig.de

**Prof. Dr. Annette Beck-Sickinger**, Universität Leipzig, Institut für Biochemie, Brüderstrasse  
34, 04103 Leipzig, Email: abeck-sickinger@uni-leipzig.de

Prof. Dr. Andrea Robitzki/**Dr. Heinz-Georg Jahnke** (seit 2020), University Leipzig, Center for  
Biotechnology and Biomedicine, Deutscher Platz 5, 04103 Leipzig, Email:  
andrea.robitzki@bbz.uni-leipzig.de/heinz-georg.jahnke@bbz.uni-leipzig.de

**Dr. H.-Jelger Risselada**, University Göttingen, Institut für Theoretische Physik, Friedrich-  
Hund-Platz 1, 37077 Göttingen, Email: hrissel@gwdg.de

**Prof. Dr. Helmut Grubmüller**, MPI für biophysikalische Chemie Göttingen, Am Fassberg 10,  
3400 Göttingen, Email: hgrubmu@gwdg.de

**Prof. Dr. Jan Münch**, Ulm University Medical Center, Institute of Molecular Virology,  
Meyerhofstrasse 1, 89081 Ulm, Email: jan.muench@uni-ulm.de

**Prof. Dr. Jörg Enderlein**, Universität Göttingen, III. Physical Institute, Friedrich-Hund-Platz 1,  
37077 Göttingen, E-mail: joerg.enderlein@phys.uni-goettingen.de

## Executive Summary

Das Ziel des Gesamtprojektes war es, zwei neue und innovative Hightech-Konzepte für biofunktionalisierte Oberflächen zu entwickeln sowie diese für Anwendungen in der Biotechnologie und der medizinischen Diagnostik zu optimieren. In der Zusammenarbeit dieses einzigartigen Konsortiums war es möglich, die molekularen Prozesse aufzuklären, mittels Theorie zu verstehen und die Ergebnisse aus der Grundlagenforschung letztendlich in verschiedene Anwendungen zu bringen, beispielsweise in den Bereichen Biotechnologie und Viren-Diagnostik. Das erste große Ziel des Vorhabens war die Immobilisierung und damit die Verankerung von großen funktionalen Enzymen mittels Ankerpeptiden auf leitfähigen bzw. halbleitenden Oberflächen, die durch Stromfluss an den Elektroden geladen bzw. „betrieben“ und regeneriert werden können. Dazu waren experimentelle und theoretische Arbeiten notwendig, die von den beteiligten Arbeitsgruppen durch- und zusammengeführt wurden. Eine Herausforderung im Bereich dieser biofunktionalisierten Oberflächen war die Analyse der Struktur und die Steuerung des immobilisierten biologischen Materials. Innerhalb des Projekts wurde dies am Cytochrom P450 BM3 Enzym untersucht, das innerhalb seiner Enzymfamilie über die höchste Aktivität für die Sauerstoff-abhängige Hydroxylierung von Fettsäuren verfügt und im Bereich der Wirkstoffentwicklung gefragt ist. Um potentiell industriell eingesetzt zu werden, musste der an der Reaktion beteiligte teure und instabile Redoxcofaktor NADPH ersetzt werden. Hierfür haben die Arbeiten im Projekt eindrucksvoll gezeigt, dass dies mittels Bioelektrokatalyse, d.h. dem Transfers von Elektronen von einer Elektrode direkt ins Enzym durchführbar ist. Es wurde schließlich ein Echtzeit-Monitoring-System aufgebaut, das die Basis bildet, um auch im mikrofluidischen Maßstab die bioelektrokatalytische Aktivität quantifizieren zu können. Hierfür wurden zunächst optimierte Enzym-Varianten hergestellt, die ein fluorometrisch in Echtzeit erfassbares Substrat stärker umsetzen. Parallel dazu erfolgte die Neukonzeption einer Multi-3-Elektroden-Konfiguration um 96 Arbeitselektroden in Mikrotiterplatten simultan und unabhängig voneinander in einem Fluoreszenzplattenreader zu multiparametrisch sowohl elektrochemisch als auch optisch zu analysieren. Damit kann die entwickelte Technik in der Zukunft ein Sprungbrett für die Untersuchung von Redoxenzymen mit elektrochemischer und optischer Kontrolle werden, wodurch Stabilitätsuntersuchungen möglich und Enzymaktivität nachverfolgbar steuerbar wird. Das zweite große Ziel war es, magnetische Mikro- und Nanopartikel mit selbst-assemblierten Peptid-Nanofibrillen aus selbst-organisierenden Amyloid-Peptiden zu funktionalisieren. Peptid-Nanofibrillen (PNFs) gelten aufgrund ihrer Fähigkeit, Viruspartikel effizient zu binden und ihre Anlagerung an die Membran von Zielzellen zu fördern, als neuartige und hocheffiziente Klasse retroviraler Transduktionsverstärker. In diesem Projekt nutzten wir die virusbindenden Eigenschaften von PNFs mit verstärkendem Faktor C (EF-C), um eine Methode zur Konzentration und Isolierung von HIV-Partikeln zu entwickeln. Unser Ansatz bietet ein Werkzeug zum effizienten Einfangen, Isolieren und Konzentrieren von Viruspartikeln. Dies kann die Empfindlichkeit bestehender Diagnosetools und Analysetests in der Zukunft erheblich verbessern.

