



FAKULTÄT FÜR CHEMIE

Fachgebiet Proteinchemie

Die enzymatische Phosphocholinierung als neue Proteinmarkierungsmethode

Katharina Ursula Heller

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Tobias A. M. Gulder

Prüfer der Dissertation:

1. Prof. Dr. Aymelt Itzen

2. Prof. Dr. Matthias Feige

Die Dissertation wurde am 17.12.2015 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 10.02.2016 angenommen.

Im Dezember 2015 vorgelegt von

Katharina Ursula Heller

aus Bochum

geboren am 03.03.1987

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von April 2012 bis November 2015 an der Fakultät für Chemie der Technischen Universität München unter der Anleitung von Prof. Dr. Aymelt Itzen durchgeführt.

Im Rahmen dieser Arbeit ist folgende Veröffentlichung erschienen:

Heller, K., Ochtrop, P., Albers, M. F., Zauner, F. B., Itzen, A. and Hedberg, C. (2015). "Covalent Protein Labeling by Enzymatic Phosphocholination." Angew Chem Int Ed Engl **54**(35): 10327-10330.

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	V
ZUSAMMENFASSUNG	1
1. EINLEITUNG	3
1.1 Rekombinante Markierungsmethoden	4
1.2 Bioorthogonale chemische Markierungsmethoden	7
1.2.1 Huisgen Azid-Alkin-Cycloaddition	8
1.2.2 Staudinger Ligation.....	9
1.2.3 Diels-Alder Cycloaddition.....	11
1.3 Selbstmarkierende Protein-/Peptidfusionen	12
1.3.1 Peptidbasiert: FIAsh-Tag.....	13
1.3.2 Proteinbasiert: Dihydrofolatreduktase und Trimethoprim	14
1.3.3 Proteinbasiert: SNAP-Tag/ CLIP-Tag.....	15
1.3.4 Proteinbasiert: Halo-Tag.....	16
1.4 Biosynthetische Markierungsmethoden: <i>Amber Codon Suppression</i>	17
1.5 Enzymatische Markierungsmethoden	19
1.5.1 Ppant-Transferase	19
1.5.2 Sortase	21
1.5.3 Biotinligase.....	23
1.6 Eine neue enzymatische Markierungsmethode	25
1.7 Die Enzyme AnkX und Lem3 aus <i>Legionella pneumophila</i>	29
1.7.1 Die Phosphocholinierung.....	30
1.7.2 Eigenschaften von AnkX.....	32
1.7.3 Eigenschaften von Lem3	36
2. ZIELSETZUNG	37
3. ERGEBNISSE	39
3.1 Optimierung der Enzyme AnkX und Lem3	39
3.2 Optimierung des Erkennungsmotivs.....	46
3.3 Erzeugung und Untersuchung von künstlichen AnkX-Substraten	51

3.3.1	Modellproteine mit N- oder C-terminalem Erkennungspeptid (SUMO, MBP, DrrA).....	52
3.3.2	Modellproteine mit mutiertem Erkennungspeptid.....	55
3.3.3	Modellproteine mit inseriertem Erkennungspeptid (DrrA)	57
3.3.4	Demodifizierung der Modellproteine durch Lem3.....	60
3.4	Evaluierung von CDP-Cholin-Derivaten	61
3.4.1	Evaluierung nicht-fluoreszenter CDP-Cholin-Derivate	61
3.4.2	Evaluierung fluoreszenter CDP-Cholin-Derivate	63
3.5	Anwendung der Markierungsmethode <i>in vivo</i>	71
4.	DISKUSSION	77
4.1	Optimierung der Enzyme	77
4.2	Optimierung der Peptidsequenz	82
4.3	Modellproteine	84
4.4	CDP-Cholin-Derivate	87
4.5	<i>In vivo</i> Markierung.....	89
4.6	Bewertung der neuen Markierungsmethode und Vergleich mit anderen Methoden	90
5.	AUSBLICK	95
6.	MATERIAL UND METHODEN	99
6.1	Material.....	99
6.2	Methoden	110
6.2.1	Molekularbiologische Methoden	110
6.2.2	Analytische Methoden	114
6.2.3	Biochemische Methoden.....	119
6.2.4	Biophysikalische Methoden	123
6.2.5	Zellbiologische Methoden	125
7.	LITERATURVERZEICHNIS	127
8.	ANHANG	141
	DANKSAGUNG	153
	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	155

Abkürzungsverzeichnis

A (mA)	Ampère (Milliampère)
Å	Angström
ACN	Acetonitril
ACP	Acylträgerprotein (<i>engl.: acyl carrier protein</i>)
ACPH	ACP-Hydrolase
AMP	Adenosin-5'-monophosphat
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ARHD	<i>Ankyrin Repeat Homology</i> Domäne
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
ATPase	Adenosin-5'-triphosphatase
BCCP	Biotin-Carboxyl-Trägerprotein (<i>engl.: biotin carboxyl carrier protein</i>)
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
bp	Basenpaar(e)
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
cAMP	Zyklisches AMP (<i>engl.: cyclic AMP</i>)
CDP	Cytidin-5'-diphosphat
CFP	Blau fluoreszierendes Protein (<i>engl.: cyan fluorescent protein</i>)
CMP	Cytidin-5'-monophosphat
CoA	Coenzym A
C-Terminus	Carboxy-Terminus
Da	Dalton
ddH ₂ O	Bidestilliertes Wasser
DHFR	Dihydrofolatreduktase
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagles Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxyribonucleosidtriphosphat
DPF	Dortmund Protein Facility
DTE	Dithioerythritol
d.h.	das heißt
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	N,N,N',N'-Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-Tetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Reticulum
ESI-MS	Elektrospray-Ionisationsmassenspektrometrie
et al.	und andere (<i>lat.: et alii</i>)

etc.	und so weiter (<i>lat.: et cetera</i>)
FBS	Fötales Rinderserum (<i>engl.: fetal bovine serum</i>)
FIC	Filamentation induziert durch cAMP (<i>engl.: filamentation induced by</i>
FIAsH	<i>Fluorescein Arsenical Helix Binder</i>
FP	Fluoreszierendes Protein
GAP	GTPase aktivierendes Protein (<i>engl.: GTPase activating protein</i>)
GDI	GDP-Dissoziationsinhibitor (<i>engl.: GDP-dissociation inhibitor</i>)
GEF	Guaninnukleotid-Austauschfaktor (<i>engl.: guanine nucleotide exchange factor</i>)
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GlcNAc	N-Acetylglucosamin
GST	Glutathion-S-Transferase
GDP	Guanosin-5'-diphosphat
GppNHp	Guanosin-5'-[(β , γ)-imido]-triphosphat
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
GTPase	Guanosin-5'-triphosphatase
HA	Hemagglutinin-Epitop
hAGT	Humane O^6 -Alkylguanin-DNA-Alkyltransferase
HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
HEK	Humane embryonale Nierenzellen (<i>engl.: human embryonic kidney cells</i>)
HeLa-Zellen	Henrietta Lacks-Zellen
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (<i>engl.: High Performance Liquid Chromatography</i>)
IMAC	Immobilisierte Metallionenaffinitätschromatographie
IPTG	Isopropyl- β thiogalactopyranosid
kb	Kilobase(n)
k_{cat}	Katalytische Wechselzahl
K_D	Dissoziationskonstante
kDa	Kilodalton
K_M	Michaelis-Menten Konstante
k_{obs}	beobachtete Geschwindigkeitskonstante (<i>engl.: observed rate constant</i>)
LB	<i>engl. lysogeny broth</i>
LCV	Legionella enthaltende Vakuole (<i>engl.: Legionella containing vacuole</i>)
<i>L. pneumophila</i>	<i>Legionella pneumophila</i>
NBD	7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl
nm	Nanometer
N-Terminus	Amino-Terminus
M (mM, μ M,	Molar (milli-, mikro-, nanomolar)
MBP	Maltose bindendes Protein (<i>engl.: maltose binding protein</i>)
min	Minute(n)
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MS	Massenspektrometrie

o. Ä.	oder Ähnliches
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm
<i>p</i>	<i>para</i>
PaACPH	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ACPH
PC	Phosphocholin
PCP	Peptidträgerprotein (<i>engl.: peptide carrier protein</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>engl.: polymerase chain reaction</i>)
PDB	Protein Data Bank
PDB-ID	Protein Data Bank Identifizierungscode
PEG	Polyethylenglykol
PfACPH	<i>Pseudomonas fluorescens</i> ACPH
PLP	Pyridoxal-5'-phosphat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Ppant	Phosphopantetheinyl
PPTase	Phosphopantetheinyltransferase
PTM	Posttranslationale Modifikation
rel.	relativ
rpm	Runden pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
s.	siehe
SDS	Natrium-Dodecylsulfat (<i>engl.: sodium dodecylsulfate</i>)
SDS-PAGE	Natrium-Dodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
siRNA	Kleine eingreifende Ribonukleinsäure (<i>engl.: small interfering RNA</i>)
SPAAC	Spannungsinduzierte Azid-Alkin-Cycloaddition (<i>engl.: strain promoted azide alkine cycloaddition</i>)
SUMO	Kleiner Ubiquitin-artiger Modifizierer (<i>engl.: small ubiquitin-like modifier</i>)
t	Zeit (<i>engl.: time</i>)
TBE	Tris-Borat-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TFA	Trifluoressigsäure (<i>engl.: Trifluoroacetic acid</i>)
T4SS	Typ 4 Sekretionssystem
TMP	Trimethoprim
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
ün	Über Nacht
UDP	Uridin-5'-diphosphat
V	Volt
wt	Wildtyp
YFP	Gelb fluoreszierendes Protein (<i>engl.: yellow fluorescent protein</i>)

Aminosäuren wurden gemäß den Empfehlungen der *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) und der *International Union of Biochemistry and Molecular Biology* (IUB) mit Ein- und Dreibuchstabencodes abgekürzt.

Zusammenfassung

Die Untersuchung von Proteinen bezüglich ihrer Funktion und Lokalisation in Zellen erfordert in vielen Fällen ihre Markierung mit Fluorophoren, Affinitätsankern oder anderen Gruppen, die die fraglichen Proteine mit zusätzlichen Eigenschaften versehen. In der vorliegenden Arbeit wurde daher eine neue reversible Markierungsmethode für Proteine, basierend auf der Phosphocholin-transferase AnkX und der Phosphocholinhydrolase Lem3 aus *Legionella pneumophila*, entwickelt. Die Methode beruht auf der AnkX-katalysierten Übertragung einer mit CDP-Cholin konjugierten Sonde auf ein Protein, das durch rekombinante Ausstattung mit der kurzen Peptidsequenz TITSSYYR zum Akzeptor für die Modifikation wird. Lem3 ist zudem in der Lage, die Modifikation hydrolytisch abzuspalten und das Protein wieder in den unmarkierten Zustand zurück zu versetzen. Die Markierungsmethode wurde etabliert, indem die Enzyme sowie auch das Erkennungsmotiv optimiert und verschiedene CDP-Cholin-Derivate evaluiert wurden. Dabei stellte sich heraus, dass für eine katalytisch effiziente Markierung von Proteinen die FIC-Domäne von AnkX nicht ausreichend ist, sondern dass das Konstrukt AnkX₁₋₈₀₀ nötig ist, das zusätzlich eine ARH-Domäne enthält, denn vermutlich ist die ARHD an der Bindung des Substratproteins beteiligt. Bezüglich der Phosphocholinhydrolase konnte Lem3₁₋₅₀₀ als stabilstes Konstrukt mit maximaler Aktivität identifiziert werden. Die Erkennungssequenz für AnkX wurde mit Hilfe von Alanin-Permutationen auf das Pentapeptid TSSYY minimiert, wobei für eine katalytisch effiziente Modifikation zusätzlich ein Isoleucin notwendig ist (ITSSYY). Für Lem3 ist außerdem das C-terminale Arginin bedeutend, sodass für die Demodifizierung die Sequenz ITSSYYR erforderlich ist. Die Untersuchung der Nukleotidbindetasche von AnkX hinsichtlich ihrer Akzeptanz für derivatisierte CDP-Cholin-Moleküle ergab, dass das quartäre Ammonium mit primären oder tertiären Aminen, nicht aber mit einem Ether ersetzt werden kann. Außerdem muss die Sonde einen Abstand zum Cholin von mehr als zwei PEG-Einheiten aufweisen, um nicht mit der aktiven Tasche von AnkX zu kollidieren. Neben dem natürlichen Substrat Rab1b wurden zudem drei verschiedene Modellproteine untersucht und in AnkX-Substrate umgewandelt, indem sie an ihren Termini (SUMO und MBP) oder in internen Schleifenregionen (DrrA) rekombinant mit der Erkennungssequenz ausgestattet wurden. Sowohl mit SUMO und MBP als auch mit DrrA wurde eine AnkX-katalysierte Phosphocholinierung erzielt. Mit dem Konstrukt TITSSYYR-SUMO konnte sogar eine Markierung mit einem CDP-Cholin-Fluorescein-Konjugat erreicht werden, sodass eine Markierung von nicht natürlichen Proteinsubstraten mit einer Sonde durch AnkX generell möglich ist. Die Anwendbarkeit der Methode in Zellkulturen konnte prinzipiell durch die Aktivität von AnkX in Zellkulturüberstand demonstriert werden.

Abstract

The investigation of protein function and localization in cells often requires labeling with fluorophores, affinity-tags or other groups, that equip the protein of interest with additional properties. In this work, a new reversible protein labeling method, based on the phosphocholine transferase AnkX and the phosphocholine hydrolase Lem3 from *Legionella pneumophila* was developed. The method relies on the AnkX-catalyzed transfer of a CDP-choline conjugated probe onto a protein, which was turned into an acceptor of the modification by addition of TITSSYYR to its sequence. Also, Lem3 is capable of removing the modification through hydrolytic cleavage, thus restoring the unmodified protein. The labeling method was established by optimizing the enzymes and the recognition motif as well as by evaluating different CDP-choline derivatives. In this process AnkX' FIC domain alone turned out to be not sufficient for catalytically efficient labeling. In contrast, the construct AnkX₁₋₈₀₀ that contains an ARH domain in addition to the FIC domain is required, because the ARHD supposedly participates in protein substrate binding. Regarding the phosphocholine hydrolase, Lem3₁₋₅₀₀ was identified as the most stable and active construct. The AnkX recognition motif could be minimized to the pentapeptide TSSYY via alanine permutations, but for an efficient modification an isoleucine is also necessary (ITSSYYR). Lem3 additionally requires the terminal arginine, hence for a catalytically efficient demodification the sequence ITSSYYR is necessary. The investigation of AnkX' nucleotide binding pocket regarding the acceptance of derivatized CDP-choline molecules resulted in the finding, that the quaternary ammonium can be replaced by a primary or tertiary amine, but not by an ether. Furthermore, the probe's distance from the choline must be longer than two PEG moieties, in order not to clash with the active site. Along with the natural substrate Rab1b, three different model proteins were investigated and turned into AnkX substrates by recombinant addition of the recognition motif either to the termini (SUMO and MBP) or into flexible loop regions (DrrA). SUMO and MBP as well as DrrA could be successfully phosphocholinated by AnkX. Also the construct TITSSYYR-SUMO could be labeled by using a CDP-choline-Fluorescein conjugate. Therefore the labeling of non-natural protein substrates with a probe by AnkX is generally possible. The possible application of the method in cell culture could be proven by demonstrating the activity of AnkX in cell culture medium.

1. Einleitung

Proteine spielen in einer Vielzahl zellulärer Prozesse eine bedeutende Rolle. Sie sind beteiligt an der Kondensation von DNA im Zellkern (Histone), sind Bestandteil des Zytoskeletts (Mikrotubuli, Aktin) oder für die Bereitstellung von Energie in der Zelle erforderlich (Adenosin-5'-triphosphatasen, ATPasen), um nur einige Beispiele zu nennen (Murray 1965, Taylor 1972, Olmsted und Borisy 1973). Viele dieser Prozesse und die detaillierten Funktionsweisen von Proteinen sind allerdings noch nicht oder nur unvollständig verstanden. Gleichmaßen sind zelluläre Prozesse, die zur Ausbildung von Krankheitsbildern führen und in vielen Fällen von fehlfunktionierenden Proteinen ausgelöst werden, noch nicht aufgeklärt. Daher ist es von großer Bedeutung für die biologische, chemische und medizinische Forschung, geeignete Mittel zu finden, um die Wirkungsweise von Proteinen, ihr Zusammenspiel und proteinabhängige Abläufe in der Zelle untersuchen zu können. Hierzu müssen Proteine in den meisten Fällen so modifiziert werden, dass sie über zusätzliche Eigenschaften verfügen, die nicht über ihren zugrundeliegenden genetischen Code verschlüsselt sind (Gronemeyer, Godin et al. 2005). Diese Eigenschaften müssen die Voraussetzung erfüllen, einzigartig für die fragliche Proteinspezies zu sein und sie von anderen differenzierbar zu machen (Gronemeyer, Godin et al. 2005). Für die *in vitro*-Charakterisierung von Proteinen zum Beispiel, müssen Proteine zunächst aus ihrem zellulären Kontext isoliert und von Verunreinigungen befreit werden. Dazu können die zu untersuchenden Proteine beispielsweise mit einem Affinitätsanker versehen werden, der es erlaubt, die Proteine über eine Affinitätsmatrix spezifisch aus der Vielzahl an zellulären Molekülen herauszufischen (Crowe, Dobeli et al. 1994). Andere Anwendungen erfordern die Markierung von Proteinen mit fluoreszenten Farbstoffen. Für mikroskopische Lokalisationsstudien werden Zielproteine mit Fluorophoren ausgestattet, die es ermöglichen, beispielsweise ihren subzellulären Aufenthaltsort sichtbar zu machen (Tsien 2005). Wieder andere Bereiche befassen sich mit der Untersuchung natürlich vorkommender posttranslationaler Modifikationen (PTMs) an Proteinen. Um diese *in vitro* analysieren zu können, müssen die Modifikationen bei rekombinanter heterologer Expression des Zielproteins nachträglich bzw. künstlich angefügt werden (Wals und Ova 2014). Des Weiteren ist es für bestimmte Anwendungen von Nutzen, Proteine einheitlich orientiert auf einer Oberfläche zu immobilisieren. Auch hierfür müssen sie zunächst mit einem geeigneten Molekül, das diesen Zweck erfüllen kann, modifiziert werden (Weinrich, Jonkheijm et al. 2009).

Somit existieren viele Fragestellungen, für die es einer Markierung oder Modifizierung der Zielproteine bedarf, um sie für das menschliche Auge sichtbar, für einen Bindungspartner affin oder auf einer Oberfläche immobilisierbar zu machen. Methoden, die für die Markierung von Proteinen in Frage kommen, müssen eine Vielzahl von Bedingungen erfüllen, um für

diesen Zweck geeignet zu sein. Diese Anforderungen sind im Folgenden aufgelistet (Hinner und Johnsson 2010, Wombacher und Cornish 2011):

- Spezifität für das Zielprotein
- Chemoselektivität
- Ortsspezifität
- Stabilität
- Vermeidung von Seiteneffekten der Sonde
- Minimaler sterischer Einfluss
- Quantitativer Umsatz in kurzer Zeit
- Reversibilität
- Universelle Anwendbarkeit *in vitro* und *in vivo*
- Zellpermeabilität der Sonde
- Vermeidung von zelltoxischen Sonden
- Variabilität (Möglichkeit der Markierung mit verschiedenen Sonden)
- Geringer Syntheseaufwand bezüglich der Sonde

Seit der Erkenntnis der enormen Bedeutung von Proteinen für die Biologie und Medizin, wurden zahlreiche Methoden zur Proteinmarkierung oder -modifizierung entwickelt, mit dem Ziel, Eigenschaften von Proteinen genauer zu studieren (Hackenberger und Schwarzer 2008, Rashidian, Dozier et al. 2013). Allerdings erfüllen die existierenden Technologien meist nur einige der oben gelisteten Anforderungen, sodass sie sich zwar für individuelle Spezialanwendungen eignen, aber einem breiten Applikationsspektrum nicht zur Verfügung stehen (Hinner und Johnsson 2010). Daher arbeitet eine Vielzahl von Wissenschaftlern weiterhin intensiv an der Entwicklung neuer alternativer Markierungsmethoden mit verbesserten Eigenschaften.

Die wichtigsten existierenden Methoden zur Modifikation von Proteinen sollen in den folgenden Kapiteln vorgestellt und eine Übersicht über das Repertoire an Markierungsstrategien gewonnen werden.

1.1 Rekombinante Markierungsmethoden

Als rekombinante Markierungsmethoden werden im folgenden Kapitel Methoden zusammengefasst, die auf der Markierung eines Proteins mit einem zweiten Protein, das gewünschte Eigenschaften besitzt, basieren. Durch die Fusionierung der beiden Proteine werden die Eigenschaften des Markierungsproteins auf das gesamte Fusionskonstrukt übertragen. Hierbei wird dem Zielprotein bereits auf der Genebene die Sequenz des Markierungsproteins angefügt, sodass ein N- oder C-terminal markiertes Zielprotein als Produkt der Genexpression entsteht (Malhotra 2009). Das bekannteste Beispiel einer rekombinanten Modifizierung ist die Markierung mit dem grün fluoreszierenden Protein (GFP) (Tsien 1998). Dabei

handelt es sich um ein ca. 27 kDa großes Protein aus der Qualle *Aequoria victoria*, das die außergewöhnliche Eigenschaft der Autofluoreszenz besitzt (Ormo, Cubitt et al. 1996). GFP ist aus einem elfsträngigen β -Faltblatt aufgebaut, das eine Faszstruktur um eine coaxiale Helix ausbildet (Ormo, Cubitt et al. 1996). In der Mitte dieser Helix wird durch spontane Zyklisierung des Motivs Serin65-Tyrosin66-Glycin67 der Chromophor *p*-Hydroxybenzylidenimidazolidinon gebildet, der Absorptionsmaxima bei 395 nm und 470 nm und ein Emissionsmaximum bei 509 nm mit einer Schulter bei 540 nm aufweist (Chalfie, Tu et al. 1994, Cubitt, Heim et al. 1995). Durch rekombinante Fusionierung eines Zielproteins mit GFP entsteht ein N- oder C-terminal fluoreszent markiertes Protein (s. Abbildung 1), dessen Lokalisation und Funktion vor allem *in vivo* studiert werden kann (Chalfie, Tu et al. 1994). Seit der Entdeckung der Nutzbarkeit von GFP als Marker der Genexpression und der Lokalisation von Genprodukten in den späten Neunzigerjahren hat sich das Feld stark weiterentwickelt (Zhang 2009). Durch Mutation des Wildtyp-Proteins wurden GFPs mit verbesserten spektroskopischen Eigenschaften, wie z.B. eine höhere Fluoreszenzausbeute oder die Eliminierung des zweiten Absorptionsmaximums bei 470 nm entwickelt (Heim, Cubitt et al. 1995). Dadurch konnten aber auch fluoreszierende Proteine (FPs) erschaffen werden, deren Anregungs- und Emissionswellenlängen weit entfernt von denen des GFPs liegen und die somit andersfarbig fluoreszieren, wie z.B. das gelb fluoreszierende Protein (*yellow fluorescent protein*, YFP) (Griesbeck, Baird et al. 2001).