## Inhalt

1. Zielerreichung und Umsetzung der Meilensteine.....	3
2. Aktivitäten und Hindernisse .....	4
3. Ergebnisse und Erfolge.....	5
4. Chancengleichheit und Internationalisierung .....	6
5. Strukturen und Kooperationen .....	6
6. Qualitätssicherung .....	7
7. Zusätzliche eigene Ressourcen .....	7
8. Ausblick .....	7

## 1. Zielerreichung und Umsetzung der Meilensteine

Das Hauptziel des **Arbeitspaketes 1** war die Immobilisierung von P450 Enzymen an Oberflächen mittels flexibler und variabler Linker ohne Aktivitätsverlust. Ziel war es, die Enzymaktivität an der Oberfläche direkt steuern zu können. Dazu müssen die benötigten Reduktionsäquivalente für die Reaktion, die sonst über NADPH bei P450-Enzymen bereitgestellt werden, mithilfe der direkten Elektronenübertragung von einer Elektrode generiert werden. Dieser Prozess der Bioelektrokatalyse lässt sich mithilfe von Potentiostaten umsetzen, so dass Enzyme an- und abgeschaltet werden können. Hierfür wurde eine 96-Multipotentiostatstation gekoppelt an ein 96-Mikrotiterplatten basiertes Multi-3-Elektroden-Setup entwickelt, mit dem immobilisierte P450 Enzyme bioelektrokatalytisch auf verschiedenen Elektrodenmaterialien untersucht werden können. Durch den hohen Grad der Parallelisierung können gleichzeitig mehrere Experimentierparameter abgedeckt werden.

Für einen effizienten Elektroden-Enzym-Kontakt wurden optimierte Enzym-Varianten generiert, die mittels eines rekombinant eingeführten Oberflächenlinkerpeptids gezielt an das transparente Metalloxid Indiumzinnoxid immobilisiert werden können. Durch die Verwendung eines transparenten Elektrodenmaterials konnten auch flexible Linker zwischen Elektrode und Enzym eingesetzt werden, die beispielsweise photokatalytisch ihre Konformation und Struktur ändern. Mittels der entwickelten Messstation wurden Redox-Cofaktor optimierte Enzym-Varianten gefunden bei denen der Elektronentransfer von Elektrode zu Enzym über die intrinsischen Flavin-Cofaktoren verstärkt wurde. Sowohl der Aufbau der Messstation als auch die Ergebnisse zu der Flavin-Cofaktor-Abhängigkeit konnten publiziert werden. In einer Kooperation mit der Gruppe Harnisch vom UFZ Leipzig konnten darüber hinaus mit einer angepassten Front-End-Architektur und dem von uns entwickelten Multi-Potentiostaten eine mikrobielle Bioelektrokatalyse in einem 96-DeepWell Mikrotiterplattenmaßstab demonstriert werden. Im **Arbeitspaket 2** sollten Fibrillen an magnetische Beads gebunden und optimiert werden. In diesen Arbeiten wurden Peptid-Nanofibrillen (PNFs) auf Magnetkügelchen (MBs) immobilisiert und zum erfolgreichen Einfangen, Isolieren und Konzentrieren von HIV-1-Virionen aus virushaltigen Proben verwendet, wodurch Lösungen mit erheblich reduzierter Infektiosität erzeugt wurden. Die pelletierten Virionen waren hochkonzentriert und behielten ihre Infektiosität. Das jüngste Auftreten und die Ausbrüche bisher nicht erkannter Viren sowie das Wiederauftreten bekannter Viren haben den Bedarf an schnellen und empfindlichen Erkennungs- und Entfernungstools für Viren erhöht. Unser Ansatz hat sich unter Bedingungen, die für eine maximale Einfangeffizienz erforderlich sind, als sicher erwiesen und kann problemlos zur Isolierung und Pelletierung von HIV-1-Virionen angewendet werden, indem MBs mit virushaltigen Proben inkubiert und anschließend ein Magnetfeld angelegt wird. Als Ergebnis haben wir Lösungen von Viruspartikeln angereichert und sie weniger infektiös gemacht, wobei die Einfangeffizienz zwischen 70 und 95 % in 10 % (v/v) menschlichem Serum lag. In zukünftigen Arbeiten könnte unser Ansatz um Strategien zur Erhöhung der Menge an biotinylierten, funktionellen EF-C-PNFs auf der Oberfläche der MBs erweitert werden, um die Einfangeffizienz weiter zu erhöhen. Dadurch wird die Gesamtmenge an MBs, die für Isolationsexperimente benötigt werden, erheblich reduziert, was das Kosten-Nutzen-Verhältnis verbessert und gleichzeitig Sicherheitsbedenken verringert. Unser Ansatz kann auch auf andere Viren sowie auf die Isolierung aus anderen Körperflüssigkeiten ausgeweitet werden. In den Arbeitspaketen **3 und 4 (Theorie)** hat die AG Risselada schöne Ergebnisse zu Membranwechselwirkungen veröffentlicht. Ein Hauptergebnis der Arbeiten aus der AG Grubmüller ist eine Serie von Rechnungen für das in der AG Grubmüller entwickelte Kraftfeld Charmm36m für ungeordnete Polypeptide an P53 und deren Vergleich mit NMR-Daten (unpubliziert; Posterbeitrag Biophysics Congress, San Diego, 2020). Diese Rechnungen validierten die Simulationen, welche für das P450-Linker-System benötigt wurden. Zweites Hauptergebnis war die Fertigstellung, Implementierung und der Test von Methoden zur Simulation von Charge-Transfer "on the fly" mit Hilfe von Titrationssimulation und NMR-Messungen an Pentapeptiden.

Die wesentliche Fragestellung des **Arbeitspaketes 5** beinhaltet die Art der Konformation und Orientierung der betrachteten Enzyme auf der Elektrodenoberfläche in Abhängigkeit des Linkerpeptids, des Elektrodenmaterials sowie dessen morphologischer Struktur. Von zentraler Bedeutung war dabei die Ausrichtung des Cytochrom-P450-BM3-Moleküls zur Elektrode. In

optimaler Orientierung wird der Elektroden-Redoxcofaktor-Abstand minimiert, um eine hohe Elektronentransfergeschwindigkeit und damit hohe Enzymaktivität zu erzielen. Die Analyse der Orientierung konnte mittels MIET-Messungen in der Gruppe Enderlein (Universität Göttingen) erfolgen. Hierfür wurde zunächst in einem gemeinsamen Experiment versucht, die intrinsischen Fluorophore von Cytochrom P450 BM3 zu benutzen. Aufgrund geringer Quantenausbeute und Fluorophor-Stabilität und damit geringer Aussagekraft der Messungen wurden jedoch neue Enzym-Varianten entworfen und generiert, die extrinsische Fluorophore besitzen oder binden können (Abwandlungen des grünfluoreszierenden Protein GFP). Die Messungen dieser neuen Varianten mit und ohne oberflächenbindendem Linkerpeptid konnte so an ITO-Dünnschichten durchgeführt werden. Für eine exakte Auswertung der Daten war die Kooperation mit dem IOM essentiell, in der die ITO-Schichten ellipsometrisch charakterisiert wurden, um MIET-relevante Materialkonstanten zu gewinnen. Weiterhin wurden weitere Elektrodenmaterialien auf ihre Eignung für die Bioelektrokatalyse getestet, darunter Titan, Titannitrid und Zinkoxid. Das bisher genutzte Indiumzinnoxid erwies sich jedoch als das besten geeignete Elektrodenmaterial bisher für eine hohe Aktivität. Zudem bietet es aufgrund der Transparenz klare Vorteile für multiparametrische Messungen, näher ausgeführt in Arbeitspaket 6. Das **Arbeitspaket 6** hatte den Aufbau eines mikrofluidischen Sensorsystems zum Ziel. Ein Kernpunkt war dabei die Quantifizierung der enzymatischen Aktivität in einem kontinuierlichen Durchflusssystem. Im Rahmen von Arbeitspaket 6 konnte zunächst ein Echtzeit-Monitoring in Form einer optoelektronischen Messplattform entwickelt werden, um die Enzymaktivität von Cytochrom P450 BM3 zeitabhängig untersuchen und steuern zu können. Im Gegensatz zur Endpunkts-Bestimmung der in Arbeitspaket 1 dargestellten 96-Well elektrochemischen Mikrotiterplatte, konnte nun kontinuierlich während der elektrochemischen Steuerung die Enzymaktivität bestimmt werden. Dies ist die zentrale Voraussetzung um im mikrofluidischen Ansatz, d.h. im miniaturisierten kontinuierlichen Durchflusssystem die Enzym-Aktivität quantifizieren zu können. Hierfür wurde zunächst die P450-BM3-Struktur durch gezielte Punktmutationen modifiziert, um die Substratspezifität von 7-Ethoxycumarin zu Benzyloxyresorufin zu verschieben. Dadurch wurde es möglich statt einer Endpunkt-Aktivitätsbestimmung eine sensitive fluorometrische Echtzeit-Bestimmung zu etablieren. Parallel dazu wurde eine Miniaturisierung und Neukonzeption des 96-Well-Mikrotiterplatten-basierten bioelektrokatalytischen Screening-Systems durchgeführt, um eine direkte Integration in einen Fluoreszenz-Platten-Reader zu ermöglichen. Dafür wurden 3D-gedruckte Mikrotiterplatten entwickelt und passende Elektrodenarrays konzipiert. Die resultierende Messplattform wurde genutzt um Cytochrom P450-Enzyme hinsichtlich ihrer kinetischen Stabilität, u.a. auch in Präsenz organischer Lösungsmittel und  $H_2O_2$  Scavenger Enzyme zu untersuchen. Im nächsten Schritt wurde ein mikrofluidischer Chip entwickelt, in dem Bioelektrokatalyse zusammen mit einem Kontrollchip elektrochemisch und optisch verfolgt werden können. Der Chip basierte auf strukturierte Glassubstraten unter Verwendung von Indiumzinnoxid-Reaktionsfeldern und Platin-Gegen- und Referenzelektroden in einem PEDGA-Verbund. Enzym-Aktivität konnte sowohl unter statischen als auch Durchfluss-Bedingungen realisiert werden. Das Proof-of-Principle markiert die nächste Stufe der technologischen Entwicklung und erlaubt die Einbettung in miniaturisierte Enzym-Kaskaden-Reaktoren.