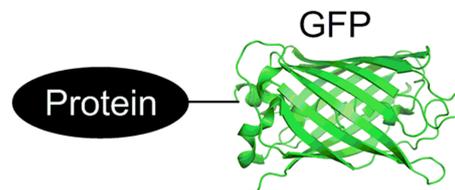


Abbildung 1: Rekombinantes Fusionskonstrukt aus einem beliebigen Protein und GFP (PDB-ID: 4KW4) (Ormo, Cubitt et al. 1996).

GFP-Mutanten aber auch die Identifizierung von FPs aus anderen Organismen, wie z.B. Korallen, ermöglichten die Bereitstellung eines Repertoires an fluoreszierenden Proteinen, deren spektroskopische Eigenschaften das gesamte Wellenlängenspektrum umfassen (Shaner, Campbell et al. 2004, Shaner, Steinbach et al. 2005). Die Tatsache, dass die Markierung im Fall von FPs genetisch codiert ist, erlaubt außerdem die gleichzeitige farbliche Markierung verschiedener Proteine in einer Zelle (Zhang, Campbell et al. 2002). FPs haben gegenüber organischen Fluorophoren, wie z.B. Fluorescein, allerdings einige Nachteile. Da sie mit etwa 27 kDa im Vergleich zu kleinen fluoreszenten Molekülen, die meist eine geringere Masse als 1 kDa aufweisen, relativ groß sind, besteht je nach fusioniertem Zielprotein die Gefahr eines negativen sterischen Einfluss, was die Funktion oder Lokalisation des jeweiligen Proteins beeinträchtigen kann (Zhang, Campbell et al. 2002, Lisenbee, Karnik et al. 2003). Auch die Anfälligkeit zur Oligomerisierung oder Aggregation ist bei manchen Vertre-

tern der FPs problematisch (Jing und Cornish 2011). Organische Fluorophore haben zudem eine höhere Photostabilität und Quantenausbeute, sowie schmalere Absorptions- und Emissionspeaks, was die gleichzeitige Betrachtung mehrerer Fluorophore vereinfacht (Jing und Cornish 2011). Ein weiterer Nachteil der FPs ist, dass es zwar viele verschiedenfarbige Varianten gibt, ein Wechsel des fluoreszenten Proteins aber immer eine Umklonierung erfordert und somit zum Beispiel die Eignung verschiedener FPs für die Fusion mit einem bestimmten Protein nur äußerst aufwändig getestet werden kann (O'Hare, Johnsson et al. 2007, Jing und Cornish 2011). FPs sind per se lediglich in der Lage, ihre inhärenten fluoreszenten Eigenschaften auf das fusionierte Protein zu übertragen. Markierungsmethoden, die auf kleinen organischen Molekülen beruhen sind hingegen meist so modular konzipiert, dass eine Modifizierung des Zielproteins mit einheitlich funktionalisierten Sonden verschiedenster physikalischer Eigenschaften, wie z.B. Fluorophoren oder Affinitätsankern möglich ist (Wombacher und Cornish 2011). Nichtsdestotrotz sind FPs weiterhin wertvolle Werkzeuge für die mikroskopische Studie von Proteinen in lebenden Zellen (Mishin, Belousov et al. 2015).

Neben der Zellbiologie haben rekombinante Markierungsmethoden unter Nutzung von Fusionsproteinen auch in anderen Feldern Anwendung gefunden. So werden Proteine für ihre rekombinante heterologe Expression mit Löslichkeitsfaktoren oder Affinitätsankern fusioniert, um sie löslich, biologisch aktiv und in ausreichender Menge herzustellen, damit sie anschließend *in vitro* charakterisiert werden können (Esposito und Chatterjee 2006). Die rekombinante heterologe Expression in *E. coli* ist häufig mit mangelnder Löslichkeit und der Bildung von *inclusion bodies* verbunden, sodass die Herstellung des gewünschten Proteins erschwert ist (Kapust und Waugh 1999). Um dieser Problematik zu entgehen, wurde die Expression unlöslicher Proteine als Fusionskonstrukte mit besonders gut löslichen Proteinen etabliert, wobei das schwerlösliche Protein durch sein fusioniertes Partnerprotein in Lösung gebracht wird (Baneyx 1999). Als hierfür besonders gut geeignet haben sich das maltosebindende Protein (MBP) und die Glutathion-S-Transferase (GST) erwiesen, aber auch SUMO (*small ubiquitin like modifier*) und Thioredoxin wurden für diesen Zweck etabliert (Kapust und Waugh 1999, Shih, Kung et al. 2002). MBP ist neben seinen solubilisierenden Eigenschaften vermutlich sogar in der Lage, die Faltung eines fusionierten Proteins positiv zu beeinflussen (Kapust und Waugh 1999, Nallamsetty und Waugh 2006). Außerdem können sowohl MBP als auch GST gleichzeitig als Affinitätsanker für die Reinigung des Zielproteins dienen, da MBP an eine Amylose- und GST an eine Glutathionmatrix binden kann (di Guan, Li et al. 1988, Smith und Johnson 1988). Sowohl MBP als auch GST sind mit 45 und 25 kDa relativ große Proteine, die möglicherweise negative Effekte auf die Funktion, z.B. bei Protein-Protein-Interaktionen des fusionierten Proteins haben (Waugh 2005). Daher wird auf der Genebene zwischen den beiden fusionierten Proteinen eine Erkennungssequenz für eine Protease (z.B. TEV-Protease, *tobacco etch virus protease*) eingebaut, die das Abschneiden

des Solubilitätsankers ermöglicht, sodass das unmodifizierte Zielprotein isoliert erhalten werden kann (Kapust und Waugh 2000, Kapust, Tozser et al. 2001, Waugh 2005).

Die Methode der Fusionierung eines Zielproteins mit einem Löslichkeitsfaktor und/oder Affinitätsanker leidet wie die Fusionierung mit FPs unter dem Nachteil, dass die Markierung nicht modular mit verschiedenen Sonden erreicht werden kann. Stattdessen kann das Zielprotein nur mit den immanenten Eigenschaften der jeweiligen Markierungsproteine versehen werden.

1.2 Bioorthogonale chemische Markierungsmethoden

Chemische Proteinmarkierungsmethoden basieren auf der Reaktion zweier reaktiver Gruppen, von denen eine (natürlicher) Bestandteil des Zielproteins ist und die andere mit dem Markierungsmolekül verknüpft ist.

Die ersten chemischen Markierungsmethoden nutzten die Reaktivitäten von Cysteinen und Lysin in Proteinen aus, indem Markierungsmoleküle eingesetzt wurden, die thiol- oder aminreaktive Funktionalitäten trugen, wie z.B. Maleimid oder N-Hydroxysuccinimid (Rashidian, Dozier et al. 2013). Da es diesen Methoden aber an Selektivität und Spezifität mangelt und sie außerdem langsame Reaktionsgeschwindigkeiten aufweisen, wurden alternative chemische Markierungsmethoden entwickelt, von denen einige sogar mit komplexen biologischen Systemen kompatibel sind (Tiefenbrunn und Dawson 2010). Diese Methoden bedienen sich klassischer chemischer Reaktionen, wie der Huisgens [3+2]-Cycloaddition oder der Diels-Alder-Reaktion, um funktionalisierte Markierungsmoleküle an einem Protein anzubringen (Huisgen et al. 1967, Diels et al. 1928). Für die Durchführung viele dieser Ligationen bedarf es zunächst aber der Einführung unnatürlicher reaktiver Gruppen in das Zielprotein, die dann als chemische Angriffspunkte für die komplexeren Ligationen dienen (Tiefenbrunn und Dawson 2010). Etablierte Methoden für die Einführung von Aldehyden oder Ketonen am N-Terminus sind die Transaminierung mit Pyridoxal-5'-phosphat (PLP) oder die Periodat-Oxidation (Geoghegan und Stroh 1992, Scheck, Dedeo et al. 2008). Auch die elektrophile aromatische Substitution zur Funktionalisierung von Tyrosinen ist eine etablierte Methode zur Generierung einzigartiger chemisch reaktiver Gruppen in Proteinen (Carrico 2008). Die Einführung unnatürlicher Aminosäuren mit reaktiven Seitenketten mittels *Amber Codon Suppression* wird ebenfalls immer häufiger zu diesem Zweck ausgenutzt (s. 1.4) (de Graaf, Kooijman et al. 2009).

Die chemischen Ligationen zur Kopplung eines Zielproteins und einer Sonde müssen im Vergleich mit den zuvor beschriebenen Markierungsmethoden zusätzliche Anforderungen erfüllen. Sie müssen in wässriger Lösung bei einem annähernd physiologischen pH-Wert und bei geringen Temperaturen durchführbar sein (Tiefenbrunn und Dawson 2010). Außerdem müssen sie bioorthogonal, d.h. spezifisch für das chemisch funktionalisierte Protein gegenüber anderen reaktiven Molekülen in der Zelle, wie Nukleinsäuren, Zuckern, ande-

ren Proteinen und diversen Metaboliten sein (Lang und Chin 2014). Klassische chemische Reaktionen, die für die Proteinmarkierung hinsichtlich dieser Anforderungen optimiert wurden, sind die Huisgen [3+2]-Cycloaddition, die Staudinger-Ligation, die photoinduzierbare Reaktion von Alkenen mit Tetrazol sowie die Diels-Alder Ligation, um nur die wichtigsten zu nennen (Sletten und Bertozzi 2009). Einiger dieser Methoden sollen in den folgenden Kapiteln näher beschrieben werden.

1.2.1 Huisgen Azid-Alkin-Cycloaddition

Bei der Huisgen [3+2]-Cycloaddition handelt es sich um die Reaktion eines Azids mit einem Alkin, wobei ein 1,2,3-Triazol entsteht, weshalb die Reaktion auch als Azid-Alkin-Cycloaddition bezeichnet wird (s. Abbildung 2A) (Huisgen et al. 1967).

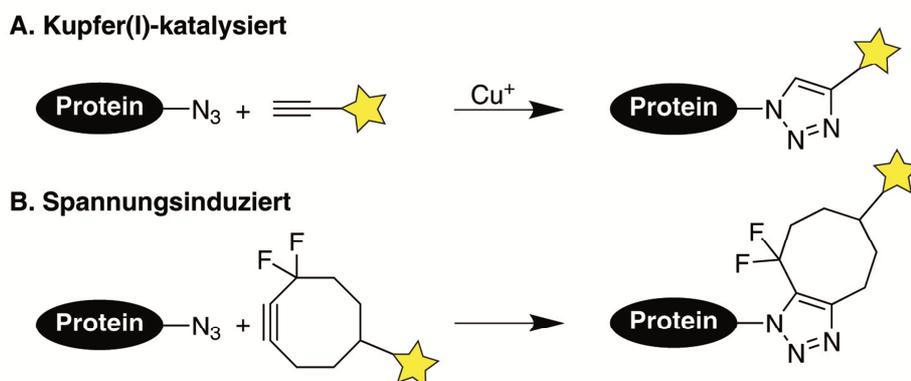


Abbildung 2: Huisgen Azid-Alkin-Cycloaddition. A) Kupfer(I)-katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition (CuAAC) zwischen einem Azid-funktionalisiertem Protein und einer Alkin-funktionalisierten Sonde (gelber Stern), sodass das Protein und die über ein 1,2,3-Triazol verknüpft werden. B) Spannungsgeförderte Azid-Alkin Cycloaddition (*strain promoted azide alkyne cycloaddition*, SPAAC) zwischen einem Azid-funktionalisiertem Protein und einer Sonde, die an ein fluoriertes, unter Spannung stehendes Cyclooctin konjugiert ist. Auch hierbei entsteht ein 1,2,3-Triazol, das die beiden Zielmoleküle miteinander verbrückt. Die funktionellen Gruppen können auch am jeweils anderen Ligationspartner vorliegen. Abbildung modifiziert übernommen aus (Tiefenbrunn und Dawson 2010).

Durch die Katalyse dieser Reaktion mit Kupfer(I) kann sie, im Gegensatz zur vormals notwendigen Hitzeaktivierung, effizient bei Raumtemperatur durchgeführt werden (Rostovtsev, Green et al. 2002, Tornøe, Christensen et al. 2002). Auch die Durchführung der Reaktion in Wasser konnte etabliert werden (Rostovtsev, Green et al. 2002). Auf diese Weise kann ein azid- (oder alkin)-funktionalisiertes Protein mit einer alkin- (oder azid)-funktionalisierten Sonde chemisch konjugiert werden, was z.B. bereits bei der Glykosylierung oder der Fluoreszenzmarkierung von Proteinen Anwendung gefunden hat (Gamblin, Scanlan et al. 2009, Shieh und Bertozzi 2014). Ein großer Nachteil ist allerdings der Einsatz von Kupfer(I), da es zelltoxisch ist und somit den Einsatz dieser Ligrationsreaktion für *in vivo*-Markierungsstrategien unrealisierbar macht. Daher haben Carolyn Bertozzi und Mitarbeiter eine Kupfer(I)-freie Variante entwickelt, bei der sich die reaktive Alkingruppe innerhalb eines gespannten Octanrings befindet, sodass das Alkin für eine Reaktion mit einem Azid aktiviert wird (s. Abbildung 2B)

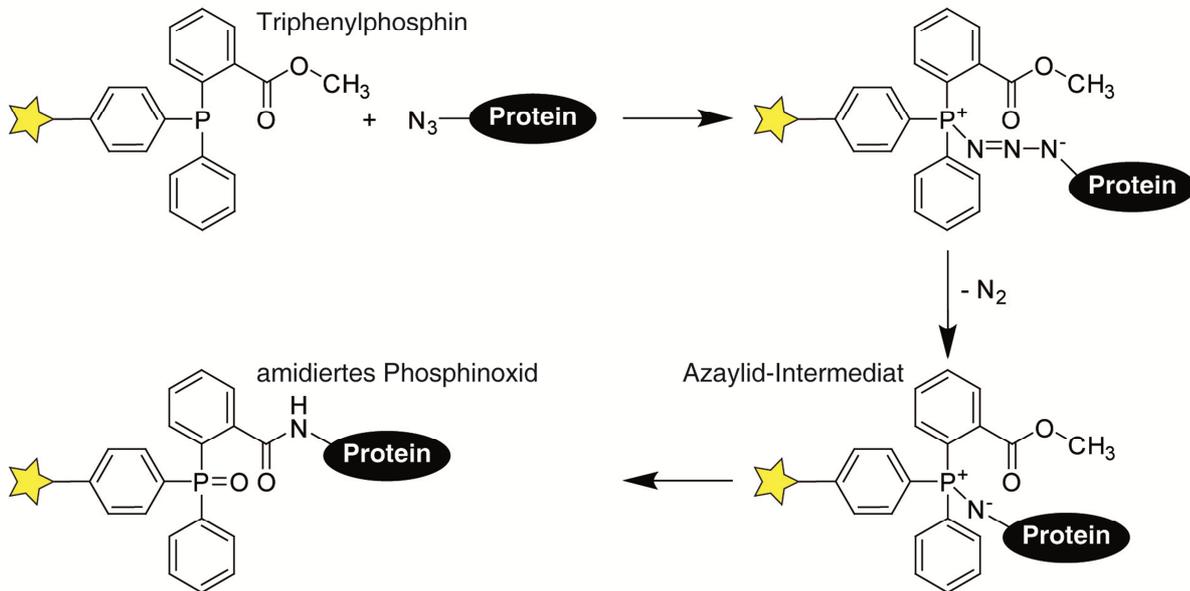
(Agard, Prescher et al. 2004, Baskin, Prescher et al. 2007). Durch Anbringung elektronenziehender Atome, wie z.B. Fluor, an das Cyclooctin, kann die Reaktivität des Alkins zusätzlich verbessert und somit die Reaktionsgeschwindigkeit der Ligation erhöht werden (Codelli, Baskin et al. 2008, Ning, Guo et al. 2008). Diese verbesserte Huisgen [3+2]-Cycloaddition ist allgemein als *Strain Promoted Azide Alkyne Cycloaddition* (SPAAC) bekannt (Agard, Prescher et al. 2004). Die Azid-Alkin-Cycloaddition wurde beispielsweise zur Fluoreszenzmarkierung von Sacchariden in Glykoproteinen verwendet. Clark *et al.* nutzten dabei eine optimierte Galactosyltransferase, die azidfunktionalisierte UDP-Galactose als Substrat akzeptiert und dieses an ein Glykoprotein anbringt. Mit einem Alkin-funktionalisierten TAMRA-Fluorophor erreichten sie die Markierung des Glykoproteins und konnten zudem die Markierung von Glykoproteinen in fixierten HeLa-Zellen durchführen (Clark, Dweck et al. 2008).

1.2.2 Staudinger Ligation

Die klassische Staudinger Ligation wurde im Jahr 2000 von Bertozzi und Saxon für die Modifizierung von azidfunktionalisierten Zuckern auf der Oberfläche von Zellen angewendet und stellt die erste *in vivo* anwendbare chemische Modifizierungsstrategie dar (Saxon und Bertozzi 2000). Die Staudinger Ligation basiert auf der Staudinger Reaktion, die von Hermann Staudinger als Reduktion von Aziden zu primären Aminen unter Verwendung reaktiver Phosphine beschrieben wurde (Staudinger und Meyer 1919) (van Berkel, van Eldijk et al. 2011). Dabei reagiert ein Azid mit einem Triarylphosphin zu einem Azaylidintermediat, das allerdings in Wasser instabil ist und zu Phosphinoxid und einem primären Amin hydrolysiert wird (s. Abbildung 3A) (Schilling, Jung et al. 2011). Für die Stabilisierung dieses Intermediats in Wasser wird ein Methylester an eine der Arylgruppen in *ortho*-Position zum Phosphin angebracht, an dem der Stickstoff nukleophil angreifen kann, wodurch ein Amid gebildet wird (Saxon und Bertozzi 2000). Über diese Bindung besteht die Möglichkeit der Konjugation eines azidfunktionalisierten Moleküls (z.B. einem Protein) mit einem phosphinfunktionalisierten zweiten Molekül (z.B. eine organische Sonde) (Shieh und Bertozzi 2014). Da sowohl das Phosphin als auch das Azid abiotische Gruppen sind und somit keine Nebenreaktionen mit anderen biologischen Molekülen eingehen, eignet sich diese Methode besonders für Modifizierungen in zellbasierten Studien (van Berkel, van Eldijk et al. 2011). Die Bioorthogonalität der Staudinger Ligation wurde von Saxon und Bertozzi bei der Biotinylierung von zelloberflächenexponierten Sacchariden demonstriert, wofür ein zwecks Wasserlöslichkeit polyethylenglykosyliertes (PEGyliertes) Triphenylphosphinderivat verwendet wurde (Saxon und Bertozzi 2000). Die breite Anwendbarkeit der Staudinger Ligation wurde durch die Markierung von Zuckern auf Splenocyten von lebenden Mäusen demonstriert. Die Mäuse wurden dazu mit einem azidfunktionalisierten Mannosaminderivat gefüttert, das über einen biosynthetischen Prozess in die Oberfläche von Zellen eingebaut wurde. Für die Markierung wurde den Mäusen ein Konjugat aus Phosphin und Flag-Tag gespritzt. Nach 90 min wurden den Mäusen

Splenocyten entnommen und das Vorhandensein des Flag-Tag-Epitops mittels Immunoblot nachgewiesen (Prescher, Dube et al. 2004).