## 2. Aktivitäten und Hindernisse

Die Arbeiten und Aktivitäten der Projektpartner im Berichtszeitraum waren vorbildlich. Verzögerungen wegen einer Patentanmeldung, der Wegberufung von Frau Prof. A. Robitzki an das KIT und Verzögerungen wegen der Corona-Pandemie haben dazu geführt, dass das Projekt mehrere Male kostenneutral verlängert wurde.

In Zusammenarbeit mit Dr. Bundesmann (IOM, Gruppe Abel) wurden Ellipsometrie-Messungen an Indiumzinnoxid-Dünnschichten durchgeführt. Neben der Bestimmung von Refraktionskennzahlen, die bei der Zusammenarbeit mit der Gruppe Enderlein (Göttingen) entscheidend sind, wurden auch Enzym-Beschichtungen der Oberfläche untersucht. Die Auswertung der gesammelten Daten wurde am IOM abgeschlossen und über die Gruppe Robitzki die Ergebnisse an die Gruppe Enderlein übermittelt. Die Gruppe Enderlein konnte damit die durchgeführten MIET-Messungen präzisieren.

In Zusammenarbeit mit Dr. Griebel (IOM, Gruppe Abel) wurde Cytochrom-P450-BM3 Probenmaterial zur Verfügung gestellt um im Rahmen von geplanten Elektronenspinresonanz-Messungen (EPR) Übergangszustände im Häm-Komplex von Cytochrom P450 BM3 zu untersuchen. Bisher war es jedoch zur Generierung von validen Daten schwierig, die benötigte hohe Spindichte zu erzeugen, speziell in Hinblick von immobilisierten Enzymeinheiten.

In Zusammenarbeit mit Dr. Isbaner (Universität Göttingen, Gruppe Enderlein) wurden in einem gemeinsam durchgeführten Experiment erstmals Metal-Induced-Energy-Transfer (MIET) – Messungen an Cytochrom-P450-BM3-Proben auf Indiumzinnoxid-Oberflächen durchgeführt. Aufbauend auf initialen Versuchen wurden neue Enzym-Varianten molekularbiologisch generiert, um stärkere Fluorophore für die Messungen zu integrieren und die Aussagekraft der MIET-Experimente zu steigern. Die Versuche konnten erfolgreich abgeschlossen werden. Die experimentellen Vorhersagen konnten bestätigt werden, dass eine Orientierung durch die Oberflächenbindenden Peptide induziert wird. Es erscheint jedoch erstrebenswert die Genauigkeit der Messmethode weiter zu steigern, um die gewonnenen Erkenntnisse abzusichern.

In Zusammenarbeit mit M.Sc. Jan Dirks (Universität Leipzig, Gruppe Beck-Sickinger) fanden gemeinsame Treffen zur Planung und Umsetzung aussichtsreicher flexibler und schaltbarer Linker für den Elektroden-Enzym-Kontakt statt. Ein Kernpunkt sollte die Möglichkeit der Abspaltung des Enzyms von der Elektrode zum Zwecke der Oberflächenregeneration aufgrund der endlichen Lebenszeit von P450 Enzymen sein. Die Testung sah die Verwendung der etablierten 96-Well optoelektronischen Messplattform vor (Arbeitspaket 6).

In einer außerordentlichen Zusammenarbeit mit der Gruppe Harnisch vom Leipziger Umweltforschungszentrum gelang die Entwicklung einer 96-DeepWell bioelektrokatalytischen Messstation für die mikrobielle Bioelektrokatalyse unter anaeroben Bedingungen. Diese kann zur elektrischen Verwertung von Flüssigabfällen im Sinne einer Fuel Cell als auch zur Synthese von Feinchemikalien im Sinne mikrobieller Fabriken eingesetzt werden. Ausschlaggebend für diese Entwicklung war der in der Gruppe Robitzki entwickelte 96-Multikanal-Potentiostat, der diese Anschlussverwertung ermöglichte.

In der Zusammenarbeit des Konsortiums war es möglich, die molekularen Prozesse mittels Theorie zu verstehen und die Ergebnisse aus der Grundlagenforschung letztendlich in verschiedene Anwendungen zu bringen. Im Projekt hat sich die theoretische Beschreibung als die erwartete sehr große Herausforderung herausgestellt. Insgesamt konnte eine erhebliche Anzahl von hochkarätigen Veröffentlichungen publiziert oder auf den Weg gebracht werden. Da jedoch immer noch nicht alle Ergebnisse publiziert sind, haben wir die wesentlichen (noch nicht publizierten) Ergebnisse mit in den Bericht aufgenommen, der damit etwas länger als üblich geworden ist.

### 3. Ergebnisse und Erfolge

Im Rahmen des Projektes konnten folgende Publikationen in Peer-Review Journalen veröffentlicht werden:

1. John, T.; Martin, L. L.; **Abel, B.**, Peptide Self-Assembly into Amyloid Fibrils at Hard and Soft Interfaces-From Corona Formation to Membrane Activity. *Macromolecular Bioscience* **2023**, *23*, 2200576.
2. John, T.; Bandak, J.; Sarveson, N.; Hackl, C.; **Risselada, H. J.**; Prager, A.; Elsner, C.; **Abel, B.**, Growth, Polymorphism, and Spatially Controlled Surface Immobilization of Biotinylated Variants of IAPP(21-27) Fibrils. *Biomacromolecules* **2020**, *21* (2), 783-792.
3. Zernia, S.; Frank, R.; Weisse, R. H. J.; Jahnke, H. G.; Bellmann-Sickert, K.; Prager, A.; **Abel, B.**; Strater, N.; **Robitzki, A.**; Beck-Sickinger, A. G., Surface-Binding Peptide Facilitates Electricity-Driven NADPH-Free Cytochrome P450 Catalysis. *Chem Cat Chem* **2018**, *10* (3), 525-530.
4. Garmasukis, R.; Hackl, C.; Dusny, C.; Elsner, C.; Charvat, A.; Schmid, A.; **Abel, B.**, Cryo-printed microfluidics enable rapid prototyping for optical-cell analysis. *Microfluidics and Nanofluidics* **2023**, *27*, 5.
5. Garmasukis, R.; Hackl, C.; Charvat, A.; Mayr, S. G.; **Abel, B.**, Rapid prototyping of microfluidic chips enabling controlled biotechnology applications in microspace. *Current Opinion in Biotechnology* **2023**, *81*, 102948.
6. Frank, R.; Prönnecke, C.; Azendorf, R.; Jahnke, H.-G.; **Beck-Sickinger, A. G.**; **Robitzki, A. A.**, Advanced 96-microtiter plate based bioelectrochemical platform reveals molecular short cut of electron flow in cytochrome P450 enzyme. *Lab on a Chip* **2020**, *20* (8), 1449-1460.
7. Frank, R.; Ramos, J. V.; Azendorf, R.; Prönnecke, C.; Schmidt, S.; Jahnke, H.-G.; **Robitzki, A. A.**, Real-time 96-well optoelectronic micro plate for kinetic and stability investigation of cytochrome P450 BM3. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2022**, *361*, 131752.

8. Kuchenbuch, A.; Frank, R.; Ramos, J. V.; **Jahnke, H.-G.**; Harnisch, F., Electrochemical Microwell Plate to Study Electroactive Microorganisms in Parallel and Real-Time. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* **2022**, *9*.

9. Stroh, K. S.; **Risselada, H. J.**, Quantifying Membrane Curvature Sensing of Peripheral Proteins by Simulated Buckling and Umbrella Sampling. *Journal of Chemical Theory and Computation* **2021**, *17* (8), 5276-5286.