A. Klassische Staudinger Ligation



B. Spurlose Staudinger Ligation

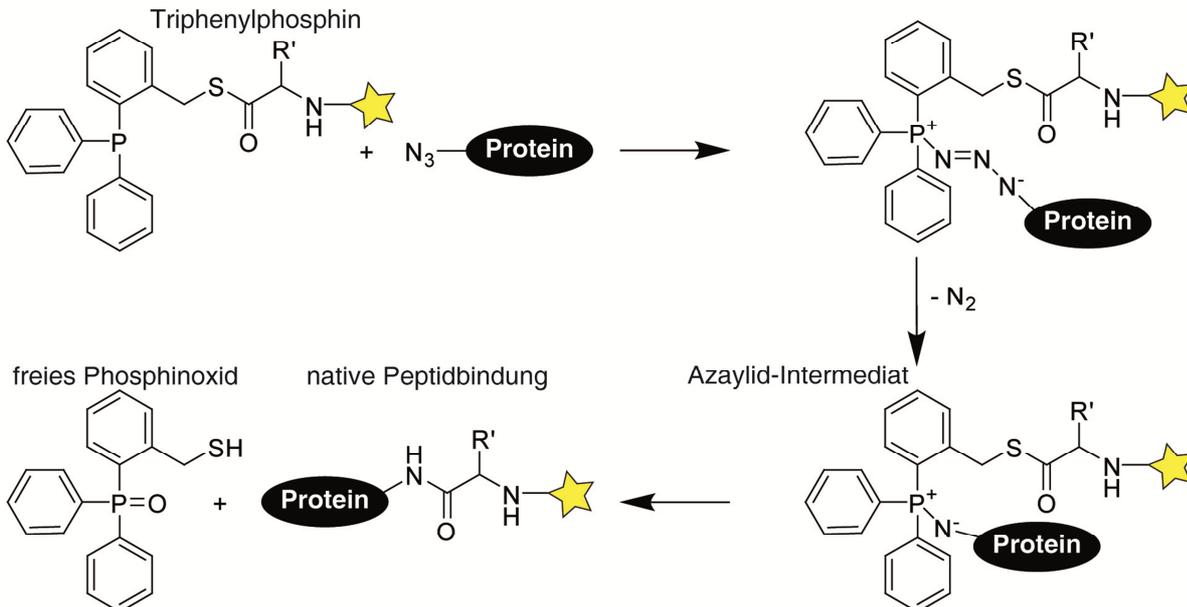


Abbildung 3: Staudinger Ligation als chemische Markierungsmethode. A) Bei der klassischen Staudinger Ligation wird der eine Reaktionspartner (hier die Sonde) mit einem Methoxy-Triphenylphosphin und der andere (hier das Protein) mit einer Azidgruppe funktionalisiert. Durch nukleophilen Angriff des Azids an das Phosphin entsteht ein intermediäres Azaylid und molekularer Stickstoff wird freigesetzt. Durch einen weiteren nukleophilen Angriff des verbliebenen Stickstoffs auf die Estergruppe wird die Sonde über eine Amidbindung mit einer der Phenylgruppen verknüpft. Das Phosphin liegt dadurch dann oxidiert vor. B) Eine Variante der in A) dargestellten Reaktion ist die spurlose Staudinger Ligation. Hierbei werden die beiden Ligationspartner über eine native Amidbindung miteinander verknüpft. Bei dieser Reaktion ist die Sonde über einen Thioester mit dem Phosphin funktionalisiert. Durch nukleophilen Angriff des azidfunktionalisierten Proteins entsteht wieder ein Azaylid-Intermediat und molekularer Stickstoff wird freigesetzt. Die Umlagerung zum Amid im nächsten Schritt bedingt bei dieser Reaktion im Gegensatz zu A) allerdings die Abspaltung des Phosphinoxids. Diese Methode wird bevorzugt für Protein-Protein oder Protein-Peptid-Ligationen verwendet, da dabei eine native Peptidbindung entsteht. Abbildung modifiziert übernommen aus (Tiefenbrunn und Dawson 2010).

Die Staudinger Ligation wurde weiter verfeinert mit dem Ziel der Formierung einer nativen Amidbindung unter hydrolytischer Abspaltung des sterisch anspruchsvollen Phosphinoxids (s. Abbildung 3B) (Kohn und Breinbauer 2004). Dabei werden Thiole des Triphenylphosphins eingesetzt, die über einen Thioester den C-Terminus des Proteins oder Peptids aktivieren (Nilsson, Kiessling et al. 2000). Das Azid der Sonde greift nukleophil am Phosphin an, wodurch ein reaktives Iminophosphoran entsteht und dieses reagiert anschließend mit dem Thioester zum Amid unter der hydrolytischen Freisetzung des Phosphinoxids (Saxon, Armstrong et al. 2000). Da hierbei eine native Amidbindung ohne Spuren des Kupplungsreagenz entsteht, wird diese Variante der Staudinger Ligation als *traceless Staudinger Ligation* bezeichnet (Saxon, Armstrong et al. 2000).

1.2.3 Diels-Alder Cycloaddition

Die Diels-Alder [4+2]-Cycloaddition ist eine klassische organische Reaktion zur Bildung von komplexen Ringstrukturen (Diels et al. 1928). Dabei reagiert ein konjugiertes Dien mit einem Dienophil zu einem sechsgliedrigen Ring unter Ausbildung von zwei neuen Kohlenstoffverbindungen. Ein Beispiel für eine Diels-Alder-Reaktion ist die Addition eines 2,4-Hexadiens an ein Maleimid (s. Abbildung 4A) (Paris, Brun et al. 2015). Die ersten biologischen Anwendungen dieser Ligation waren die Immobilisierung von Nukleinsäuren oder Peptiden auf Oberflächen zur Ausbildung von Microarrays (Hill, Taunton-Rigby et al. 2001, Husar, Anziano et al. 2001, Houseman, Huh et al. 2002). Auch die Konjugation von Carbohydraten mit Proteinen wurde mit dieser Ligationmethode realisiert (Pozsgay, Vieira et al. 2002). Da diese Reaktion in wässriger Lösung durchgeführt werden kann, ist sie besonders geeignet für die *in vivo* Markierung von Biomolekülen (Fringuelli, Matteucci et al. 2001, Lindstrom 2002). Allerdings hat sich die Anbringung sowohl des Diens als auch des Dienophils an Biomoleküle als schwierig herausgestellt, da insbesondere das Dienophil säurelabil ist und somit z.B. für Anwendungen in der Festphasensynthese von Peptiden nicht geeignet ist (Tiefenbrunn und Dawson 2010). Für Proteinmarkierungen hat die Verwendung von Maleimid als Dienophil zudem den Nachteil, dass auch Thiole von Cysteinen modifiziert werden können (Paris, Brun et al. 2015). Gleichermaßen können nukleophile Seitenketten bei physiologischem pH mit Dienophilen reagieren, weshalb die Ligation bei niedrigem pH ausgeführt werden muss, um unspezifische Nebenreaktionen und Mehrfachmarkierungen zu vermeiden (Hackenberger und Schwarzer 2008).

Eine Alternative zur normalen Diels-Alder-Cycloaddition ist die sogenannte *Inverse-Electron-Demand* Diels-Alder-Ligation (Tiefenbrunn und Dawson 2010). Dabei reagiert an Stelle eines elektronenreichen ein elektronenarmes Dien, wie z.B. Tetrazin, mit einem unter Spannung stehenden *trans*-Cycloocten (s. Abbildung 4B) (Chen, Wang et al. 2012). Auf die [4+2]-Cycloaddition folgt eine irreversible Retro-[4-2]-Cycloaddition, bei der molekularer Stickstoff als einziges Nebenprodukt freigesetzt wird (Blackman, Royzen et al. 2008).

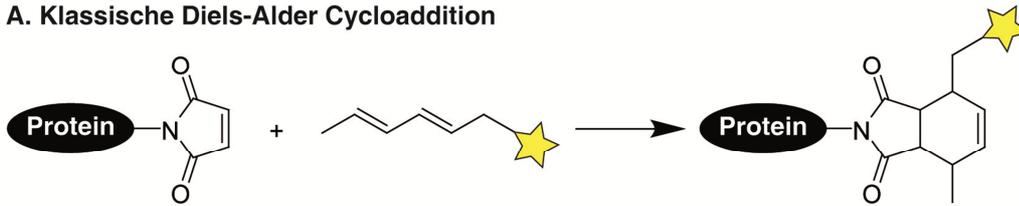
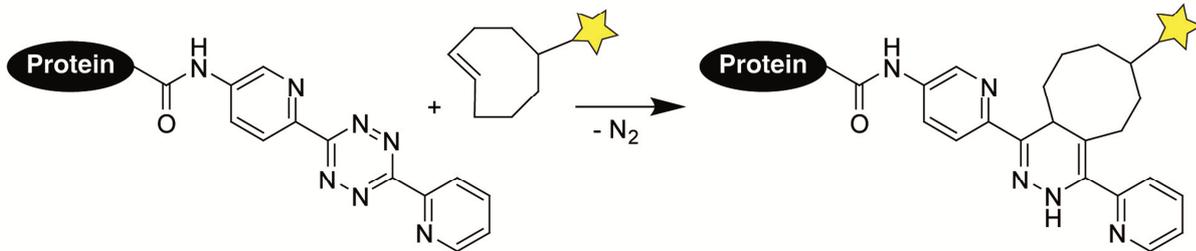
A. Klassische Diels-Alder Cycloaddition**B. Inverse-Electron Demand Diels-Alder Cycloaddition**

Abbildung 4: Die Diels-Alder [4+2]-Cycloaddition ist eine Reaktion zur Kopplung von einem Dien mit einem Dienophil unter Ausbildung eines sechsgliedrigen Rings. Bei der klassischen Variante (A) reagiert z.B. ein Maleimid, das an das zu modifizierende Protein geknüpft ist, als Dienophil mit dem 2,4-Hexadien-Sonden-Konjugat zu einem Cyclohexen-Derivat, sodass das Protein und die Sonde kovalent miteinander verbunden sind. B) Die Inverse-Electron Demand Diels-Alder Cycloaddition ist eine Variante der klassischen Diels-Alder Ligation, bei der ein elektronenarmes Dien verwendet wird. Dadurch wird die Reaktivität und somit auch die Reaktionsgeschwindigkeit gesteigert. Hier ist als Beispiel die Ligation eines Proteins über eine Tetrazin-Funktion mit einer Cycloocten-funktionalisierten Sonde dargestellt. Abbildung modifiziert übernommen aus (Tiefenbrunn und Dawson 2010).

Die im Vergleich zur normalen Diels-Alder-Ligation gesteigerte Reaktivität beider Reaktanden führt zu einer erhöhten Reaktionsgeschwindigkeit, was einen Vorteil für die Anwendung in biologischen Systemen darstellt (Blackman, Royzen et al. 2008). So haben beispielsweise Hilderbrand und Mitarbeiter die Markierung von Krebszellen mit Fluorophoren mittels Ligation eines dienophilen Norbornens in Konjugation mit einem Antikörper und eines fluoreszenten Tetrazinderivats erreicht (Devaraj, Weissleder et al. 2008).

1.3 Selbstmarkierende Protein-/Peptidfusionen

Als Methoden mit selbstmarkierenden Protein- oder Peptidfusionen werden im folgenden Kapitel Methoden zusammengefasst, die auf der rekombinanten Anfügung eines Peptids oder Proteins oder einem Teil davon an das Zielprotein beruhen und auf diese Weise das Zielprotein empfänglich für eine chemische oder enzymatische Markierungsreaktion gemacht wird. Hierfür werden vor allem Enzym-Substrat oder Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen ausgenutzt, wobei das Substrat bzw. der Ligand (meist ein kleines organisches Molekül) mit der Sonde verknüpft wird (Miller und Cornish 2005). Die Voraussetzungen für diese Markierungsstrategie sind die Spezifität der Interaktion, die Zellpermeabilität des Substrat-Sonden-Heterodimers und dessen unkomplizierte Synthese sowie eine hochaffine, schnelle und quantitative Bindung (Hinner und Johnsson 2010).

1.3.1 Peptidbasiert: FIAsh-Tag

Die erste Markierungsmethode, die alternativ zu fluoreszierenden Proteinen wie GFP die fluoreszente Markierung von Proteinen *in vivo* ermöglichte, ist die sogenannte FIAsh- (*Fluorescein Arsenical helix binder*)-Technologie (Jing und Cornish 2011). Sie wurde im Jahr 1998 von Roger Y. Tsien und seinen Mitarbeitern konzipiert (Griffin, Adams et al. 1998). Die Methode beruht auf der kovalenten Bindung eines bisarsenischen Fluoresceinderivats und vier Thiolen, die von Cysteinen eines Proteins bereitgestellt werden (s. Abbildung 5) (Gaietta, Deerinck et al. 2011). Das Zielprotein muss dafür rekombinant mit einer Peptidsequenz ausgestattet werden, die ein Tetracysteinmotiv enthält. Jeweils zwei Cysteine konjugieren ein Arsen, wobei der Abstand der Cysteinzweiiergruppen durch Insertion weiterer Aminosäuren entsprechend dem Abstand der Arsenatome angepasst wird (CCXXCC) (Hoffmann, Gaietta et al. 2010). Als Abstandshalter haben sich mittlerweile Prolin und Glycin bewährt, da Peptide mit einem CCPGCC-Motiv die stabilsten Komplexe im Vergleich zu anderen Aminosäuren bilden (Adams, Campbell et al. 2002, Martin, Giepmans et al. 2005). Wie auch bei fluoreszierenden Proteinen ist die Spezifität des Markierungssystems über die genetische Codierung des Peptidtags gegeben (Jing und Cornish 2011).

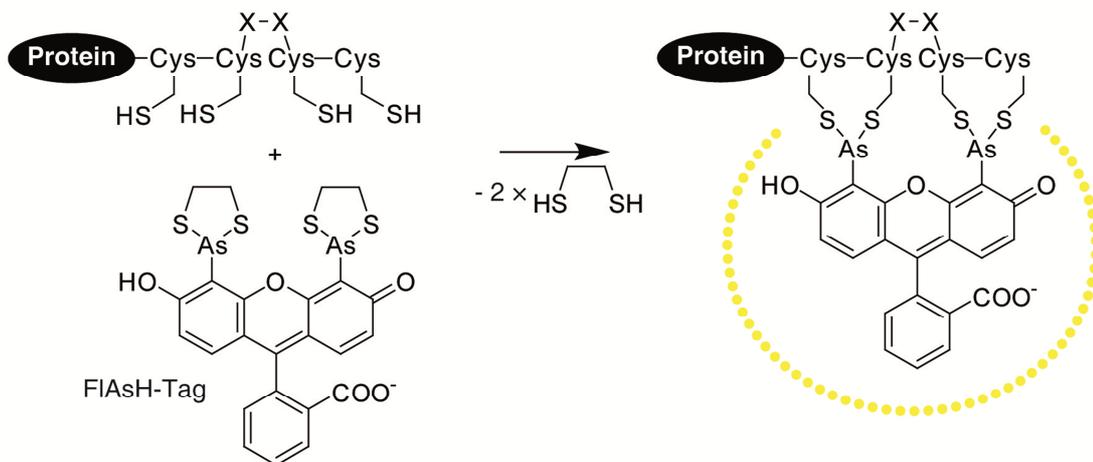


Abbildung 5: Die FIAsh-Tag-Technologie nutzt den Fluorophor Fluorescein, der mit zwei Arsenatomen derivatisiert ist, für die Markierung von Proteinen aus. Das Zielprotein wird hierbei rekombinant mit einem Tetracysteinmotiv ausgestattet, dessen Thiole das Arsen des Fluoresceins koordinieren können. Erst im proteingekoppelten Zustand entfaltet das Fluoresceinderivat seine Fluoreszenz, sodass freies, unreaktiertes Fluorescein kein Hintergrundsignal verursacht. Abbildung modifiziert übernommen aus (Jing und Cornish 2011).

Das Besondere an dieser Methode ist, dass die Fluoreszenz des Fluoresceinderivats erst bei der Bindung an das Tetracysteinmotiv maßgeblich ansteigt und somit ungebundener Farbstoff nicht sichtbar ist (Griffin, Adams et al. 1998). Von großem Vorteil ist außerdem, dass das Molekül die Zellmembran problemlos passieren kann (Sosinsky, Gaietta et al. 2003). Allerdings ist die mangelnde Spezifität der Reaktion ein Nachteil, da nicht-spezifische Bindungen zu cysteinreichen zellulären Proteinen auftreten, was auch der Grund für die beobachtete Zytotoxizität der arsenenthaltenden Moleküle ist (Stroffekova, Proenza et al. 2001,

Hoffmann, Gaietta et al. 2010). Um das zu verhindern, wird das Fluoresceinderivat mit kleinen vicinalen Dithiolen, wie z.B. 2,3-Dimercaptopropanol oder 1,2-Ethandithiol verabreicht, die das Arsen stärker koordinieren als zelluläre Dithiole, aber dennoch vom Tetracystein-peptid verdrängt werden können (Griffin, Adams et al. 1998). In höheren Konzentrationen können diese Dithiole auch dazu verwendet werden, die Markierung vom Protein zu entfernen, sodass die Markierung reversibel ist (Adams, Campbell et al. 2002). Verglichen mit fluoreszierenden Proteinen hat die FIAsh-Methode aber noch den entscheidenden Vorteil, dass der Tag mit ca. 700 Da nur einen Bruchteil der Größe von GFP (ca. 27 kDa) aufweist und somit der sterische Einfluss auf das Zielprotein viel geringer ist (Griffin, Adams et al. 1998, Tsien 1998). Seither wurden zahlreiche FIAsh-basierte Farbstoffe entwickelt, die gleichermaßen mit tetracysteinmodifizierten Proteinen konjugieren, aber ein breites Emissionsspektrum abdecken. So ist beispielsweise ein rot fluoreszierendes Analog namens ReAsH basierend auf Resorufin und weitere Derivate, die im kurzwelligen Bereich (blau) emittieren (HoXAsH und CHoXAsH) entwickelt worden (Adams, Campbell et al. 2002, Bhunia und Miller 2007).

1.3.2 Proteinbasiert: Dihydrofolatreduktase und Trimethoprim

Ein Beispiel für eine Markierungsstrategie, die auf einem proteinbasierten selbstmarkierenden *Tag* beruht, ist die Interaktion zwischen der Dihydrofolatreduktase (DHFR) aus *E. coli* und dem Antibiotikum Trimethoprim (TMP), einem Analog des natürlichen Substrats Folsäure, ausnutzt (Miller, Sable et al. 2004). Die DHFR wird bei dieser Strategie rekombinant mit dem Zielprotein fusioniert, sodass das resultierende Proteinkonstrukt mit fluoreszenten Derivaten von TMP modifiziert werden kann (s. Abbildung 6) (Jing und Cornish 2011).

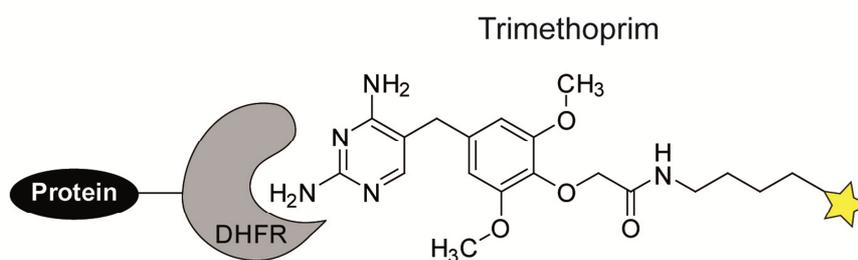


Abbildung 6: Die Dihydrofolatreduktase (DHFR) wird zur Markierung von fraglichen Proteinen rekombinant an diese fusioniert. Dann wird die starke nicht-kovalente Bindung von DHFR zum Liganden Trimethoprim ausgenutzt, der mit der Sonde konjugiert ist, um das Protein zu markieren. Diese Methode wurde bereits weiterentwickelt, indem ein Cystein in die Bindetasche eingefügt wurde, über das ein entsprechend funktionalisierter Ligand kovalent binden kann. Abbildung modifiziert übernommen aus (Wombacher, Heidebreder et al. 2010).

Die Bindung zwischen der DHFR und TMP ist mit einer Dissoziationskonstante (K_D) von 1 nM hochaffin und erlaubt die Derivatisierung des Liganden an dessen *para*-methoxy-Position ohne schwerwiegende Affinitätsverluste (Calloway, Choob et al. 2007, Jing und Cornish 2013). Auch die Löslichkeit, Zellpermeabilität und kommerzielle Verfügbarkeit von unterschiedlich fluoreszierenden TMP-Derivaten sind ein Vorteil dieses Markierungssystems,

insbesondere für *in vivo* Markierungsexperimente (Miller, Cai et al. 2005). Die als Monomer vorkommende DHFR ist mit ca. 18 kDa um etwa 30 % kleiner als beispielsweise GFP und unterliegt anders als manche fluoreszenten Proteine keinen Expressions- und Faltungsschwierigkeiten, sodass sie sich für Fusionskonstrukte mit verschiedenen Zielproteinen eignet (Baccanari, Phillips et al. 1975, Wallace und Robert Matthews 2002). Außerdem wurde eine Cysteinmutante der DHFR entwickelt, die eine kovalente Bindung zu einem Acrylamidderivat von TMP und somit eine kovalente Modifizierung des Zielproteins ermöglicht, wodurch die Konzentration an appliziertem Substrat-Sonden-Konjugat und damit auch Hintergrundsignale reduziert werden können (Gallagher, Sable et al. 2009, Jing und Cornish 2011, Chen, Jing et al. 2012). Die Anwendbarkeit der Interaktion von DHFR und TMP als Markierungsstrategie für Proteine wurde anhand der Fluoreszenzmarkierung von Histon H2B in lebenden Zellen demonstriert. Dazu wurde das Histon rekombinant mit der DHFR fusioniert und in transfizierten HeLa-Zellen exprimiert. Die Verabreichung eines TMP-ATTO655-Konjugats zur Zellkultur resultierte innerhalb kurzer Zeit in der spezifischen Fluoreszenzmarkierung des Zielprotein H2B in den Zellkern (Wombacher, Heidbreder et al. 2010).

1.3.3 Proteinbasiert: SNAP-Tag/ CLIP-Tag

Die SNAP-Tag-Technologie beruht auf der Interaktion von humaner O^6 -Alkylguanin-DNA-Alkyltransferase (hAGT) und dessen Substrat O^6 -Alkylguanin (s. Abbildung 7) (Keppler, Kindermann et al. 2004). Die physiologische Funktion der hAGT beinhaltet die Gewährleistung der Genomstabilität durch Reparatur der natürlich auftretenden Mutation von Guanin zu O^6 -Methylguanin und verhindert somit DNA-Fehlpaarungen während der Replikation und Transkription (Pegg, Dolan et al. 1995). Die hAGT nutzt ein Cystein in ihrem aktiven Zentrum, das die Methylgruppe des mutierten Guanins auf sich überträgt und so die Demethylierung katalysiert (Pegg, Dolan et al. 1995, Daniels, Mol et al. 2000). Dieser Mechanismus wird bei der SNAP-Tag-Technologie ausgenutzt, indem ein O^6 -Methylguanin verwendet wird, das statt des Methyls eine Benzylgruppe trägt, die wiederum mit einer Sonde verknüpft ist (Damoiseaux, Keppler et al. 2001). Durch den nukleophilen Angriff des Cysteins der hAGT auf die Etherfunktion wird die Benzylgruppe mitsamt der Sonde auf das Enzym übertragen (Keppler, Kindermann et al. 2004). Liegt die hAGT als Fusionskonstrukt mit einem Zielprotein vor, so wird dieses durch die hAGT-katalysierte Reaktion markiert (Gronemeyer, Chidley et al. 2006). Durch gerichtete Evolution wurden zudem hAGT-Mutanten identifiziert, die eine katalytisch effiziente und irreversible Übertragung der Sonde auf das Zielprotein erlauben (Damoiseaux, Schultz et al. 2002, Juillerat, Gronemeyer et al. 2003, Heinis, Schmitt et al. 2006).