## Chancengleichheit und Internationalisierung

Die AG Abel rekrutiert international mit Hilfe standardisierter Video-Interviews. Die Arbeitsgruppe ist international besetzt (ca. 1/3 der MitarbeiterInnen und Studierenden aus Europa (ohne D) und nicht-EU-Ländern). Der Anteil weiblicher Mitarbeiterinnen von ca. 17% soll kontinuierlich ausgebaut werden. Insgesamt rekrutiert die AG Abel allgemein zunächst ohne Beachtung von Geschlecht, Nationalität, Religion etc.. Gleiches gilt für die AGs Beck-Sickinger, Risselada und Robitzki/Jahnke. Die AG Enderlein ist überdurchschnittlich international besetzt (4x Deutschland, 2x Russland, 2x Ukraine, 1x Israel, 3x Indien, 1x Südkorea, 1x China). Zwei Mitarbeiterinnen sind Frauen, (permanente Mitarbeiterin Dr. Anna Chizhik, Doktorandin Akshita Sharma) und die AG bemüht sich kontinuierlich, ihren Frauenanteil zu erhöhen. In der AG Münch sind 12 von 16 Mitarbeiter weiblich. Aus dem Projekt finanziert wurden Frau Desiree Schütz (Doktorandin) und Frau Lena Rauch (Masterandin). Die AG Grubmüller rekrutiert international und ohne Beachtung von Geschlecht, Nationalität, Religion etc mit Hilfe standardisierter Vorauswahl-Tests und standardisierter Video-Interviews. Die Zusammensetzung der Gruppe (wissenschaftliche Mitglieder) war in den letzten Jahren Deutsch (11), Europäisches Ausland 7), Russland (1), USA (1), China (1), davon 4 Frauen. Die AG bemüht sich kontinuierlich, ihren Frauenanteil zu erhöhen.

Gleichstellung, Gleichbehandlung und Chancengleichheit zur beruflichen Qualifikation sind im MINT-Bereich für die weibliche Mitarbeiterin und den männlichen Mitarbeiter sowie nationale und internationale Mitarbeiter/innen gewährleistet und haben absolut hohe Priorität. Verbindliche Basis dazu ist das Gleichstellungs- und Qualifizierungskonzept der Universität Leipzig.

## 4. Strukturen und Kooperationen

**Gruppen Abel, Enderlein und Robitzki/Jahnke:** Im Rahmen des Projektes wurden zwischen der Arbeitsgruppe Robitzki und der AG Abel und folgenden Sektionen des IOMs technikbezogene und wissenschaftliche Kooperationen aufgebaut: Im Rahmen des Projektes wurden zwischen der Gruppe Robitzki und folgenden Sektionen des IOMs Technik-bezogene und wissenschaftliche Kooperationen aufgebaut: Gruppe um Dr. Scherzer für *Instrumentelle Analytik und Prozesskontrolle* mit dem Vernetzungspunkt IR-Spektroskopie und Mikrofluidik, Gruppe um Dr. Bundesmann für *Ionenquellenentwicklung und Anwendungen / Abteilung Präzisionsoberflächen* mit dem Vernetzungspunkt Ellipsometrie und Halbleiter-Charakterisierung, Gruppe um Dr. Griebel für *Materialcharakterisierung und Analytik* mit dem Vernetzungspunkt Elektronenspinresonanz (EPR). Darüber hinaus wurde ein Vertrag mit dem Status eines Gastwissenschaftler am IOM für Dr. Ronny Frank geschlossen, um direkte Vor-Ort-Arbeit zu ermöglichen. Zur Synchronisierung und Informationsaustausch im Bereich Arbeitsfortschritt fanden mit dem stellvertretenden Direktors des IOMs, namentlich Bernd Abel, monatliche Treffen statt. Mit der Gruppe um Prof. Dr. Jörg Enderlein wurde eine Kooperation im Bereich MIET-Messungen auf Indiumzinnoxid (ITO)-Oberflächen aufgebaut. Hierfür wurden ITO beschichtete Deckgläschen sowie Cytochrom P450 Enzymproben seitens der Arbeitsgruppe Robitzki zur Verfügung gestellt. In Verbindung mit dem IOM wurden zudem die ITO-Schichten als Voraussetzung für die MIET-Messungen hinsichtlich ihrer optischen Brechungseigenschaften über Ellipsometrie charakterisiert. Die übergebenen Enzymproben wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Enderlein auf ihr Fluoreszenzverhalten und direkte Eignung für MIET-Messungen analysiert. Die Enzymproben umfassten dabei Varianten, in denen gezielt Fluorophor-Änderungen eingeführt wurden, um zwischen den Beiträgen der einzelnen Enzym-Cofaktoren zu differenzieren. Es folgten gemeinsame MIET-Experimente seitens Dr. Sebastian Isbaner (Gruppe Enderlein) und Dr. Ronny Frank (Gruppe Robitzki) vor Ort in Göttingen (am 7.11.19). Darauf aufbauend wurden neue Enzym-Varianten mit daran gekoppelten Fluorophoren entwickelt, um die Signalstärke für die MIET-Messungen zu

verbessern. Die genetische Information für den proteinbasierten Fluorophor mScarlet wurde seitens der Gruppe Enderlein bereitgestellt. Kloniert und exprimiert wurden die neuen Enzym-Konstrukturen in der Gruppe Robitzki und wurden anschließend an die Gruppe Enderlein übergeben, die damit MIET-Experimente durchführen konnte. Bedingt durch Corona-Kontakteinschränkungen konnten einige Experimente nicht in Präsenz von Dr. Ronny Frank in Göttingen durchgeführt werden. **AG Abel, AG Risselada, AG Grubmüller, AG Münch:** intensive Kooperationen mit zahlreichen Projekt-Meetings in Leipzig, Göttingen und Ulm. **Abel/Beck-Sickinger/Münch:** intensiver Probenaustausch und Austausch von Mitarbeitern zwischen den Arbeitsgruppen Abel, Beck-Sickinger und Münch. Zusätzliche Kooperationen aufgebaut mit der Prof. Dr. Tanja Weil (MPI Mainz) und Durchführung einer SAR Studie zu EF-C sowie Prof. Dr. Marcus Fändrich (Institut für Proteinchemie, Universität Ulm) zur Erstellung der Kryo-EM Struktur einer optimierten Peptidnanofibrille. Zusätzliche Kooperation mit der AG Griesinger (MPI bpc, Göttingen), Gerrit Groenhof (Univ. Jyväskylä, Finland), und Sarah Rauscher (Univ. Toronto, Canada).

## 5. Qualitätssicherung

Alle im Zusammenhang mit den Projekten aller PIs erzielten Ergebnisse wurden in international renommierten begutachteten Journalen veröffentlicht, und alle damit im Zusammenhang stehenden Daten und Programme wurden interessierten Wissenschaftlern umfassend zur Verfügung gestellt. Wenn möglich und Finanzierung gesichert war, wurden Open-Access-Lösungen angestrebt. Alle damit im Zusammenhang stehenden Daten und Computerprogramme wurden innerhalb der Wissenschaftsgemeinschaft uneingeschränkt zur Verfügung gestellt. Alle Mitarbeiter/innen der Arbeitsgruppen aller beteiligter PIs folgen den Regeln guter Wissenschaftlicher Praxis. Alle Ergebnisse werden durch tägliche Backups aller Computerfestplatten gesichert. Es wurden keine Tierversuche durchgeführt.

## 6. Zusätzliche eigene Ressourcen

AGs Abel, Robitzki, Risselada, Münch: Alle Projekt-spezifischen Arbeiten wurden durch den im Projekt angestellten Mitarbeiter bzw. Mitarbeiterinnen durchgeführt. Mit dem Ausscheiden des PostDocs (Sebastian Isbaner) Ende Mai 2020 wurden alle weiteren Arbeiten in der AG Enderlein als „In-Kind“-Leistungen durchgeführt, da alle im Projekt für die AG zur Verfügung stehenden Personal- und Sachmittel aufgebraucht waren. Mit dem Auslaufen der Projektteilfinanzierung in 2019 wurden ebenfalls alle Arbeiten in der AG Grubmüller als „In-Kind“-Leistungen durchgeführt. Dies beinhaltete Personalmittel für die am Projekt beteiligten Wissenschaftler (Dr. Plamen Dobrev, Dr. Reinhard Klement), wie auch die durch die Abteilung Grubmüller zur Verfügung gestellte Rechenleistung auf dem Abteilungs-internen Linux/GPU-Hochleistungscluster. AG Beck-Sickinger: In der AG wurden Ressourcen im Umfang von ca. 3 PM zusätzlich zur Verfügung gestellt. Die AGs Grubmüller und Enderlein weisen keine eigenen Zusatzmittel aus.

## 7. Ausblick

Die übergeordneten und ehrgeizigen Projektziele des Konsortiums waren es, zwei neue und **innovative Konzepte für biofunktionalisierte Oberflächen** zu entwickeln und optimieren sowie diese für **Anwendungen in der Biotechnologie und der medizinischen Diagnostik** einzusetzen. In einer engen Zusammenarbeit von Experiment und Theorie war es möglich, die molekularen Prozesse mittels Theorie zu verstehen und die Ergebnisse aus der Grundlagenforschung in verschiedene Anwendungen in den Bereichen Biotechnologie und Virologie, insbesondere im Bereich Viren-Diagnostik zu bringen. Es wurde einerseits ein **Echtzeit-Monitoring-System** aufgebaut, das die Basis bildet, um auch im mikrofluidischen Maßstab die bioelektrokatalytische Aktivität quantifizieren zu können. Damit kann die entwickelte Technik ein Sprungbrett für die Untersuchung von Redoxenzymen mit elektrochemischer und optischer Kontrolle werden, wodurch Stabilitätsuntersuchungen möglich und Enzymaktivität nachverfolgbar steuerbar wird. Schließlich haben die Arbeiten auch zu einer Methode und Technologie geführt, die eine **Technik zum effizienten Einfangen, Isolieren und Konzentrieren von Viruspartikeln** bietet. Dies kann die Empfindlichkeit bestehender Diagnostiktools und Analysetests in der Zukunft erheblich verbessern.