Die SNAP-Tag-Technologie wurde *in vivo* zum ersten mal für die Markierung von humanem Östrogenrezeptor α (hER α) erprobt. Dazu wurde ein Fusionskonstrukt aus hAGT und hER α kloniert und damit HeLa-Zellen transfiziert. Nach der anschließenden Inkubation der Zellen

mit einem O^6 -Benzylguanin-Fluorescein-Konjugat konnte der fluoreszierende Rezeptor mikroskopisch nachgewiesen werden (Keppler, Kindermann et al. 2004).

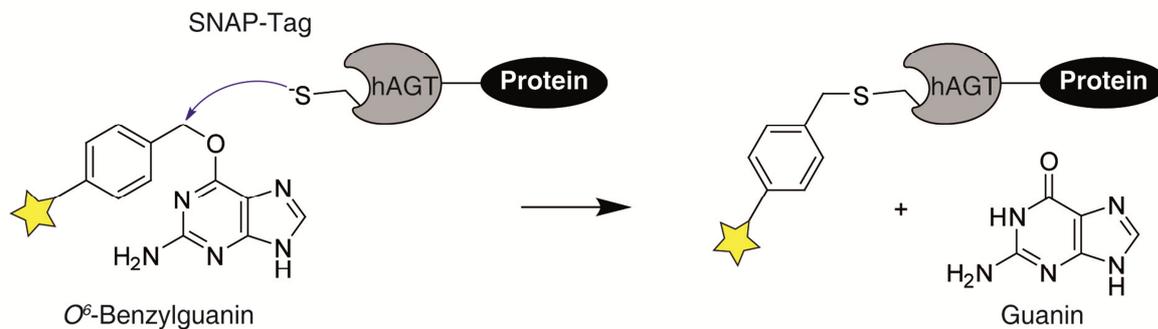


Abbildung 7: Bei der SNAP-Tag-Technologie wird die Demethylierungsaktivität der humanen O^6 -Alkylguanin-DNA-Alkyltransferase (hAGT) ausgenutzt, um eine Sonde auf ein Protein zu übertragen. Die hAGT wird dazu rekombinant an das Zielprotein fusioniert, um dann die Sonde über einen Cysteinrest von dem O^6 -Benzylguanin-Derivat auf sich und somit auch auf das Zielprotein zu übertragen. Abbildung modifiziert übernommen aus (Keppler, Kindermann et al. 2004).

Die CLIP-Tag-Technologie ist eine Abwandlung der zuvor beschriebenen SNAP-Tag-Methode. Anstelle des O^6 -Benzylguaninderivats wird hier ein mit einer Sonde verknüpft O^2 -Benzylcytosin als Substrat für die hAGT verwendet (Gautier, Juillerat et al. 2008). Dazu wurde durch gerichtete Evolution eine hAGT-Mutante identifiziert, die O^2 -Benzylcytosin akzeptiert, nicht aber das Guanin-Derivat (Gautier, Juillerat et al. 2008). Mit dem SNAP- und CLIP-Tag wurden somit zwei orthogonale Markierungsmethoden entwickelt, die eine gleichzeitige Markierung von zwei verschiedenen Proteinen in einer Zelle ermöglichen (Gautier, Nakata et al. 2009). Auch bei diesen beiden Methoden sind Heterodimere mit verschiedenfarbigen Sonden möglich (Juillerat, Gronemeyer et al. 2003).

1.3.4 Proteinbasiert: Halo-Tag

Einen analogen Ansatz zur Markierung von Proteinen mittels SNAP- oder CLIP-Tag stellt die sog. Halo-Tag-Strategie dar, bei der ebenfalls eine Enzym-Substrat-Interaktion ausgenutzt wird. Es handelt sich dabei um die Wechselwirkung zwischen einer bakteriellen Haloalkan-Dehalogenase und ihrem Haloalkansubstrat (Los, Encell et al. 2008). Die Dehalogenierung basiert auf der nukleophilen Substitution des Halogenids durch eine Aspartatseitenkette im aktiven Zentrum des Enzyms, wobei ein intermediärer Enzym-Alkyl-Komplex entsteht (s. Abbildung 8) (Janssen 2004). Im Wildtypenzym hilft ein Histidin als Base bei der Hydrolyse dieses Intermediats und der damit einhergehenden Regenerierung des Enzyms (Pries, Kingma et al. 1995). Für die Halo-Tag-Markierung wurde allerdings eine Enzymvariante identifiziert, bei der das fragliche Histidin durch ein Phenylalanin substituiert wurde, wodurch die Hydrolyse des Intermediats nicht mehr gewährleistet ist und es somit zu einem kovalent gekoppelten Enzym-Alkyl-Komplex kommt (Pries, Kingma et al. 1995, Los, Encell et al. 2008). Auch in diesem Fall konnte die erfolgreiche Fluoreszenzmarkierung von Halo-Tag-Fusionen

mit Zielproteinen, wie z.B. p65 oder I κ B, in Kombination mit Haloalkan-Fluorophor-Konjugaten *in vivo* demonstriert werden (Los, Encell et al. 2008).

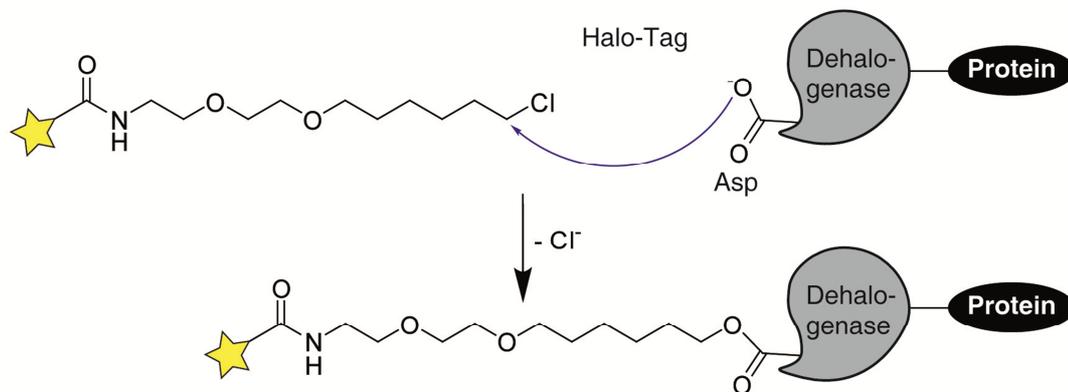


Abbildung 8: Die bakterielle Haloalkan-Dehalogenase dehalogeniert über einen Aspartatrest sein Haloalkansubstrat und bildet dabei einen intermediären Komplex. Wenn dieses Intermediat durch die Substitution eines essentiellen Histidins stabilisiert wird, eignet sich dieses System als Proteinmarkierungsmethode. Dazu wird die Dehalogenase rekombinant an das Zielprotein fusioniert und reagiert für die Markierung mit einem Haloalkan-Sonden-Konjugat, sodass das Zielprotein mit der gewünschten Sonde markiert wird. Abbildung modifiziert übernommen aus (Los und Wood 2007).

Die proteinbasierten Markierungsmethoden sind unkomplizierte Strategien für die spezifische Modifizierung von Proteinen (Jing und Cornish 2011). Da sie auf der Verwendung eines vollständigen Protein-Tags basieren, sind sie im Vergleich zu anderen Methoden (wie z.B. FIAsh) sehr spezifisch (Johnsson und Johnsson 2003).

Auch die Synthese der organischen Moleküle als Konjugate mit einer Sonde wird in allen Fällen als unproblematisch beschrieben. Einige dieser Konjugate sind sogar kommerziell erhältlich (Los, Encell et al. 2008). Ein Nachteil ist aber weiterhin die Größe des angefügten Protein-Tags, der mit 20-30 kDa in einigen Fällen die Größe des Zielproteins übersteigt und somit ein sterischer Einfluss nicht auszuschließen ist (Hinner und Johnsson 2010). Dahingehend haben peptidbasierte Markierungsmethoden einen entscheidenden Vorteil.

1.4 Biosynthetische Markierungsmethoden: *Amber Codon Suppression*

Die Untersuchung von Proteinen *in vitro* erfordert häufig ihre heterologe Expression in einem geeigneten Organismus und ihre Isolierung aus diesem. Hierfür besonders geeignet ist in den meisten Fällen das Darmbakterium *Escherichia coli*, da sich viele humane Proteine problemlos auch in großem Maßstab in diesem exprimieren und reinigen lassen (Huang, Lin et al. 2012). Ein Nachteil ist allerdings, dass *E. coli* nicht in der Lage ist, die produzierten Proteine ihrem natürlichen Herkunftsorganismus entsprechend posttranslational zu modifizieren, sodass die aus *E. coli* isolierten Proteine nicht immer in ihrem funktionalen Zustand vorliegen (Wals und Ovaas 2014). Beispiele hierfür sind die Phosphorylierung von Rezeptor-Tyrosin-Kinasen oder die Glykosylierung von Membranproteinen. Um diese Problematik zu umgehen, wurde die *Amber Codon Suppression* Technologie zur Einführung unnatürlicher

bzw. modifizierter Aminosäuren in Proteine entwickelt (Anthony-Cahill, Griffith et al. 1989, Noren, Anthony-Cahill et al. 1989). Bei dieser Methode wird das Amber Stoppcodon UAG, das den Abbruch der Translation bei der Proteinbiosynthese auslöst, zu einem Codon umfunktioniert, das für eine unnatürliche Aminosäure codiert und so deren Einbau in die wachsende Polypeptidkette ermöglicht (s. Abbildung 9) (Cropp und Schultz 2004).

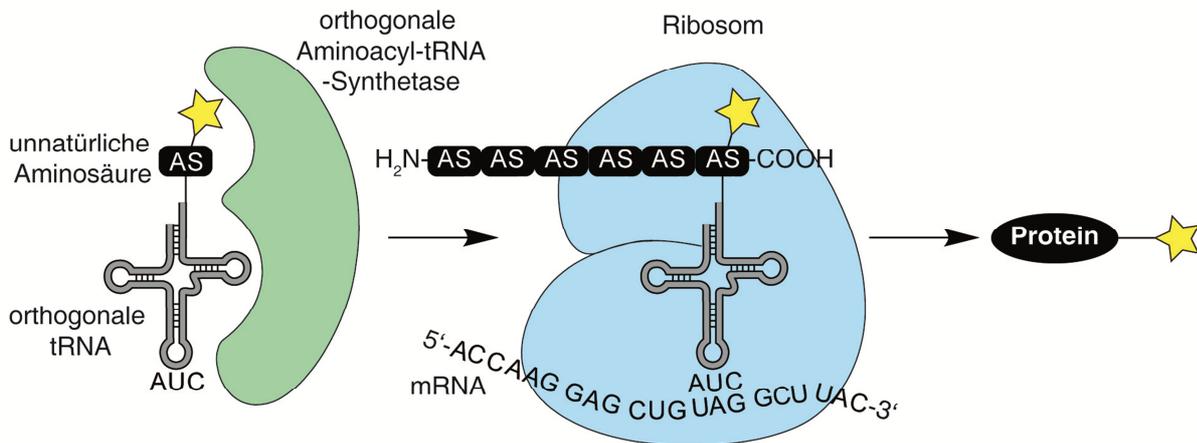


Abbildung 9: Die *Amber Codon Suppression* Technologie nutzt den Prozess der Proteinbiosynthese aus, um funktionalisierte unnatürliche Aminosäuren in Proteine einzubauen. Dazu werden orthogonale Aminoacyl-tRNA-Synthetasen evolviert, die orthogonale tRNAs mit der unnatürlichen Aminosäure verknüpfen können. Die orthogonale tRNA trägt zudem das Anticodon des Amber Stoppcodons, das somit von einem Stoppcodon, das normalerweise die Translation abbricht, zu einem funktionalen Codon umgewidmet wird. Die unnatürliche Aminosäure wird vom Ribosom dann an die wachsende Polypeptidkette angefügt, sobald das Amber Stoppcodon auf der mRNA abgelesen wird. Als Produkt entsteht ein Protein, das an einer bestimmten Stelle eine funktionelle Gruppe trägt, die dann weiter mit einer funktionalisierten Sonde verknüpft werden kann. Abbildung modifiziert übernommen aus (Wals und Ovaa 2014).

Die unnatürliche Aminosäure (z.B. phosphoryliertes Serin) muss dafür synthetisch hergestellt werden und mit einer tRNA konjugiert werden, die das entsprechende Anticodon trägt (Chin, Cropp et al. 2003). Für die Konjugation ist eine orthogonale Aminoacyl-tRNA-Synthetase notwendig, die durch gerichtete Evolution endogener Synthetasen bereitgestellt werden kann (Normanly, Kleina et al. 1990). Wird der Expressionsstamm neben der Geninformation für das Zielprotein zusätzlich genetisch mit der orthogonalen Aminoacyl-tRNA-Synthetase und der erforderlichen tRNA ausgestattet und mit Medium versorgt, das mit der unnatürlichen Aminosäure supplementiert wurde, so ist *E. coli* in der Lage die unnatürliche Aminosäure in das Zielprotein einzubauen (Liu, Magliery et al. 1997). Mit dieser Methode kann eine Vielzahl von unnatürlichen Aminosäuren, wie z.B. Phosphoserin eingebaut werden, die das Protein in den Zustand der posttranslationalen Modifikation versetzen (Wals und Ovaa 2014). Aber es können auch funktionelle Gruppen eingefügt werden, die die chemische Reaktion mit funktionalisierten Markierungsmolekülen erlauben. Beispiele hierfür sind Phenylalaninderivate wie *p*-Azidophenylalanin oder *p*-Propargyloxyphenylalanin, die in Kupfer(I)-katalysierten [2+3]-Cycladditionen mit entsprechend alkin- bzw. azidfunktionalisierten Sonden selektiv gekoppelt werden können (Cropp und Schultz 2004).

1.5 Enzymatische Markierungsmethoden

Als enzymatische Proteinmarkierungen werden in diesem Kapitel Reaktionen bezeichnet, bei denen eine Sonde durch die katalytische Aktivität eines Enzyms auf ein Protein übertragen wird. Die Erkennung des Zielproteins durch das Enzym beruht dabei auf bestimmten sequenziellen oder strukturellen Merkmalen, mit denen das Protein rekombinant ausgestattet werden kann (Wombacher und Cornish 2011). Enzyme, die als molekulare Werkzeuge für die Modifizierung von Proteinen bereits etabliert wurden, gehören fast ausschließlich zur Enzymklasse der Transferasen und sind in ihrer physiologischen Funktion für die posttranslationale Modifikation ihrer individuellen Zielproteine verantwortlich (Walsh, Garneau-Tsodikova et al. 2005, Rashidian, Dozier et al. 2013). Diese Eigenschaft wird für Proteinmarkierungstechnologien ausgenutzt, indem das zu markierende Protein mit dem Zielprotein des Enzyms oder einem Teil davon fusioniert und mit einer Sonde konjugiert wird, die an das organische Cosubstrat des Enzyms gekoppelt ist (Rashidian, Dozier et al. 2013). Enzymatisch katalysierte Reaktionen eignen sich besonders gut als Basis für die Entwicklung neuer Proteinmarkierungsmethoden, da sie im Allgemeinen sehr schnell, effizient und selektiv sind und außerdem eine ortsspezifische Modifizierung des Zielproteins ermöglichen (Sunbul und Yin 2009, Lang und Chin 2014). Einige Beispiele bereits existierender enzymatischer Markierungssysteme werden daher in den folgenden Kapiteln vorgestellt.

1.5.1 Ppant-Transferase

Phosphopantetheinyl-(Ppant)-Transferasen (PPTasen) sind Enzyme, die Peptid- oder Acylträgerproteine (*peptide carrier protein*, PCP oder *acyl carrier protein*, ACP), die Domänen von nicht-ribosomalen Peptidsynthetasen, Fettsäuresynthetasen oder Polyketidsynthetasen darstellen, durch die posttranslationale Modifikation mit Ppant aktivieren (Lambalot, Gehring et al. 1996, Walsh, Gehring et al. 1997). Das Ppant wird dabei von dem Cosubstrat Coenzym A (CoA) auf eine Serinseitenkette des PCPs oder ACPs übertragen, wodurch ein neuer Phosphodiester gebildet und 3'-phospho-AMP freigesetzt wird (La Clair, Foley et al. 2004). PCPs und ACPs sind mit etwa 80-120 Aminosäuren relativ kleine Proteine und eignen sich daher gut als Fusionstags für die Markierung von Proteinen (Yin, Straight et al. 2005). Walsh und Mitarbeiter konnten zeigen, dass die Ppantylisierung von Modellproteinen wie GFP, GST und MBP als Fusionskonstrukte mit N-terminalem PCP durch die PPTase Sfp aus *Bacillus subtilis* *in vitro* und in Zellysaten möglich ist (Yin, Liu et al. 2004). Durch die Kopplung von Biotin an die Sulfhydrylgruppe von CoA über Thioether-, -ester oder Disulfide konnten sie außerdem die Markierung dieser PCP-Fusionsproteine mit einer Sonde erzielen und die Toleranz der PPTase für derivatisierte CoA-Substrate feststellen (La Clair, Foley et al. 2004, Yin, Liu et al. 2004, Yin, Straight et al. 2005). Andere Ppant-gekoppelte Sonden wie z.B. Fluorophore, Affinitätsanker oder Monosaccharide wurden im Folgenden von der Gruppe um Burkart erfolgreich für die Markierung von PCP-Fusionsproteinen getestet (La Clair, Foley et al. 2004). Da

die *Carrier*-Proteine mit einer Länge von rund 100 Aminosäuren im Vergleich zu GFP (~240 Aminosäuren) zwar relativ klein, aber im Vergleich zum Tetracysteinmotiv (6 Aminosäuren) der FIAsh-Technologie immer noch relativ groß sind, wurden mit Hilfe von *Phage Display* kurze Peptide gesucht, die als Substrate für die Sfp-Ppantylierung akzeptiert werden (Tsien 1998, Adams, Campbell et al. 2002, Yin, Straight et al. 2005). Dabei wurde das 11mer-Peptid DSLEFIASKLA aus dem *B. subtilis* ybbR-Protein als das kürzeste Peptidsubstrat der Sfp-PPTase identifiziert (s. Abbildung 10) (Yin, Straight et al. 2005). Es wurde zudem festgestellt, dass die C-terminal auf das adressierte Serin folgende Sequenz im Gegensatz zu den N-terminalen Aminosäuren eine große Rolle bei der Erkennung durch die PPTase spielt (Yin, Straight et al. 2005). Die Eignung dieser kurzen Peptidsequenz für die Umwandlung von Modellproteinen in Sfp-PPTase-Substrate wurde nachgewiesen, indem GFP, GST sowie MBP jeweils C- oder N-terminal mit der Sequenz ausgestattet wurden und mit Biotin-CoA eine erfolgreiche Modifizierung erzielt werden konnte (Yin, Straight et al. 2005). Bei der Einfügung einer verlängerten Erkennungssequenz (GGGTVLDSLEFIASKLAGGG) in interne Schleifenregionen der Modellproteine konnte ebenfalls eine erfolgreiche Biotinylierung detektiert werden (Yin, Straight et al. 2005). Zudem wurde kürzlich eine ACP-Hydrolase aus *Pseudomonas aeruginosa* (PaACPH) identifiziert, die sowohl die derivatisierte als auch die unveränderte Ppant-Gruppe vom ACP oder PCP wieder abspalten kann (Rothmann, Kosa et al. 2014). Allerdings erkennt diese Hydrolase nicht das modifizierte 11mer-Peptid und zwar weder als Fusion an einem Modellprotein noch das reine Peptid (Kosa, Haushalter et al. 2012). Hierfür wurde die aus dem nahe verwandten Bakterium *Pseudomonas fluorescens* stammende ACP-Hydrolase PfACPH identifiziert, die Ppant und Derivate sowohl vom Peptid als auch von Peptid-Protein-Fusionskonstrukten abspalten kann (Kosa et al. 2014).

Die Ppantylierung ist eine sehr spezifische und katalytisch effiziente enzymatische Markierungsmethode und kann aufgrund der Toleranz der PPTase gegenüber diversen CoA-Derivaten für verschiedene Anwendungen, wie z.B. die Fluoreszenzmarkierung oder Immobilisierung von Proteinen, eingesetzt werden (George, Pick et al. 2004, Wong, Thirlway et al. 2008, Rashidian, Dozier et al. 2013). Diese Methode hat für *in vivo*-Applikationen allerdings den Nachteil, dass CoA aufgrund der negativ geladenen Phosphatgruppen nicht ohne Weiteres zellpermeabel ist. Burkart et al. haben daher eine Strategie entwickelt, mit der die gewünschten CoA-Derivate in Zellen verfügbar gemacht werden können. Dazu werden intrazelluläre Prozesse der CoA-Biosynthese ausgenutzt, die ein zellpermeables Pantetheinanalogue im ersten Schritt phosphorylieren, dann an AMP koppeln und schließlich das AMP an der 3'-Position phosphorylieren, sodass ein funktionelles CoA-Analog entsteht, mit dem Proteinsubstrate markiert werden können (Clarke, Mercer et al. 2005).

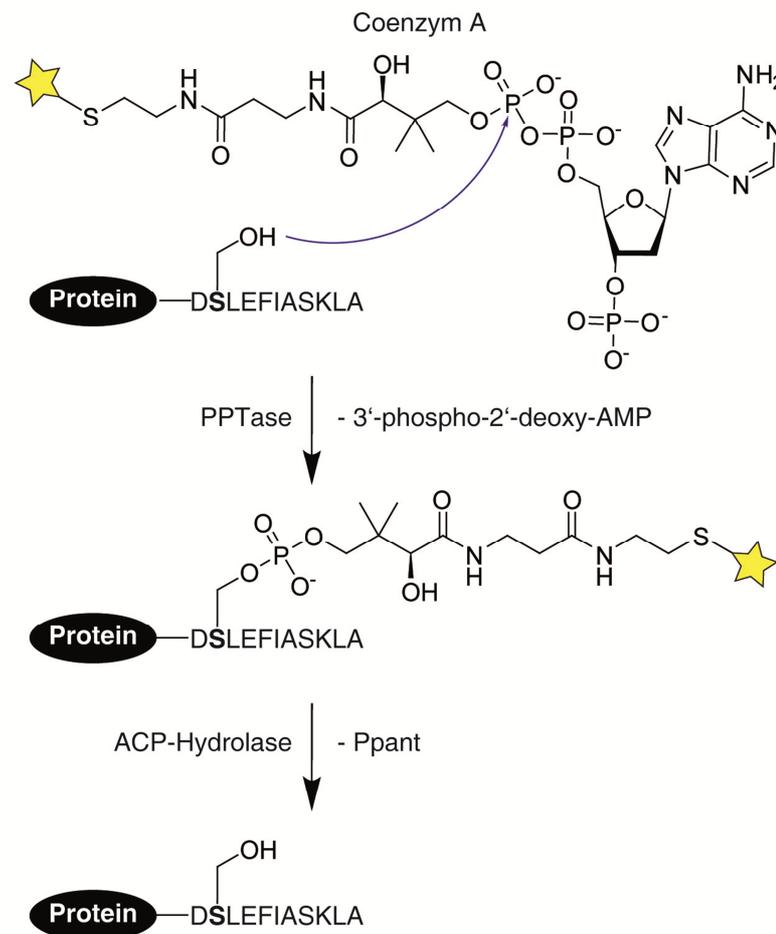


Abbildung 10: Die Phosphopantetheinylierung als Proteinmarkierungsmethode beruht auf der Übertragung einer Ppant-Gruppe, die mit einer Sonde konjugiert ist, auf das Zielprotein. Dieses ist mit dem elf Aminosäuren umfassenden Erkennungsmotiv der PPTase ausgestattet, das das modifizierbare Serin trägt. Als Cosubstrat dient Coenzym A. Die Reaktion ist reversibel, wenn die Acyl-Carrier-Protein (ACP)-Hydrolase appliziert wird. Abbildung modifiziert übernommen aus (George, Pick et al. 2004).

Die Funktionsfähigkeit dieses Systems haben Burkart et al. demonstriert, indem sie *E. coli* mit den Enzymen für den biosynthetischen Pfad sowie mit der PPTase Sfp und dem Acylträgerprotein VibB aus *Vibriobacter cholerae* als Substrat ausgestattet haben. Die Verabreichung eines fluoreszenten Pantetheinvorläufermoleküls führte tatsächlich zur Markierung von VibB, das im Lysat über die Fluoreszenz des Pantetheinkonjugats nachgewiesen werden konnte (Clarke, Mercer et al. 2005).

1.5.2 Sortase

Eine weitere enzymatische Methode zur Proteinmarkierung stellt die Verwendung des Enzyms Sortase dar, was auch als *Sortagging* bezeichnet wird (Popp, Antos et al. 2007). Sortasen erfüllen in ihrer natürlichen Funktion die Aufgabe von Transpeptidasen, indem sie den C-Terminus eines Peptids mit dem N-Terminus eines zweiten Peptids verknüpfen (Schmohl und Schwarzer 2014). Dazu muss das N-terminale Peptid lediglich mit der Sortase-

Erkennungssequenz LPxTG ausgestattet sein und das C-terminale Peptid an seinem N-Terminus mindestens ein Glycin tragen (s. Abbildung 11) (Kruger, Otvos et al. 2004).

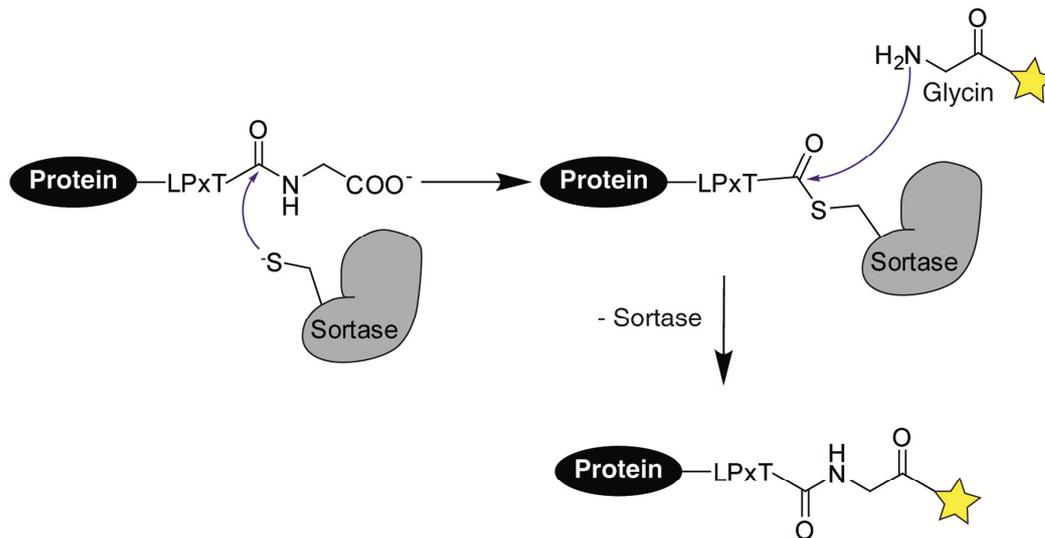


Abbildung 11: Die Sortase greift mit einem Cystein-Thiol an der Peptidbindung zwischen Threonin und Glycin der Erkennungssequenz LPxTG an und bildet mit dem N-terminalen Teil einen intermediären Thioester. Durch Angriff eines N-terminalen Glycins an diesen Thioester entsteht eine native Peptidbindung. Durch Anbringung des LPxTG-Motivs an ein Protein und Kopplung einer Sonde an den C-Terminus eines Glycins lassen sich die beiden Moleküle mit Hilfe der Sortase ligieren. Abbildung modifiziert übernommen aus (Schmohl und Schwarzer 2014).

Die Sortase nutzt das Thiol eines Cysteins in ihrem aktiven Zentrum, um die Peptidbindung zwischen dem Threonin und dem Glycin in dem Erkennungsmotiv durch nukleophilen Angriff zu spalten und einen Thioester auszubilden (Schmohl und Schwarzer 2014). Der C-Terminus wird dabei zusammen mit dem Glycin aus der Erkennungssequenz freigesetzt. Der Thioester kann im Anschluss von dem freien N-Terminus des C-terminalen Peptids angegriffen und eine neue Peptidbindung gebildet werden (Clancy, Melvin et al. 2010).

Viele Pathogene nutzen Sortasen, um ihre oberflächlichen Peptidoglykane mit Peptiden der Wirtszelle zu dekorieren, um somit unentdeckt von Abwehrmechanismen die Zelle infizieren zu können (Mazmanian, Ton-That et al. 2001). Ein Beispiel hierfür ist die Sortase SrtA aus *Staphylococcus aureus* (Spirig, Weiner et al. 2011). Diese Sortase hat sich als am besten geeignet für den Einsatz als molekulares Werkzeug bei der Katalyse von Ligationsreaktionen erwiesen, da sie sich im Gegensatz zu vielen anderen Sortasen gut ohne die N-terminale Membranankerdomäne heterolog in *E. coli* exprimieren lässt (Ton-That, Liu et al. 1999). Von Pollok und Mitarbeitern wurde SrtA zum ersten Mal für Protein-Peptid und Protein-Protein-Ligationen getestet. Dazu wurde GFP C-terminal mit der Erkennungssequenz und einem Hexahistidinanker ausgestattet (GFP-LPxTG-His₆) und in Gegenwart eines Peptids oder eines 29 kDa großen Proteins (emGFP) mit jeweils N-terminalem Glycin, katalysiert durch SrtA zur Ligation gebracht (Mao, Hart et al. 2004). Seither wurde die Sortasetechnologie in vielen verschiedenen Bereichen für die Ligation von Proteinen angewendet, so z.B. zur Herstellung von Protein-Antikörper-Konjugaten, zur Herstellung cyclischer Peptide oder zur Immobilisie-

rung von Proteinen auf Oberflächen (Chan, Cross et al. 2007, Sakamoto, Sawamoto et al. 2010, Wu, Guo et al. 2011). Denn diese Markierungsmethode ist im Vergleich zu vielen anderen Ligationsmethoden äußerst unkompliziert, da das LPxTG-Motiv und ein freies Glycin am Ligationspartner ausreichen, um eine sortasekatalysierte Verknüpfung zweier Moleküle zu erreichen (Schmohl und Schwarzer 2014). Allerdings führt die Anbringung von mehreren Glycinen an den N-Terminus des Reaktionspartners zu einer Erhöhung der Reaktivität (Popp und Ploegh 2011). Nachteile sind zum Einen die Labilität des Thioesterintermediats gegenüber anderen Nukleophilen und zum Anderen die Reversibilität, denn das im ersten Schritt freigesetzte N-terminale Glycin kann wieder als Nukleophil reagieren und das Edukt rückbilden (Rashidian, Dozier et al. 2013). Daher muss der nukleophile Ligationspartner im Überschuss eingesetzt werden, um das Gleichgewicht hin zum gewünschten Produkt zu verschieben (Rashidian, Dozier et al. 2013). Da dies aber nicht immer möglich oder erwünscht ist, haben Williamson und Mitarbeiter ein LPxTG-Depsipeptid entwickelt, bei dem das Threonin und das Glycin nicht über ein Amid, sondern über einen Ester verknüpft sind, sodass das Glycin nach der Freisetzung als Alkohol vorliegt (Williamson, Fascione et al. 2012). Da die Alkohol-Gruppe weniger nukleophil ist als das Amin, ist die Reaktion mit dem freien Amin des zweiten Ligationspartners favorisiert. Dies wurde unter Beweis gestellt, indem humanes mannosebindendes Protein, ausgestattet mit dem LPxTG-Depsipeptid, mit einem fluoreszenten Ligationspartner im äquimolaren Verhältnis verknüpft werden konnte (Williamson, Fascione et al. 2012).

1.5.3 Biotinligase

Die Biotin-Holoenzym synthetase BirA aus *E. coli* ligiert das Biotincarboxylträgerprotein (*biotin carboxyl carrier protein*, BCCP) mit Biotin, das durch ATP aktiviert wird, und wird deshalb auch als Biotinligase bezeichnet (Beckett, Kovaleva et al. 1999). Biotin dient hierbei als prosthetische Gruppe für Carboxylasen, die CO₂ aus Kohlensäure mit Hilfe von ATP auf das BCCP-gebundene Biotin übertragen, welches dann für die Bildung von Malonyl-CoA durch Transcarboxylasen verwendet wird (Knowles 1989). In einem ersten Schritt wird dabei Biotin durch ATP aktiviert, indem ein gemischtes Anhydrid aus der Carboxylgruppe des Biotins und dem α -Phosphat von ATP gebildet wird, wobei Pyrophosphat abgespalten wird. An der aktivierten Carboxylgruppe des Biotins kann dann die ϵ -Aminogruppe eines Lysins von BCCP, katalysiert durch BirA, angreifen, sodass das Biotin unter Ausbildung einer Amidbindung auf BCCP übertragen wird (Lane, Rominger et al. 1964, Lane, Young et al. 1964, Knowles 1989). Beckett und Mitarbeiter haben über kombinatorische Methoden verschiedene zufällige Peptidsequenzen identifiziert, die ebenfalls von BirA als Substrate für die Biotinylierung akzeptiert werden. Das kürzeste und aktivste Peptid ist jenes mit der Sequenz GLNDIFEAQKI-EWHE, das sowohl als N-terminale Fusion an MBP als auch allein erfolgreich für die Ligationsreaktion getestet wurde (Beckett, Kovaleva et al. 1999). Für diese Proteinmarkierungs-

strategie bedarf es also lediglich einer rekombinanten Fusion des Zielproteins mit einer 15 Aminosäuren langen Peptidsequenz, die das adressierte Lysin enthält (s. Abbildung 12) (Beckett, Kovaleva et al. 1999).

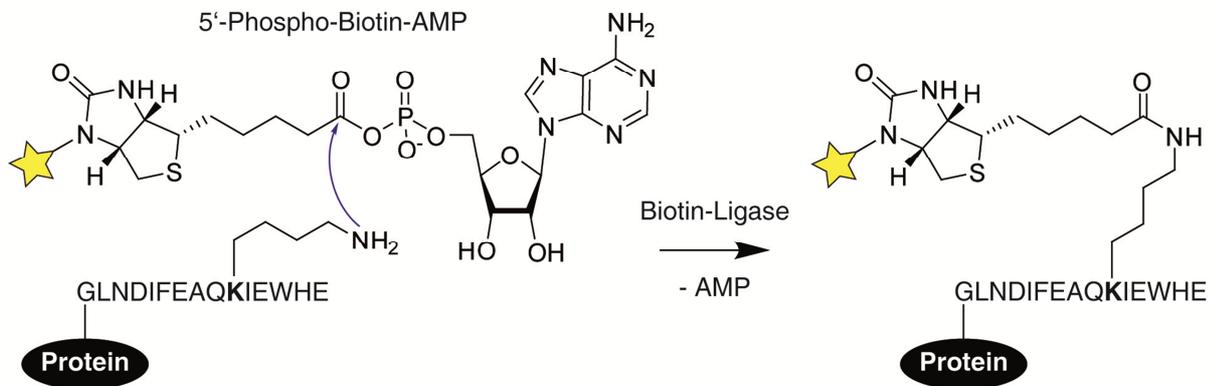


Abbildung 12: Die Biotinligase erkennt Lysin in einem 15mer-Peptid und katalysiert den Transfer von Biotin ausgehend von Biotin-5'-AMP auf dieses. Dabei wird ein Amid zwischen dem ε-Amin des Lysins und der zuvor durch ATP aktivierten Carboxylgruppe des Biotins gebildet. Durch rekombinante Ausstattung des Zielproteins mit dem Erkennungsmotiv kann das Protein mit Biotin markiert werden oder aber mit anderen Sonden, die mit Biotin verknüpft sind. Abbildung modifiziert nach (Beckett, Kovaleva et al. 1999).

Diese enzymatisch katalysierte Ligationsreaktion wurde bereits für die Markierung von Proteinen mit Biotin zur anschließenden Interaktion mit Avidin bzw. Streptavidin ausgenutzt (Chen, Howarth et al. 2005, Howarth, Takao et al. 2005, Algar, Prasuhn et al. 2011). Zum Beispiel hat die Gruppe um Alice Ting ein fluoreszierendes Protein (*Cyan fluorescent protein*, CFP), das über eine fusionierte Transmembrandomäne in der Zellmembran von HeLa-Zellen lokalisiert wird, zusätzlich rekombinant mit der BirA-Erkennungssequenz ausgestattet und somit die Zellmembran über die Biotinligase katalysierte Reaktion mit einem streptavidinkonjugierten Alexa-Fluorophor oder Quantum Dots markiert (Howarth, Takao et al. 2005). Aber auch die biotinligaseabhängige Modifizierung von Proteinen mit anderen Reportermolekülen, die zuvor mit Biotin konjugiert wurden, konnte gezeigt werden (Rashidian, Dozier et al. 2013). Ebenfalls die Ting-Gruppe hat Biotinderivate mit Propargyl oder Azid als funktioneller Gruppe identifiziert, die von einer Biotinligase aus *Saccharomyces cerevisiae* bzw. *Pyrococcus horikoshii* auf das humane Biotinrezeptorprotein p67 übertragen werden und anschließend mittels Azid-Alkin-Cycloaddition bzw. Staudinger Ligation weiter modifiziert werden können (Slavoff, Chen et al. 2008).

Neben den in den vorangegangenen Kapiteln beschriebenen Methoden zur enzymatischen Markierung von Proteinen existiert eine Vielzahl weiterer Technologien, die auf enzymatischen PTMs basieren. Beispiele für derartige enzymatische Werkzeuge sind die Transglutaminase, die Farnesyl- und N-Myristoyltransferase, das formylglycinegenerierende Enzym, die O-GlcNAc-Transferase sowie die Liponsäureligase, die alle bereits für Modifizierungsstrategien etabliert wurden und in den Übersichtsartikeln von Rashidian et al. und Sunbul

und Yin ausführlich beschrieben werden (Sunbul und Yin 2009, Rashidian, Dozier et al. 2013).

1.6 Eine neue enzymatische Markierungsmethode

In den vorangegangenen Kapiteln wurden zahlreiche bereits existierende Markierungsmethoden beschrieben, die bereits für die verschiedensten Fragestellungen der Biologie, Biochemie und Medizin ausgenutzt werden. Viele dieser Methoden haben allerdings für manche Anwendungen schwerwiegende Nachteile oder sind nur für sehr spezielle Problemstellungen einsetzbar. Chemische Markierungsmethoden, wie z.B. die Diels-Alder oder Staudinger Ligation, haben den generellen Nachteil, dass sie unter physiologischen Bedingungen im Vergleich zu enzymatischen Reaktionen sehr viel langsamer ablaufen (Lang und Chin 2014). Viele der Markierungsmethoden, die die Fusionierung des Zielproteins mit einem anderen Protein erfordern, wie z.B. die SNAP-Tag-Technologie oder die DHFR-basierte Markierung, sind für die Modifizierung mancher Proteine nicht geeignet, da das fusionierte Protein im Vergleich zu kurzen Peptidsequenzen groß ist und somit das Verhalten des Zielproteins hinsichtlich Faltung, Aktivität und zellulärer Lokalisation beeinflussen kann (Jing und Cornish 2011). Die *Amber Codon Suppression*-Methode als Beispiel für eine biosynthetische Strategie zur Proteinmodifizierung ist bezüglich ihrer Durchführung verhältnismäßig anspruchsvoll im Vergleich zu enzymatischen Methoden, da für jede unnatürliche Aminosäure zunächst Prozesse der Proteinbiosynthese individuell manipuliert werden müssen. So haben sich enzymatische Proteinmarkierungsmethoden in den letzten Jahren als vielversprechende Alternativen zu den genannten Technologien entwickelt, da sie generell durch die unkomplizierte rekombinante Ausstattung mit einer kurzen Peptidsequenz das Zielprotein empfänglich machen für eine hochspezifische sowie schnelle und katalytisch effiziente Markierung durch ein optimiertes Enzym. Auch die Flexibilität und Modularität von enzymatischen Methoden im Hinblick auf die Verknüpfung des Substrats mit verschiedenen Sonden, machen sie zu attraktiven, universell anwendbaren Techniken.

Aber auch die existierenden enzymbasierten Modifizierungsmethoden weisen noch Optimierungspotenzial auf. Einige der beschriebenen Methoden, wie z.B. die Ppant- oder Biotinligase-basierten Markierungen, erfordern die Anbringung von 11-15 Aminosäuren als Erkennungsmotiv. Dahingehend ist es wünschenswert, enzymatische Methoden zu identifizieren, für die noch kürzere Sequenzen genügen, da die Anforderung an eine optimale Proteinmarkierungsmethode immer auch darin besteht, Zielproteine so gering wie möglich bezüglich ihrer Sequenz und Struktur zu verändern. Auch im Hinblick auf die Größe der mit der Sonde transferierten Gruppe sind beispielsweise Ppant oder Biotin verhältnismäßig lang bzw. groß, sodass die Markierung am Zielprotein insgesamt relativ groß ausfallen kann und sterische Effekte nicht immer auszuschließen sind.

Alle diese Gründe geben Anlass dazu, eine neue enzymatische Methode zur Proteinmarkierung zu konzipieren und zu etablieren, bei der die erforderlichen Veränderungen am Zielprotein minimal sind und die Sonde zusammen mit einer kleineren Gruppe übertragbar ist. Als Basis für eine derartige Markierungsmethode eignet sich das Enzymepaar AnkX und Lem3 aus dem pathogenen Organismus *Legionella pneumophila*, das analog zur PPTase oder Biotinligase die posttranslationale Modifizierung ihres natürlichen Zielproteins Rab1b mit einer Phosphocholin-gruppe katalysiert (Mukherjee, Liu et al. 2011). Bei der AnkX/Lem3-basierten Markierungsmethode könnten Proteine durch rekombinante Ausstattung mit der kurzen Erkennungssequenz TITSSYYR von AnkX/Lem3 aus Rab1b in Substrate dieser beiden Enzyme umgewandelt werden, wobei es prinzipiell möglich wäre, das Peptid sowohl an die Termini als auch in interne Schleifenregionen einzufügen (s. Abbildung 13).

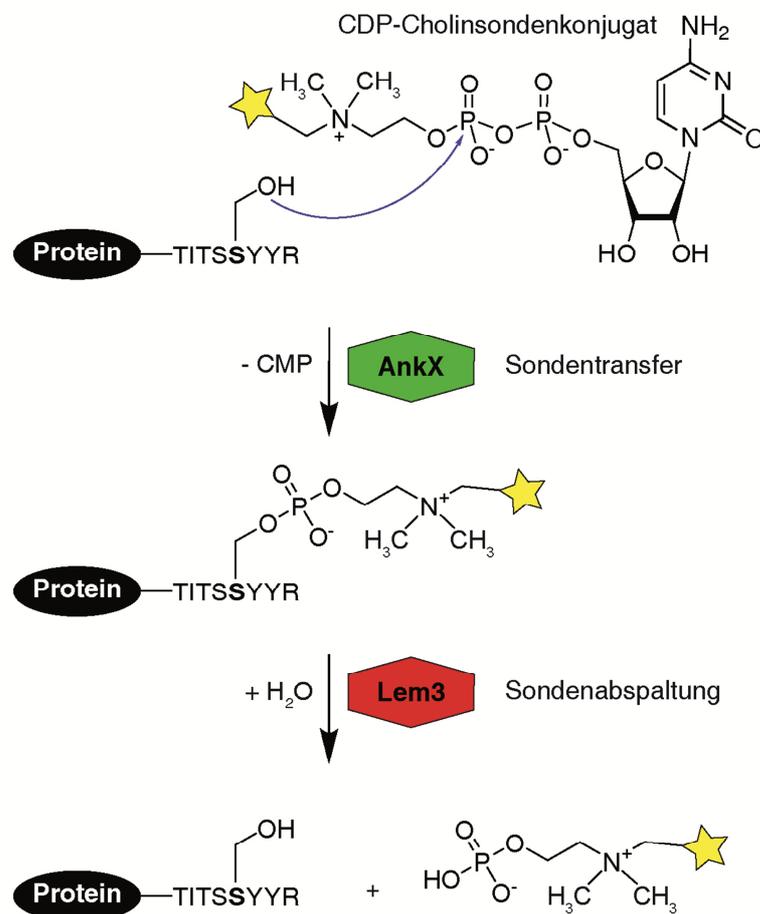


Abbildung 13: Enzymatische Phosphocholinierung als molekulares Werkzeug für die Markierung von Proteinen. Proteine werden rekombinant mit der Erkennungssequenz TITSSYYR von AnkX/Lem3 ausgestattet, in der ein Serin als Ankerpunkt für die Modifikation dient. CDP-Cholin wird synthetisch mit einer Sonde, z.B. einem Fluorophor, verknüpft und dient als Cosubstrat für die Modifizierung. AnkX katalysiert die Übertragung der Phosphocholin-Gruppe mitsamt der Sonde und Lem3 kann sie wieder katalytisch abspalten. Abbildung modifiziert übernommen aus (Heller, Ochtrop et al. 2015).