## Anhang 1: Erfolgskontrollbericht Projekt K76/2017

Im Projekt K76/2017 („*Controlling and Switching of Function of Peptide and Protein based BioSurfaces: From Fundamentals to Applications*“) sollten zwei neue und innovative Hightech-Konzepte für biofunktionalisierte Oberflächen entwickelt sowie diese für Anwendungen in der Biotechnologie und der medizinischen Diagnostik optimiert werden. Die Arbeiten und Aktivitäten der Projektpartner im Berichtszeitraum waren vorbildlich. Verzögerungen wegen einer Patentanmeldung, der Wegberufung von Frau Prof. A. Robitzki an das KIT und wegen der Corona-Pandemie haben dazu geführt, dass das Projekt mehrere Male kostenneutral verlängert wurde. Das Projekt war in 2 größere Berichte aufgeteilt und wurde in 6 Arbeitspaketen bearbeitet (Details dazu sind im Abschlussbericht detailliert dargestellt).

Das erste große Ziel des Vorhabens war die Immobilisierung und damit die Verankerung von großen funktionalen Enzymen mittels Ankerpeptiden auf leitfähigen bzw. halbleitenden Oberflächen, die durch Stromfluss an den Elektroden geladen bzw. „betrieben“ und regeneriert werden können. Eine Herausforderung im Bereich dieser biofunktionalisierten Oberflächen war die Analyse der Struktur und die Steuerung des immobilisierten biologischen Materials. Innerhalb des Projekts wurde dies am Cytochrom-P450-BM3 Enzyms untersucht, das innerhalb seiner Enzymfamilie über die höchste Aktivität für die Sauerstoff-abhängige Hydroxylierung von Fettsäuren verfügt und im Bereich der Wirkstoffentwicklung gefragt ist. Um potentiell industriell eingesetzt zu werden, musste der an der Reaktion beteiligte teure und instabile Redoxcofaktor NADPH ersetzt werden. Hierfür haben die Arbeiten im Projekt eindrucksvoll gezeigt, dass dies mittels Bioelektrokatalyse, d.h. des Transfers von Elektronen von einer Elektrode direkt ins Enzym durchführbar ist. Es wurde schließlich ein Echtzeit-Monitoring-System aufgebaut, das die Basis bildet, um auch im mikrofluidischen Maßstab die bioelektrokatalytische Aktivität quantifizieren zu können. Damit kann die entwickelte Technik ein Sprungbrett für die Untersuchung von Redoxenzymen mit elektrochemischer und optischer Kontrolle werden, wodurch Stabilitätsuntersuchungen möglich und Enzymaktivität nachverfolgbar steuerbar wird.

Das zweite große Ziel war es, magnetische Mikro- und Nanopartikel mit selbst-assemblierten Peptid-Nanofibrillen aus selbst-organisierenden Amyloid-Peptiden zu funktionalisieren. Peptid-Nanofibrillen (PNFs) gelten aufgrund ihrer Fähigkeit, Viruspartikel effizient zu binden und ihre Anlagerung an die Membran von Zielzellen zu fördern, als neuartige und hocheffiziente Klasse retroviraler Transduktionsverstärker. In diesem Projekt nutzen wir die virusbindenden Eigenschaften von PNFs mit verstärkendem Faktor C (EF-C), um eine Methode zur Konzentration und Isolierung von HIV-Partikeln zu entwickeln. Bei der Inkubation in einer virusbeladenen Probe erleichtern diese PNF-beschichteten Perlen die magnetische Trennung, wodurch die Viruspartikel effektiv aus der Lösung entfernt und somit deren Infektiosität verringert wird. Bemerkenswerterweise behalten die isolierten Viruspartikel ihre Infektiosität bei und weisen aufgrund der Komplexbildung mit EF-C-PNFs eine erhöhte Infektionsfähigkeit auf. Diese Verbesserung ist von entscheidender Bedeutung für die weitere Vermehrung in Zellkulturen oder eine detaillierte Analyse. Angesichts der zunehmenden Bedrohung durch neu auftretende Viren und des Wiederauflebens von Krankheitserregern geht unsere Methode auf den dringenden Bedarf an schnelleren, empfindlicheren Nachweis- und Reinigungstechnologien für Viruserreger ein. Mit dem Auftauchen bisher nicht erkannter Viren und dem Wiederauftreten bekannter Viren, besteht ein hoher Bedarf an einer schnellen und empfindlicheren Erkennung und Entfernung Tools für Viren. Unser Ansatz bietet ein Werkzeug zum effizienten Einfangen, Isolieren und Konzentrieren von Viruspartikeln. Dies kann die Empfindlichkeit bestehender Diagnosetools und Analysetests erheblich verbessern. In der Zusammenarbeit des Konsortiums war es möglich, die molekularen Prozesse mittels Theorie zu verstehen und die Ergebnisse aus der Grundlagenforschung letztendlich in verschiedene Anwendungen zu bringen. Im Projekt hat sich die theoretische Beschreibung als die erwartete sehr große Herausforderung herausgestellt.

Insgesamt konnte eine erhebliche Anzahl von hochkarätigen Veröffentlichungen publiziert oder auf den Weg gebracht werden.