Das Cosubstrat Cytidin-5'-diphosphat-(CDP)-Cholin könnte am Cholin chemisch mit einer beliebigen Sonde (z.B. einem Fluorophor oder einer funktionellen Gruppe) verknüpft werden,

die dann mitsamt des Phosphocholins (PC) durch AnkX-Katalyse auf das Zielprotein übertragen werden würde, sodass das Produkt dieser enzymatischen Reaktion ein markiertes Zielprotein wäre. Das markierte Zielprotein könnte, katalysiert durch Lem3, wieder in seinen ursprünglichen, unmarkierten Zustand zurückversetzt und somit die Reversibilität der Markierung gewährleistet werden. Somit könnte eine Proteinmarkierungsmethode geschaffen werden, die das Potenzial hätte, viele Anforderungen einer optimalen Modifizierungsstrategie zu erfüllen. Die Methode weist aufgrund der genetischen Codierung der Erkennungssequenz eine hohe Spezifität für das Octapeptid im Gegensatz zu Sequenzen anderer Proteine auf. Außerdem wird die Phosphocholingruppe ausschließlich auf die Hydroxylfunktion eines Serins innerhalb der Sequenz TITSSYYR übertragen, sodass die Reaktion regioselektiv und ortsspezifisch abläuft.

Die mit der Sonde übertragene Gruppe (PC) ist mit einer Masse von 166 Da und einer Länge von ca. 9 Å sterisch wenig anspruchsvoll und nur etwa halb so groß wie beispielsweise Ppant (s. Abbildung 14).

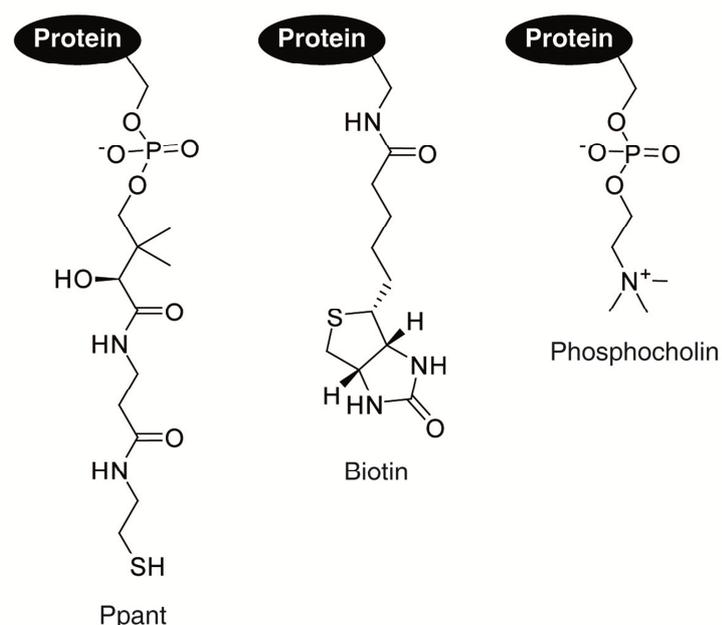


Abbildung 14: Größenvergleich der posttranslationalen Modifizierungen, die für Proteinmarkierungsstrategien ausgenutzt werden. Ppant ist mit einer Masse von 340 Da und einer Länge von ca. 20 Å das sterisch anspruchsvollste Molekül. Die Phosphocholingruppe ist mit 166 Da und ca. 9 Å nur etwa halb so groß und daher besser geeignet für die Markierung von Proteinen. Biotin liegt bezüglich seiner Masse und Länge zwischen Ppant und Phosphocholin.

Außerdem weist PC im Gegensatz zu Biotin einen wesentlich geringeren Raumanpruch auf. Zudem kann eine hohe Stabilität der Markierung angenommen werden, da bisher von keiner anderen Abspaltung als der durch Lem3 katalysierten Hydrolyse berichtet wurde (Tan, Arnold et al. 2011, Goody, Heller et al. 2012). Die Phosphocholinierung des natürlichen Substrats Rab1b läuft (unter bestimmten Bedingungen) innerhalb von etwa 10 min quantitativ ab, sodass anzunehmen ist, das AnkX andere Proteinsubstrate, die mit der Erkennungssequenz ausgestattet sind, in ähnlicher Geschwindigkeit umsetzt (Goody, Heller et al. 2012). Dies

wäre ein großer Vorteil vor allem gegenüber chemischen Markierungsmethoden, die langsamer ablaufen und sich daher insbesondere für *in vivo*-Markierungsexperimente nicht eignen (Lang und Chin 2014). Die hier vorgestellte Technologie ist potenziell orthogonal zu allen anderen beschriebenen Methoden und hat daher den Vorteil, mit jeder dieser Methoden für Mehrfachmarkierungen kombinierbar zu sein. Aber auch die relativ einfache Synthese des Cosubstratsondenkonjugats und die damit zusammenhängende Flexibilität in der Auswahl des Reportermoleküls tragen zur Variabilität dieser Markierungsstrategie bei (Heller, Ochtrup et al. 2015).

Eine weitere ausgesprochen vorteilhafte Eigenschaft dieses Systems stellt die Reversibilität der Modifizierung dar und hebt sie von vielen anderen bekannten Techniken ab. Diese Fähigkeit ist nützlich für Anwendungen, bei denen das Protein wieder von der Markierung befreit werden soll, wie z.B. bei Proteinreinigungen, bei denen ein Affinitätsanker im Anschluss abgespalten wird, um das Protein in den nativen unmodifizierten Zustand zu versetzen. Denkbar wäre diesbezüglich auch, an derselben Proteinprobe sequentiell mehrere Markierungen für unterschiedliche Zwecke anzubringen und bei Bedarf wieder abzuspalten.

Die Anwendbarkeit der AnkX/Lem3-basierten Markierungsmethode *in vivo* ist prinzipiell gegeben, da CDP-Cholin ein zellulärer Metabolit ist und somit nicht zelltoxisch ist (Fagone und Jackowski 2013). Eine Herausforderung für die Proteinmarkierung *in vivo* stellen allerdings die endogenen Rab1-Proteine dar, die neben dem künstlichen Zielprotein immer auch von AnkX adressiert werden würden. Ein Ausschalten der Rab1-Gene über siRNA o.Ä. wäre zwar prinzipiell möglich, aber würde Rab1-abhängige Prozesse in der Zelle vermutlich stark beeinflussen. Stattdessen besteht die Option, die AnkX-Erkennungssequenz abzuwandeln und das Enzym für diese zu optimieren, sodass ein Peptid-Enzym-Paar entsteht, das die bioorthogonale Modifizierung einer bestimmten Proteinspezies in einer Zelle erlaubt.

Für die Etablierung einer auf den Legionellenenzymen AnkX und Lem3 basierenden Proteinmarkierungsmethode sind einige Aspekte der enzymatischen Phosphocholinierung tiefergehend zu evaluieren. Dazu gehören

- die Optimierung der Enzyme hinsichtlich Expression und Reinigung sowie Aktivität und Stabilität
- die Optimierung der Peptid-Erkennungssequenz in Hinsicht auf die Länge und Biokompatibilität
- die Eignung von Peptid-Protein-Fusionskonstrukten als AnkX/Lem3-Substrate
- die Akzeptanz von AnkX/Lem3 für CDP-Cholin-Derivate
- und die Anwendung *in vivo*.

Diese Punkte wurden in der vorliegenden Arbeit untersucht, um die tatsächliche Eignung der reversiblen AnkX und Lem3-abhängigen Phosphocholinierung als molekulares Werkzeug für die vorgestellte Proteinmarkierungsstrategie zu analysieren.

1.7 Die Enzyme AnkX und Lem3 aus *Legionella pneumophila*

Die Enzyme AnkX und Lem3, die als enzymatische Werkzeuge für eine neue enzymbasierte Markierungsmethode umfunktioniert werden sollen, stammen aus dem Bakterium *Legionella pneumophila* (Chien, Morozova et al. 2004). Dieses Pathogen sekretiert während der Infektion über ein Dot/Icm Typ 4 Sekretionssystem (T4SS) ca. 300 Proteine ins Zytosol seiner Wirtszelle, von denen einige, wie z.B. AnkX und Lem3, an der Manipulation des intrazellulären Vesikeltransports beteiligt sind (Ninio und Roy 2007, Pan, Luhrmann et al. 2008, Heidtman, Chen et al. 2009, Ge und Shao 2011, Tan, Arnold et al. 2011). Die Umprogrammierung von vesikulären Transportwegen ist wichtig für das Bakterium, da es nach dem Eindringen in die Wirtszelle eine Vakuole, die sogenannte legionellenenthaltende Vakuole (*Legionella containing vacuole*, LCV) ausbildet, in der es sich einnistet und mit Nährstoffen für die Replikation versorgt werden muss (Horwitz 1983, Swanson und Isberg 1995). Dies erreichen Legionellen unter Anderem durch die Sekretion von Proteinen in das Wirtszellenzytosol, die die für die Regulation von vesikulären Transportprozessen zuständige Proteinfamilie der kleinen membranassoziierten Rab-GTPasen manipulieren (Derre und Isberg 2004, Kagan, Stein et al. 2004). Diese Manipulationen beruhen unter Anderem darauf, den Aktivierungszustand der auch als molekulare Schalter bezeichneten GTPasen zu Gunsten des Bakteriums zu beeinflussen. Hierfür sekretiert Legionella eigene Guaninnukleotidaustauschfaktoren (*guanine nucleotide exchange factors*, GEFs) oder GTPase-aktivierende Proteine (GAPs), die die GTPase im Fall des GEFs entweder mit Guanosin-5'-triphosphat (GTP) beladen und somit in den aktiven Zustand versetzen oder aber die Spaltung von gebundenem GTP zu Guanosin-5'-diphosphat (GDP) katalysieren und somit die GTPase inaktivieren (Stenmark und Olkkonen 2001, Heidtman, Chen et al. 2009). Bekannte Vertreter dieser beiden Enzymklassen aus *L. pneumophila* sind der GEF DrrA und das GAP LepB, die beide mit Mitgliedern der Rab1-Unterfamilie der Rab-GTPasen interagieren (Murata, Delprato et al. 2006, Ingmundson, Delprato et al. 2007, Mihai Gazdag, Steller et al. 2013). *L. pneumophila* hat aber noch einen weiteren Mechanismus entwickelt, um den Aktivierungszustand von GTPasen indirekt zu beeinflussen. Dieser beruht auf der posttranslationalen Modifikation von Rab1b-Proteinen (Michard und Doublet 2015). Hiervon sind bislang zwei bekannt: die Adenylylierung von Rab1b durch DrrA und die Phosphocholinierung durch AnkX (Muller, Peters et al. 2010, Mukherjee, Liu et al. 2011). Beide Modifikationen nehmen Einfluss auf die Interaktion von Rab1b mit GEFs und GAPs und somit auch auf den Aktivierungszustand der kleinen GTPase (Muller, Peters et al. 2010, Goody, Heller et al. 2012). Da die Phosphocholinie-

zung die Grundlage für die neue Markierungsmethode darstellt, soll diese im folgenden Kapitel näher erläutert werden.

1.7.1 Die Phosphocholinierung

Die Phosphocholinierung ist eine kovalente PTM und bezeichnet die enzymatisch katalysierte Übertragung einer PC-Gruppe auf Hydroxyfunktionen in Proteinseitenketten (s. Abbildung 15) (Mukherjee, Liu et al. 2011). Als Cofaktor dient dabei das Nukleotid CDP-Cholin, aus dem durch den nukleophilen Angriff der Hydroxyfunktion am β -Phosphat der Phosphoanhydridbindung ein neuer Phosphodiester und Cytidin-5'-monophosphat (CMP) gebildet werden (Mukherjee, Liu et al. 2011).

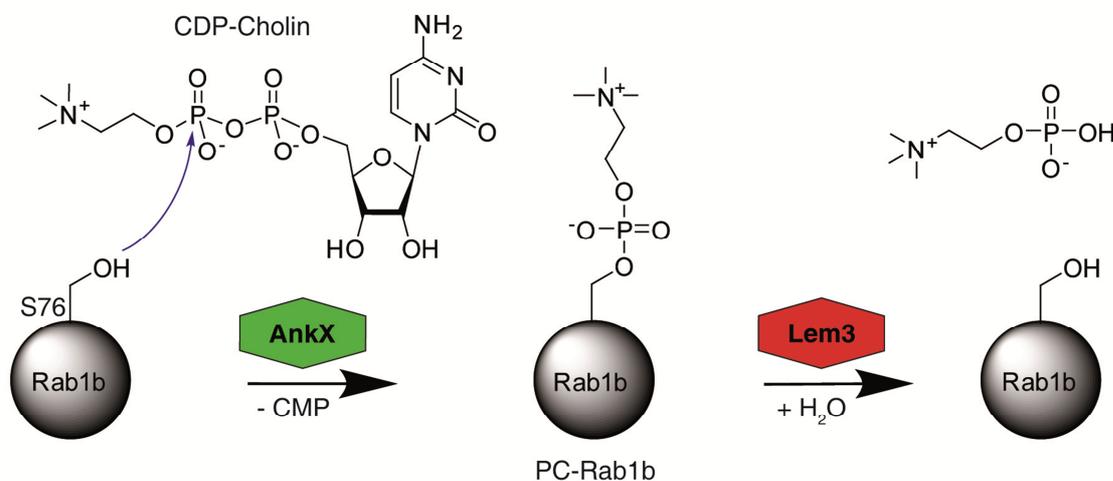


Abbildung 15: AnkX-abhängige Phosphocholinierung als posttranslationale Modifikation der humanen GTPase Rab1b. AnkX katalysiert die Übertragung einer Phosphocholin-Gruppe ausgehend von CDP-Cholin auf die Seitenkette von Serin76 des Rab1b-Proteins. Dabei entstehen ein neuer Phosphodiester zwischen der Serinseitenkette und dem Phosphocholin und CMP als Nebenprodukt. Das phosphocholinierete Rab (PC-Rab) ist wiederum ein Substrat für die Phosphocholinesterase Lem3, die die hydrolytische Spaltung des Phosphodiesters katalysiert und das Rab-Protein wieder in seine ursprüngliche Form zurückversetzt (Mukherjee, Liu et al. 2011, Tan, Arnold et al. 2011, Goody, Heller et al. 2012).

Bislang ist diese Art der PTM lediglich aus dem Infektionszyklus des Bakteriums *L. pneumophila* bekannt, bei dem das Legionellenenzym AnkX die Übertragung von Phosphocholin auf die Seitenkette eines Serins oder Threonins von Mitgliedern der Unterfamilie der kleinen GTPase Rab1 (Serin79 in Rab1a, Serin76 in Rab1b, Threonin76 in Rab1c (Rab35)) in der infizierten Wirtszelle katalysiert (Mukherjee, Liu et al. 2011, Goody, Heller et al. 2012). Die Regulation dieser PTM erfolgt durch ein weiteres Legionellenenzym, das als Gegenspieler zu AnkX fungiert: Lem3 katalysiert die hydrolytische Abspaltung der Phosphocholin-Gruppe von der GTPase, wobei das Zielprotein wieder in seinen ursprünglichen Zustand zurückversetzt wird (Tan, Arnold et al. 2011, Goody, Heller et al. 2012). Da die Phosphocholinierung von Rab1b in der für Effektorinteraktionen bedeutsamen *Switch II*-Region (Aminosäurepositionen 64-83) stattfindet, hat die Modifikation Auswirkungen auf den Aktivierungs- und den Lokalisierungszyklus von Rab1b (Overmeyer, Wilson et al. 1998, Goody, Heller et al. 2012).

So ist die Aktivierung des phosphocholinierten Rabs durch den Legionellen-GEF DrrA im Vergleich zum unmodifizierten Rab um den Faktor 8 abgeschwächt, die Aktivierung durch das GAP LepB aus *L. pneumophila* sogar um den Faktor 14 (Goody, Heller et al. 2012). Die stärksten Auswirkungen hat die Phosphocholinierung allerdings auf die Interaktion mit dem humanen GDP-Dissoziationsinhibitor (GDI), denn dieser extrahiert membranassoziertes Rab ins Zytosol, nicht aber phosphocholiniertes Rab (Goody, Heller et al. 2012, Oesterlin, Goody et al. 2012). Dies hat zur Folge, dass das Rab-Protein dauerhaft in der Membran verankert bleibt, was vesikuläre Transportprozesse der Zelle beeinträchtigt (Goody, Heller et al. 2012, Oesterlin, Goody et al. 2012). Diese Beobachtung legt die Hypothese nah, dass der Zweck dieser ungewöhnlichen PTM die Verschiebung des Gleichgewichts zwischen GDI-gebundenem und membraninsertertem Rab1b in Richtung der dauerhaften Verankerung in der Membran ist (Oesterlin, Goody et al. 2012). Die meisten Rab-Interaktionspartner (GDI, GAPs) haben mit wenigen Ausnahmen entweder eine Präferenz für das aktive, GTP-beladene oder das inaktive, GDP-beladene Rab-Protein (Hutagalung und Novick 2011, Schoebel, Cichy et al. 2011). Denn beide Aktivierungszustände unterscheiden sich deutlich in ihrer strukturellen Konformation: im GDP-gebundenen Zustand sind die als *Switch*-Regionen bezeichneten schleifenartigen Strukturen, die vorrangig an der Koordination des Nukleotids und des Magnesiumkations beteiligt sind, konformationell flexibel und ungeordnet, was sich in der fehlenden Elektronendichte dieser Bereiche in der Röntgenkristallstruktur widerspiegelt (s. Abbildung 16).

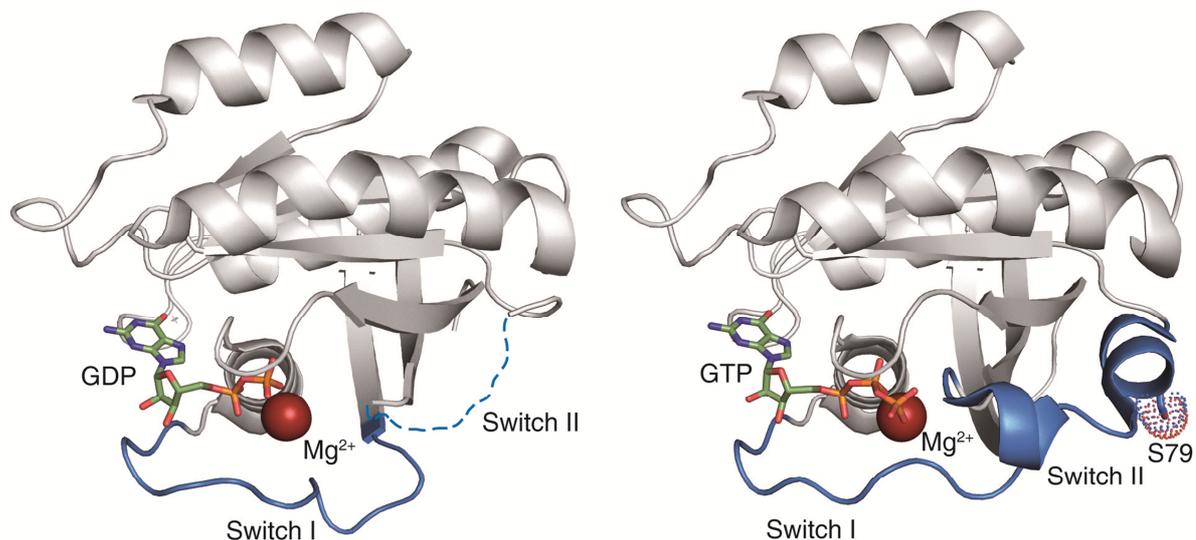


Abbildung 16: Röntgenkristallstrukturen von inaktivem, GDP-beladenem und aktivem, GTP-beladenem Rab1a (PDB-ID: 2FOL). Auf der linken Seite ist die Röntgenkristallstruktur des inaktiven Rab1a, in grau dargestellt, zu sehen. Das GDP ist zusammen mit dem Magnesiumkation (rot) in der Nukleotidbindetasche abgebildet. Diese wird zusammen mit der P-Schleife von den beiden *Switch*-Regionen ausgebildet (blau). Im GDP-beladenen Zustand sind die *Switch*-Regionen ungeordnet und flexibel, sodass im Fall von *Switch II* keine definierte Elektronendichte in der Röntgenkristallstruktur detektierbar ist. Auf der rechten Seite ist die entsprechende aktive, GTP-beladene Konformation des gleichen Proteins zu sehen. Hier bildet *Switch II* im Gegensatz zum inaktiven Rab eine geordnete helixartige Sekundärstruktur aus (Stroupe und Brunger 2000). Das Serin79 in der Kristallstruktur von Rab1a entspricht Serin76 in Rab1b.

Hingegen sind diese Regionen im aktiven, GTP-gebundenen Zustand stark geordnet, sodass in diesem Fall eine definierte Elektronendichte zu beobachten ist (Stroupe und Brunger 2000). AnkX und Lem3 stellen unter den Rab-Effektoren eine Ausnahme dar, denn beide akzeptieren die verschiedenen Proteinkonformationen und modifizieren bzw. demodifizieren sowohl aktives als auch inaktives Rab mit der gleichen katalytischen Effizienz (Goody, Heller et al. 2012). Diese Erkenntnis lässt den Schluss zu, dass AnkX und Lem3 ihr Zielprotein nicht anhand von sekundären oder tertiären Strukturmerkmalen erkennen, sondern ausschließlich die Aminosäuresequenz als Erkennungsmotiv dient (Goody, Heller et al. 2012). Dies konnte von Goody et al. bestätigt werden, indem an dem synthetischen Octapeptid TITSSYYR (Aminosäuren 72-79) aus der *Switch II*-Region von Rab1b nach Inkubation mit AnkX und CDP-Cholin ebenfalls eine Phosphocholinierung detektiert werden konnte (Goody, Heller et al. 2012). Die Modifizierbarkeit des Octapeptids aus Rab1b stellt die Grundlage für die Entwicklung der in dieser Arbeit vorgestellten neuen enzymatischen Proteinmarkierungsmethode dar.

1.7.2 Eigenschaften von AnkX

Das Legionellenprotein AnkX gehört zur Familie der FIC-(*filamentation induced by cyclic Adenosine-5'-monophosphate (cAMP)*)-Domänenproteine (Roy und Cherfils 2015). Die Mitglieder dieser Proteinfamilie verbindet größtenteils die Eigenschaft, Zielproteine zu adenylylieren, d.h. mit einem Adenosin-5'-monophosphat (AMP) an Serinen, Threoninen oder Tyrosinen zu modifizieren (Garcia-Pino, Zenkin et al. 2014). Als Cofaktor dient hierbei Adenosin-5'-triphosphat (ATP) (Yarbrough, Li et al. 2009). Beispiele für adenylylierende FIC-Proteine sind VopS aus *Vibrio parahaemolyticus*, das die GTPase Cdc42 an einem Threonin modifiziert oder IbpA aus *Histophilus somni*, welches ebenfalls Cdc42, allerdings an einem Tyrosin mit einer AMP-Gruppe versieht (Yarbrough, Li et al. 2009)(Xiao, 2010). AnkX aus *L. pneumophila* bildet unter den FIC-Proteinen eine seltene Ausnahme, denn es überträgt kein AMP, sondern eine Phosphocholingruppe von CDP-Cholin auf sein Zielprotein Rab1b (s. 1.7.1) (Mukherjee, Liu et al. 2011). AnkX bindet wie auch andere FIC-Proteine als Cosubstrat ein Nukleotid, allerdings ist dessen Orientierung in der Nukleotidbindetasche um 180° invertiert (s. Abbildung 17, CDP-Cholin in grün, AMP in blau) (Campanacci, Mukherjee et al. 2013). Das hat zur Folge, dass der nukleophile Angriff nicht am α -Phosphat stattfindet und ein Nucleosidmonophosphat auf das Zielprotein übertragen wird, sondern dass stattdessen das β -Phosphat als elektrophiles Angriffsziel dient und folglich das Phosphocholin und nicht das Nukleotid transferiert wird.

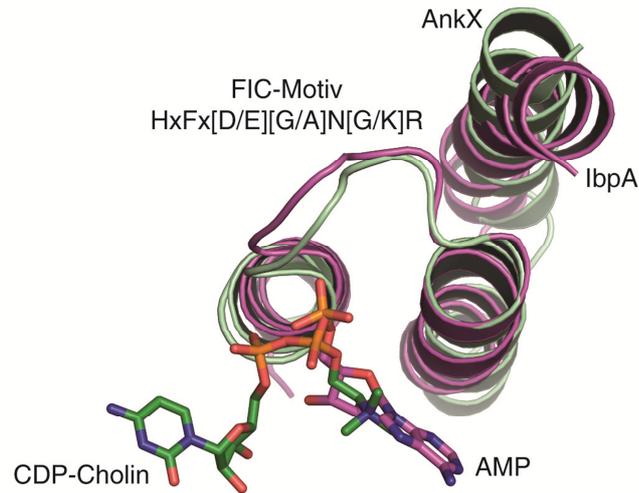


Abbildung 17: Ausschnitt der Überlagerung der Kristallstrukturen von AnkX H229A mit gebundenem CDP-Cholin in grün (PDB-ID: 4BET) (Campanacci, Mukherjee et al. 2013) und von IbpA H3717A im Komplex mit adenylyliertem Cdc42 in magenta (PDB-ID: 4ITR) (Xiao, Worby et al. 2010). Abgebildet sind jeweils die drei α -Helices, die das strukturelle Kernmotiv von FIC-Proteinen ausmachen. Obwohl diese zentralen Helices beider Proteine eine große strukturelle Übereinstimmung aufweisen, wird das Nukleotidsubstrat in umgekehrter Orientierung koordiniert, sodass das β -Phosphat von CDP-Cholin mit dem α -Phosphat von AMP und die Cholin-Gruppe mit dem Adenosin überlagern.

Insofern ist AnkX ein atypisches FIC-Protein (Campanacci, Mukherjee et al. 2013). Dennoch weist das Legionellenprotein viele Ähnlichkeiten mit typischen adenylylierenden FIC-Proteinen auf: AnkX besitzt eine N-terminale FIC-Domäne, die gekennzeichnet ist durch drei strukturell konservierte α -Helices, die parallel zueinander angeordnet sind (Aminosäurepositionen 189-251, s. Abbildung 17 und Abbildung 18A/B, in grün dargestellt) (Kinch, Yarbrough et al. 2009, Campanacci, Mukherjee et al. 2013). Dies ist das strukturelle Kernmotiv von FIC-Proteinen, das ausnahmslos in allen Vertretern vorkommt (Kinch, Yarbrough et al. 2009). Zwei dieser Helices sind über eine Schleife miteinander verbunden, die das konservierte katalytische Motiv HxFx[D/E][G/A]N[G/K]R beinhaltet (s. Abbildung 18A/B, in rot dargestellt) (Campanacci, Mukherjee et al. 2013, Garcia-Pino, Zenkin et al. 2014). Im Fall von AnkX lautet dieses Motiv HPFRDANGR (Roy und Mukherjee 2009). Das Histidin innerhalb dieses Motivs (H229) ist die für die Katalyse der Phosphocholinübertragung essentielle Aminosäure (s. auch Abbildung 18C) (Roy und Mukherjee 2009). Eine entsprechende Mutation zu Alanin hebt die katalytische Aktivität vollständig auf (Mukherjee, Liu et al. 2011). Das strukturelle Kernmotiv von AnkX wird von zwei kleineren Subdomänen flankiert. Mehrere N-terminal von der FIC-Domäne liegenden α -Helices bilden die sogenannte CMP-Domäne (Aminosäuren 1-48 und 293-331, s. Abbildung 18B, in orange dargestellt). Diese Domäne bildet zahlreiche Kontakte zum Cytidin des gebundenen CDP-Cholin aus und ist somit verantwortlich für dessen Bindung und Orientierung (Campanacci, Mukherjee et al. 2013). Eine besondere Rolle spielt hierbei das Tyrosin41, das eine π - π -Stacking-Interaktion zur Cytosinbase ausbildet und dessen Bindung somit stabilisiert (s. Abbildung 18C) (Campanacci, Mukherjee et al. 2013).

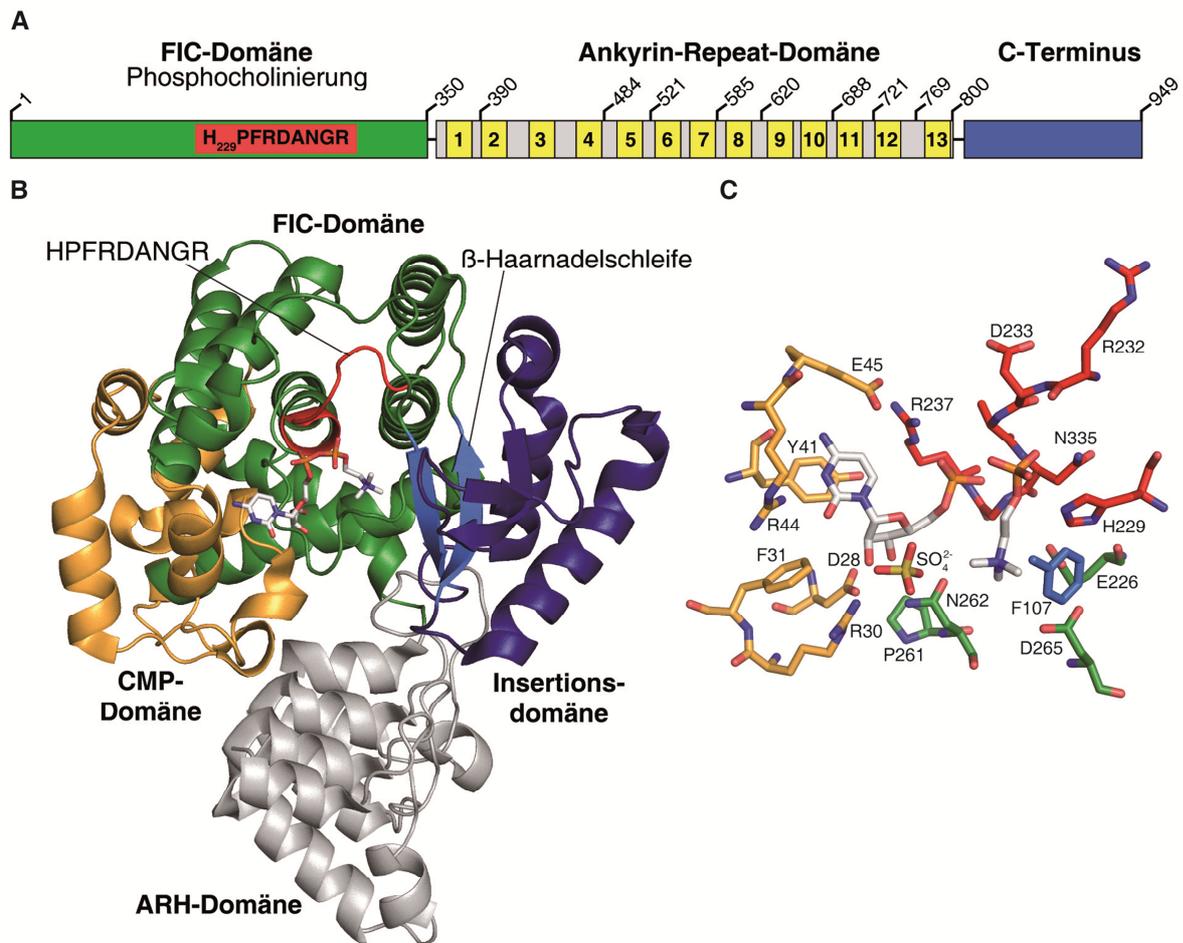


Abbildung 18: Domänenstruktur und Röntgenkristallstruktur von AnkX. A) Die schematisch dargestellte Domänenstruktur von AnkX₁₋₉₄₉ zeigt die N-terminale FIC-Domäne (grün), die die Aminosäuren 1 bis 350 umfasst, sowie das darin liegende katalytische FIC-Motiv (rot). An die FIC-Domäne schließt sich eine vorhergesagte ARH-Domäne mit 13 vorhergesagten Ankyrin-Elementen (gelb) an, deren Funktion unbekannt ist. Am C-Terminus befinden sich weitere 150 Aminosäuren, die eine weitere Domäne ausbilden könnten. Da diese aber weder sequenzielle noch strukturelle Homologien zu anderen Proteinen aufweist, ist auch in diesem Fall die Funktion unbekannt. B) Die Röntgenkristallstruktur von AnkX₁₋₄₈₄ H229A (PDB-ID: 4BET) (Campanacci, Mukherjee et al. 2013) ist in mehrere Subdomänen unterteilt: in grün ist die FIC-Domäne mit der katalytischen Schleife, die das FIC-Motiv HPFRDANGR enthält (rot) und dem gebundenen CDP-Cholin (hellgrau), dargestellt. Diese Domäne wird von zwei Subdomänen flankiert. Auf der einen Seite befindet sich die CMP-Domäne (orange), die für die Koordination der Cytosinbase verantwortlich ist. Auf der anderen Seite befindet sich die Insertionsdomäne mit der Haarnadelschleife (blau). Die Haarnadelschleife ist an der Koordination des quartären Ammoniums beteiligt. Die genaue Funktion der Insertionsdomäne ist allerdings noch ungeklärt. In grau ist zudem ein Teil der ARHD dargestellt. C) Die Aminosäureseitenketten, die die Bindetasche für das CDP-Cholin in AnkX₁₋₄₈₄ (PDB-ID: 4BES) ausbilden sind entsprechend der Domänenfarbcodierung aus Abbildung B) dargestellt. Die Base wird hauptsächlich durch eine π - π -Stapelinteraktion zum Tyrosin41 der CMP-Domäne koordiniert und die Ribose bildet Wasserstoffbrücken zu zwei Asparaginen, N28 der CMP-Domäne und über ein Sulfat zu N262 der FIC-Domäne aus. Das quartäre Ammonium wechselwirkt über eine Kation- π -Interaktion mit Phenylalanin107 der Haarnadelschleife und zudem über Salzbrücken mit E226 und D265 der FIC-Domäne. Das Phosphoanhydrid, das in diesem Modell bereits gespalten vorliegt, bildet Kontakte zu Aminosäuren des HPFRDANGR-Motivs, vor allem zu Arginin237 und Histidin229 aus (Campanacci, Mukherjee et al. 2013).

Durch Substitution dieses Tyrosins zu Alanin konnte die Bedeutung dieser Interaktion für die Modifizierungsreaktion bestätigt werden, denn die Y41A-Mutante zeigt eine um etwa 90 % verringerte Phosphocholinierungsaktivität (Campanacci, Mukherjee et al. 2013). Auf der gegenüberliegenden Seite (ausgehend von der CMP-Domäne) befindet sich die sogenannte

Insertionsdomäne (Aminosäuren 110-179, s. Abbildung 18B, in dunkelblau dargestellt), die inmitten einer strukturell konservierten Haarnadelschleife (Aminosäuren 106-109 und 180-183, s. Abbildung 18B, in blau dargestellt) liegt (Campanacci, Mukherjee et al. 2013). Die Haarnadelschleife stellt in anderen FIC-Proteinen, wie z.B. IbpA, den Kontakt zum Substratprotein (Cdc42 bei IbpA) her (Xiao, Worby et al. 2010). Im Fall von AnkX verdeckt die Insertionsdomäne diese Haarnadelschleife allerdings nach außen, sodass diese nicht für eine Bindung zu Rab1 zur Verfügung steht (Campanacci, Mukherjee et al. 2013). Die Haarnadelschleife stellt auf der anderen Seite aber ein Phenylalanin (F107) für eine Kation- π -Interaktion mit der Ammoniumgruppe des Cholins her und spielt somit eine wichtige Rolle bei der Koordination des Nukleotids (s. Abbildung 18C) (Campanacci, Mukherjee et al. 2013). Gleichermäßen ist noch ungeklärt, wie AnkX sein Proteinsubstrat erkennt und wo sich die Interaktionsoberfläche befindet. Hierfür infrage kommt möglicherweise die *Ankyrin Repeat Homology* Domäne (ARHD) (s. Abbildung 18A und B), die aus 13 aufeinander folgenden Ankyrin-Wiederholungselementen besteht und die Aminosäuren 350-800 umfasst (Pan, Luhrmann et al. 2008). Auch deren Funktion in dem Multidomänenprotein ist noch nicht entschlüsselt, allerdings ist bekannt, dass ARHDs häufig Protein-Protein-Interaktionen vermitteln, was auch bei AnkX der Fall sein könnte (Mosavi, Cammett et al. 2004). Pan et al. zeigten außerdem, dass für die pathologischen Auswirkungen von AnkX sowohl die N-terminale FIC-Domäne als auch die ARHD verantwortlich sind, sodass anzunehmen ist, dass auch die ARHD eine wichtige Rolle für die Funktion des Proteins spielt (Pan, Luhrmann et al. 2008). An die ARHD schließt sich noch eine ca. 150 Aminosäuren umfassende C-terminale Domäne an (Aminosäuren 801-949), von der bislang weder Struktur noch Funktion bekannt sind. Eine weitere interessante Eigenschaft von AnkX ist die Tatsache, dass das Enzym nicht nur sein Proteinsubstrat Rab1b phosphocholiniert, sondern auch sich selbst (Goody, Heller et al. 2012, Campanacci, Mukherjee et al. 2013). Wo genau diese Autophosphocholinierung stattfindet und welchen Zweck sie erfüllt, ist noch unbekannt. Eine Vermutung ist aber, dass AnkX das Rab-Protein über einen Ping-Pong-Mechanismus phosphocholiniert, d.h. dass AnkX zunächst nur das Nukleotidsubstrat bindet und Phosphocholin auf sich überträgt und erst nach der Freisetzung des Nebenprodukts CMP das Proteinsubstrat bindet und mit dem intermediär gebundenen Phosphocholin modifiziert (Goody, Heller et al. 2012). Für die intermediäre Autophosphocholinierung käme daher das katalytische Histidin (H229) in Frage, aber dies konnte bislang noch nicht verifiziert werden (Goody, Heller et al. 2012). AnkX weist bezüglich der Phosphocholinierungsreaktion eine katalytische Effizienz von $2 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, sowie einen K_M von 122 μM für Rab1b und von 254 μM für CDP-Cholin auf und liegt damit in der Größenordnung anderer FIC-Proteine, wie z.B. VopS (Luong, Kinch et al. 2010, Goody, Heller et al. 2012).

1.7.3 Eigenschaften von Lem3

Die Legionellenphosphodiesterase Lem3 ist wesentlich weniger enzymatisch und strukturell charakterisiert als sein Gegenspieler AnkX. Bislang konnte weder die Proteinstruktur gelöst, noch das katalytische Zentrum identifiziert werden.

Lem3 ist ein 570 Aminosäuren umfassendes Protein und gleichermaßen wie AnkX ein Substrat des Dot/Icm-Sekretionssystems von *L. pneumophila* (Burstein, Zusman et al. 2009, Tan, Arnold et al. 2011). Lem3 ist in der Lage, die pathologische Wirkung von AnkX vollständig aufzuheben, indem es die Phosphocholinierung von Proteinen der Rab1-Familie wieder rückgängig macht (s. Abbildung 15) (Tan, Arnold et al. 2011). Dabei ist noch ungeklärt, wie genau die Regulation der Phosphocholinierung durch Legionella realisiert wird. Da sowohl AnkX als auch Lem3 sehr früh nach der Infektion in der Wirtszelle detektiert werden können und während der ersten acht Stunden nach der Infektion ein konstantes Expressionslevel aufweisen, muss eine zeitliche Regulierung der Modifikation ausgeschlossen werden (Tan, Arnold et al. 2011). Möglicherweise werden die Aktivitäten der beiden Enzyme stattdessen räumlich kontrolliert, was voraussetzt, dass die Proteine an unterschiedlichen subzellulären Kompartimenten lokalisiert sind (Tan, Arnold et al. 2011). Lem3 weist bezüglich der Dephosphocholinierung für PC-Rab1b einen K_M von 60 μM und eine katalytische Effizienz von $2 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ auf, was eine gute Ausgangslage für die reversible Proteinmarkierungsstrategie basierend auf AnkX und Lem3 darstellt (Goody, Heller et al. 2012).

2. Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit ist die Etablierung einer neuen enzymatischen Methode zur Markierung von Proteinen, die Schwachstellen anderer bereits etablierter Markierungsmethoden überwindet und vielseitig anwendbar ist. Die vorgeschlagene Methode basiert auf den Legionellenenzymen AnkX und Lem3, die als molekulare Werkzeuge die Übertragung einer Sonde auf ein Zielprotein bzw. die Abspaltung der Sonde von diesem katalysieren können. Die Sonde soll gekoppelt an der PC-Gruppe des Nukleotidsubstrats CDP-Cholin vorliegen und zusammen mit dieser auf ein Zielprotein übertragen werden, welches das Erkennungspeptid für AnkX/Lem3 enthält. Für die Entwicklung dieser Technologie ist es erforderlich zu untersuchen, ob AnkX modifizierte CDP-Cholin-Derivate, die in Kooperation von Prof. Dr. C. Hedberg und Philipp Ochtrup an der Universität Umeå, Schweden synthetisiert wurden, als Substrate akzeptiert, welche Sonden im Hinblick auf die Größe toleriert werden und ob die Einfügung eines Linkermoleküls bestimmter Länge notwendig ist. Zudem muss untersucht werden, ob Modellproteine durch rekombinante Fusion mit dem Octapeptid in AnkX/Lem3-Substrate umgewandelt und reversibel phosphocholiniert werden können. Da die Position der Markierung am Protein in manchen Fällen ausschlaggebend ist für die Wahl der Markierungsmethode, wird die Einbringung der Peptidsequenz sowohl am N- und C-Terminus wie auch in internen Schleifenregionen überprüft. Desweiteren soll die Länge und Sequenz des Erkennungsmotivs optimiert werden, indem Aminosäuren identifiziert werden, die essentiell für die Erkennung durch AnkX sind und die Reaktion begünstigen und solche, die substituierbar sind. Neben den Substraten sollen in dieser Arbeit ebenfalls die Enzyme für die spezifische Proteinmarkierung optimiert werden. Dazu sollen Konstrukte identifiziert werden, die bei minimaler Größe maximale Stabilität und Aktivität aufweisen und sich somit am besten für eine breite Anwendung der Methode eignen. Sowohl von AnkX als auch von Lem3 sollen dazu Verkürzungskonstrukte hergestellt werden und hinsichtlich ihres Verhaltens bei der Expression und Reinigung und ihrer katalytischen Aktivität verglichen werden. Schließlich soll die prinzipielle Anwendbarkeit der Methode demonstriert werden, indem ein Membranprotein rekombinant mit der Octapeptidsequenz ausgestattet, von humanen Zellen exprimiert und in die Zellmembran eingebaut wird, sodass das Erkennungsmotiv vom Extrazellulärraum zugänglich ist. Die Fluoreszenzmarkierung dieses Membranproteins soll dann von AnkX mit einem fluoreszenten CDP-Cholin-Derivat als Cosubstrat realisiert werden. Auf diese Weise soll eine Methode geschaffen werden, die die kovalente, spezifische sowie stabile Markierung von Proteinen *in vitro* und *in vivo* ermöglicht. Außerdem soll sie die schnelle und quantitative Modifizierung von Proteinen erlauben sowie vielseitig anwendbar und reversibel sein.

3. Ergebnisse

In diesem Kapitel werden die Experimente, die für die Entwicklung der AnkX und Lem3-basierten Markierungsmethode durchgeführt wurden und die daraus resultierenden Ergebnisse und Beobachtungen erläutert. Bei der Entwicklung und Etablierung der Markierungsstrategie wurden fünf Teilaspekte untersucht. Zunächst wurden die beiden, für die Markierungsmethode essenziellen Enzyme AnkX und Lem3 hinsichtlich ihrer Herstellung und Aktivität optimiert (s. 3.1). Mit Hilfe von verschiedenen verkürzten Proteinvarianten sollte jeweils das Konstrukt mit der größten Stabilität und Aktivität identifiziert werden. Da bezüglich Lem3 noch keine Domänenstruktur bekannt ist, bestand in diesem Fall das Ziel in der Identifizierung der aktiven Domäne für die Phosphocholinhydrolyse, was ebenfalls mit Hilfe von Verkürzungskonstrukten untersucht werden sollte. Zum Zweiten wurde das Erkennungsmotiv von AnkX bzw. Lem3 hinsichtlich essenzieller Aminosäuren analysiert und eine potenzielle Verkürzung des Motivs untersucht (s. 3.2). Dies sollte durch gezielte Aminosäuresubstitutionen erzielt werden. Der dritte Teilaspekt beinhaltet die Erzeugung von künstlichen AnkX/Lem3-Substraten durch rekombinante Ausstattung von Modellproteinen mit dem Erkennungsmotiv (s. 3.3). Des Weiteren stand die Evaluierung dieser Substrate hinsichtlich ihrer Phosphocholinierungsrate im Vergleich zum natürlichen Substrat Rab1b im Mittelpunkt. Die Eignung verschiedener CDP-Cholin-Derivate als Cosubstrate für AnkX/Lem3 stellte die vierte Teilaufgabe dar (s. 3.4). Dafür wurden Nukleotidderivate von Prof. Dr. C. Hedberg und P. Ochtrop von der Universität Umeå in Schweden synthetisiert, die es erlauben, eine fluoreszente Gruppe mittels AnkX auf ein Protein zu übertragen und dieses somit farblich zu markieren. Die Anwendung der fluoreszenten CDP-Cholin-Derivate zur Markierung von künstlichen Proteinsubstraten sollte außerdem die prinzipielle Anwendbarkeit des Systems unter Beweis stellen. Schließlich wurde die Anwendbarkeit der Markierungsmethode im zellulären Kontext betrachtet, indem die Membran von humanen Zellen, die ein mit der Erkennungssequenz ausgestattetes Membranprotein produzieren, von außen fluoreszent markiert werden sollten (s. 3.5).

3.1 Optimierung der Enzyme AnkX und Lem3

AnkX ist mit 949 Aminosäuren ein verhältnismäßig großes Protein mit einer bioinformatisch vorhergesagten und schließlich durch röntgenkristallographische Strukturanalyse bestätigten FIC-Domäne am N-Terminus (Aminosäuren 1-350, s. Abbildung 18) (Campanacci, Mukherjee et al. 2013). Da die FIC-Domäne aufgrund des enthaltenen katalytischen FIC-Motivs **HPFRDANGR** essenziell für die Phosphocholinierungsreaktion ist, wurde die Hypothese aufgestellt, dass diese etwa 38 kDa große Domäne allein für die Katalyse des Phosphocholintfers ausreichend ist. Da sich das Gesamtprotein hinsichtlich Expression, Reinigung und

Stabilität nur wenig zufriedenstellend verhielt und leicht präzipitierte, war anzunehmen, dass eine Verkürzung eine Verbesserung der Proteineigenschaften mit sich bringen würde. Zudem sollten andere, möglicherweise störende Aktivitäten oder Nebeneffekte anderer AnkX-Domänen für eine Anwendung des Enzyms bei der Markierung von Proteinen ausgeschlossen werden. Daher wurde das Verkürzungskonstrukt, das die Aminosäuren 6-350 (AnkX₆₋₃₅₀) umfasst, rekombinant durch bakterielle Expression hergestellt (s. 6.2.1.4, 6.2.3.1-6.2.3.6). Mit Hilfe eines Tryptophanfluoreszenzassays konnte anschließend die Aktivität des AnkX-Konstrukts gemessen werden (s. 6.2.4.1). Dieser Assay beruht auf der Detektion der Phosphocholinierungsreaktion durch die Änderung der intrinsischen Tryptophanfluoreszenzintensität des Rab1b-Proteins. Die Anbringung der PC-Gruppe durch AnkX löst dabei einen Anstieg der Fluoreszenzintensität um ca. 8 % aus, wohingegen die Abspaltung durch Lem3 einen Abfall des Signals bewirkt (Goody, Heller et al. 2012). Die Aktivität von AnkX₆₋₃₅₀ (100 nM) gegenüber einem verkürzten Rab1b-Konstrukt, das die Aminosäuren 3-174 umfasst (Rab1b₃₋₁₇₄) (10 µM) wurde mit einem Überschuss von CDP-Cholin (1 mM) gemessen, aber es konnte dabei innerhalb von ca. 2000 s kein Fluoreszenzanstieg, der auf eine Phosphocholinierung schließen lässt, detektiert werden (Abbildung 19A, graue Kurve). Im gleichen Zeitraum konnte mit dem Enzym AnkX₁₋₉₄₉, das die Aminosäuren 1-949 umfasst, unter denselben Bedingungen ein Anstieg der Rab-Tryptophanfluoreszenz um ca. 8% detektiert werden (schwarze Kurve), was einer vollständigen Phosphocholinierung von Rab1b entspricht (Goody, Heller et al. 2012). AnkX₆₋₃₅₀ scheint eine Restaktivität zu haben, da nach 24-stündiger Inkubation mit Rab1b₃₋₁₇₄ und CDP-Cholin eine Modifikation des Rab-Proteins massenspektrometrisch nachweisbar war (s. Anhang, Abbildung 57A). Auch mittels Western Blot-Analyse (s. 6.2.2.2), bei der durch einen Anti-Phosphocholin-Antikörper die Detektion von phosphocholinieren Proteinen möglich ist, konnte lediglich sehr schwach modifiziertes Rab nachgewiesen werden (s. Anhang, Abbildung 58) (Mukherjee, Liu et al. 2011). Somit ist festzuhalten, dass die isolierte FIC-Domäne von AnkX nur eine sehr schwache Phosphocholinierungsaktivität im Vergleich zu Wildtyp-AnkX besitzt und daher für eine katalytisch effiziente Proteinmarkierung nicht geeignet zu sein scheint.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde die Vermutung angestellt, dass möglicherweise die ARHD ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Phosphocholinierungsreaktion spielt, z.B. für die Bindung des Proteinsubstrats. Daher wurde ein Konstrukt entworfen, das neben der FIC-Domäne auch die gesamte ARH-Domäne, also Aminosäure 1-800 enthält (AnkX₁₋₈₀₀). Dieses Protein verursachte bei der fluoreszenzspektrometrischen Aktivitätsmessung im Gegensatz zu AnkX₆₋₃₅₀ einen Anstieg der Fluoreszenzintensität um ca. 8 % (s. Abbildung 19A, rote Kurve) und zeigte einen ähnlichen Kurvenverlauf wie Wildtyp-AnkX, sodass der Schluss gezogen werden kann, dass AnkX₁₋₈₀₀ ungefähr die gleiche Aktivität besitzt wie AnkX₁₋₉₄₉.

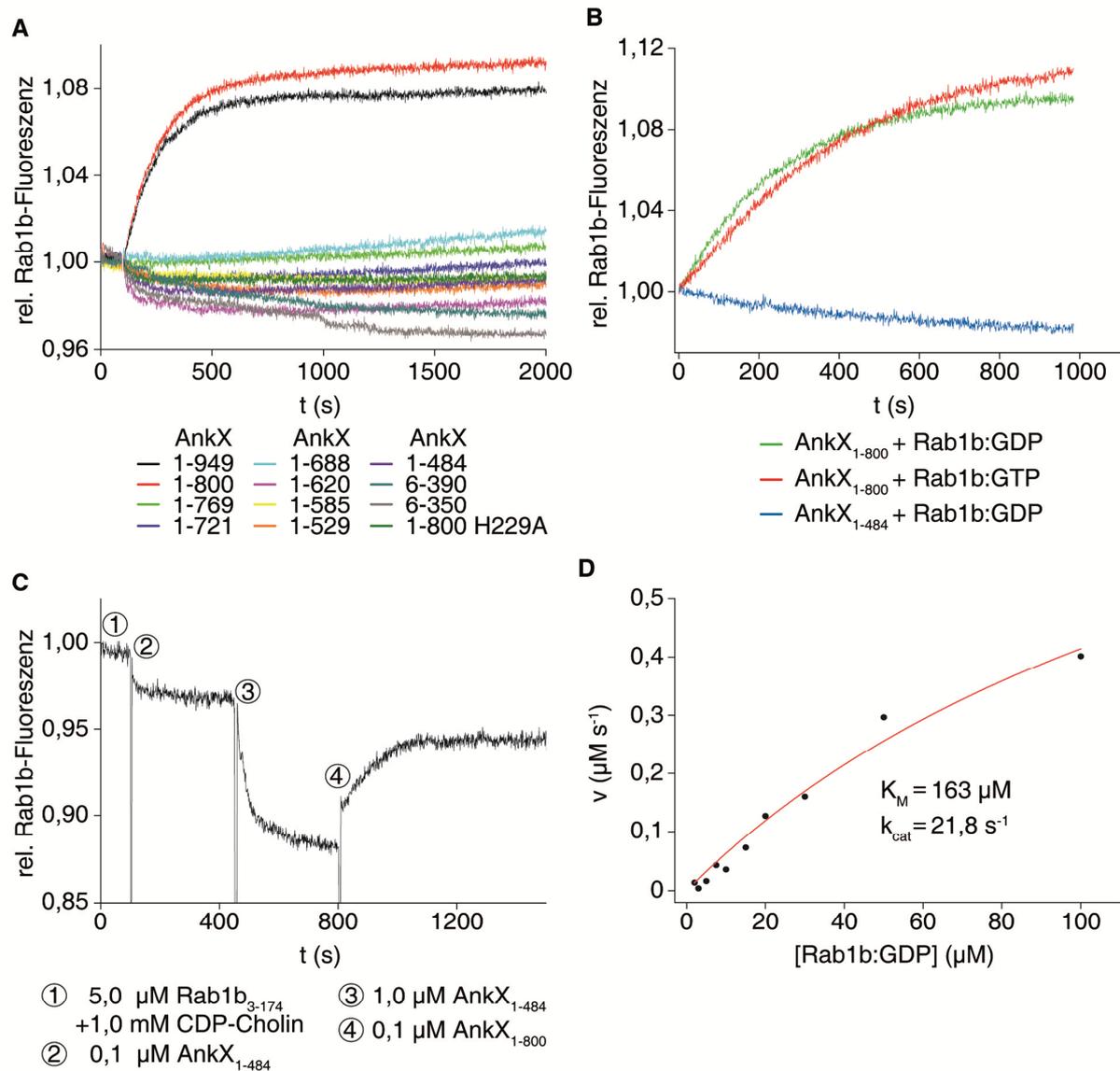


Abbildung 19: Charakterisierung von AnkX. A) Messung der Phosphocholinierungskinetik mittels zeitaufgelöster Verfolgung der Tryptophanfluoreszenz von Rab1b. 10 μM Rab1b₃₋₁₇₄ und 1 mM CDP-Cholin wurden in der Küvette vorgelegt und die Reaktion mit der Zugabe von 100 nM eines AnkX-Konstrukts gestartet (Zeitpunkt 100 s). Lediglich AnkX₁₋₉₄₉ und AnkX₁₋₈₀₀ verursachten einen Anstieg der Fluoreszenzintensität, der auf der Phosphocholinierung des Rab-Proteins beruht. Alle anderen AnkX-Konstrukte zeigten unter diesen Bedingungen keine oder nur eine sehr schwache Reaktion. B) Mittels Trp-Fluoreszenzmessungen konnte festgestellt werden, dass AnkX₁₋₈₀₀ sowohl aktives als auch inaktives Rab1b phosphocholiniert. AnkX₁₋₄₈₄ ist hingegen nicht aktiv. C) Mit dem gleichen Assay konnte beobachtet werden, dass weder die Zugabe von 0,1 μM AnkX₁₋₄₈₄ zu 5 μM Rab1b₃₋₁₇₄ und 1 mM CDP-Cholin, noch eine weitere Addition von 1 μM AnkX₁₋₄₈₄ zu einem Anstieg der Fluoreszenzintensität und somit zur Phosphocholinierung von Rab1b führten. Die darauffolgende Applikation von 0,1 μM AnkX₁₋₈₀₀ löste hingegen die Modifizierung der GTPase aus. D) Michaelis-Menten-Kinetik der von 50 nM AnkX₁₋₈₀₀ katalysierten Phosphocholinierung von Rab1b₃₋₁₇₄.

Aufgrund dieser Erkenntnisse wurden weitere Konstrukte erstellt, die sukzessiv um eine Ankyrinwiederholung verkürzt wurden. Damit sollte untersucht werden, welche der Ankyrinwiederholungselemente für die Phosphocholinierungsaktivität erforderlich und welche möglicherweise entbehrlich sind, um so das Konstrukt mit der minimalen Größe, aber maximalen Aktivität zu identifizieren. Ausgehend von AnkX₁₋₈₀₀ wurden Varianten konstruiert, die C-terminal um je eine Ankyrinwiederholung verkürzt wurden. Von diesen AnkX-Varianten ver-

ursachen bei der fluoreszenzspektrometrischen Aktivitätsmessung mit Rab1b und CDP-Cholin lediglich die Konstrukte, die die Aminosäuren 1-769 (AnkX₁₋₇₆₉), 1-720 (AnkX₁₋₇₂₁) sowie 1-688 (AnkX₁₋₆₈₈) umfassen, einen sehr leichten Anstieg der Fluoreszenzintensität innerhalb von ca. 2000 s, was auf eine geringe Aktivität im Vergleich zum Wildtyp und zu AnkX₁₋₈₀₀ schließen lässt (s. Abbildung 19A). Die übrigen AnkX-Varianten (1-620, 1-585, 1-529, 1-484 und 6-390) lösten keinen detektierbaren Fluoreszenzanstieg innerhalb von 2000 s aus, sodass davon auszugehen ist, dass diese Verkürzungsstrukturen keine oder nur eine äußerst geringe Phosphocholinierungsaktivität besitzen. Zudem wurde eine inaktive H229A-Mutante von AnkX₁₋₈₀₀ getestet, die unter den gleichen Bedingungen ebenfalls keinen detektierbaren Fluoreszenzanstieg verursachte (s. Abbildung 19A, dunkelgrüne Kurve) wodurch bestätigt wird, dass AnkX-Varianten, die keinen Anstieg der Fluoreszenzintensität auslösen, keine oder nur eine sehr geringe Phosphocholinierungsaktivität besitzen.

Durch massenspektrometrische Analyse von Rab1b nach 24-stündiger Inkubation mit CDP-Cholin und jeweils einer der AnkX-Varianten konnte in allen Fällen phosphocholinisiertes Rab1b detektiert werden, was auch in diesen Fällen auf eine Restaktivität, die aber viel geringer ist als die von AnkX₁₋₉₄₉ oder AnkX₁₋₈₀₀, schließen lässt (s. Anhang, Abbildung 57). Besonderes Augenmerk lag bei dieser Analyse auf dem Konstrukt AnkX₁₋₄₈₄, das die Aminosäure 1-484 umfasst, da dieses von Campanacci et al. als aktiv beschrieben und kristallisiert wurde (Campanacci, Mukherjee et al. 2013). Allerdings zeigte auch dieses Konstrukt bei der fluoreszenzspektrometrischen Aktivitätsmessung keine mit AnkX₁₋₈₀₀ vergleichbare Aktivität (s. Abbildung 19B). Auch durch Erhöhung der Konzentration von AnkX₁₋₄₈₄ von 0,1 µM auf 1 µM konnte kein Fluoreszenzanstieg detektiert werden, sondern erst nach Zugabe von 0,1 µM AnkX₁₋₈₀₀ (s. Abbildung 19C).

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde das Konstrukt AnkX₁₋₈₀₀, das sowohl die FIC-Domäne als auch die vollständige ARHD beinhaltet, als AnkX-Variante mit minimaler Größe, aber maximaler Phosphocholinierungsaktivität identifiziert. Die weitere Charakterisierung dieses Konstrukts ergab, dass AnkX₁₋₈₀₀ gleichermaßen wie auch Wildtyp-AnkX, sowohl die inaktive, GDP-gebundene, als auch die aktive, GTP-gebundene Form von Rab1b als Substrat akzeptiert (s. Abbildung 19B) (Goody, Heller et al. 2012). Hinsichtlich der Affinität von AnkX₁₋₈₀₀ zu Rab1b und dessen Umsetzung in das phosphocholinisierte Produkt, weist dieses Konstrukt mit einem K_M von 163 µM und einem k_{cat} von 22 s⁻¹ ähnliche kinetische Parameter auf wie das Wildtypenzym (K_M : 122 µM und k_{cat} : 27 s⁻¹) (s. Abbildung 19D) (Goody, Heller et al. 2012). Mit einem k_{cat}/K_M von $1,33 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ hat AnkX₁₋₈₀₀ eine nur geringfügig vom Wildtyp ($k_{cat}/K_M = 2,0 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) abweichende katalytische Effizienz. Außerdem wurde die Phosphocholinierung des Octapeptids TITSSYYR durch AnkX₁₋₈₀₀ überprüft, wobei beobachtet wurde, dass das Peptid nach 24-stündiger Inkubation mit AnkX₁₋₈₀₀ und CDP-Cholin vollstän-

dig modifiziert werden konnte (s. Abbildung 20), sodass die Grundvoraussetzungen für die Verwendung dieses AnkX-Konstrukts für die Markierungsmethode geschaffen wurden.

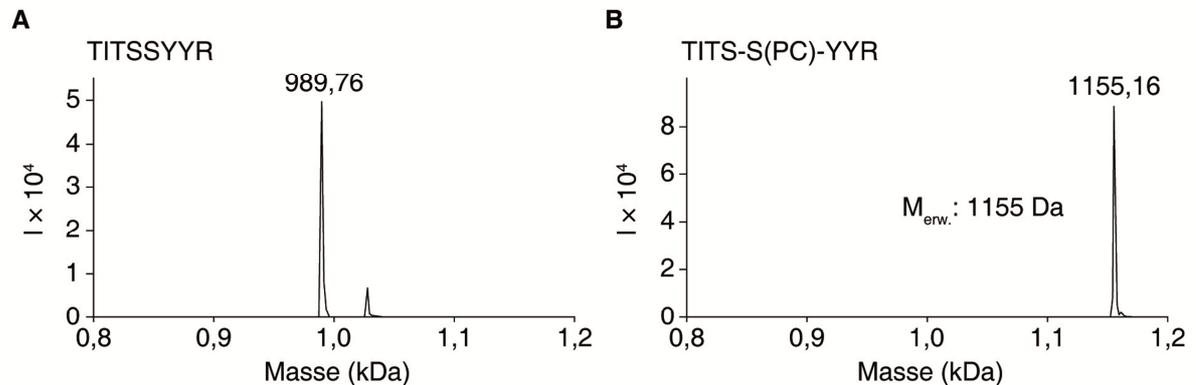


Abbildung 20: Phosphocholinierung des synthetischen Peptids TITSSYYR mit AnkX₁₋₈₀₀ und CDP-Cholin. 500 μM Peptid wurden mit 1 μM AnkX₁₋₈₀₀ und 5 mM CDP-Cholin über Nacht (üN) inkubiert. Das Massenspektrum des Peptids vor der Modifizierungsreaktion ist in A) dargestellt und zeigt einen Peak, der der berechneten Masse des Octapeptids von 990 Da entspricht. Das Spektrum, das nach der Reaktion mit AnkX₁₋₈₀₀ und CDP-Cholin gemessen wurde, zeigt einen Peak mit einer 165 Da größeren Masse, was der Addition der Phosphocholingruppe entspricht. ($M_{\text{erw.}}$: erwartete Masse).

Die Phosphocholindiesterase Lem3 wurde ebenfalls genauer charakterisiert. Da bezüglich Lem3 allerdings keine Kristallstruktur vorlag und auch Strukturvorhersagen nur leichte Ähnlichkeit mit Phosphatasen aufzeigten, wurde versucht, die aktive Domäne durch verschiedene Verkürzungen sowohl am N- als auch am C-Terminus einzugrenzen. Dazu wurde eine C-terminal um 70 Aminosäuren verkürzte Variante, die die Aminosäuren 1-500 umfasst (Lem3₁₋₅₀₀) und drei N- und C-terminal verkürzte Varianten, die die Aminosäuren 98-267 (Lem3₉₈₋₂₆₇), 98-310 (Lem3₉₈₋₃₁₀) und 160-343 (Lem3₁₆₀₋₃₄₃) beinhalten, rekombinant durch heterologe Expression hergestellt (alle Lem3-Konstrukte wurden von der Dortmund Protein Facility (DPF) kloniert und mit Ausnahme von Lem3₁₋₅₀₀ auch hergestellt). Zur Analyse der Dephosphocholinierungsaktivität dieser Lem3-Varianten wurden sie in einer Konzentration von 1 μM mit 50 μM präparativ phosphocholinierem Rab1b (PC-Rab1b) (s. 6.2.3.7) über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend massenspektrometrisch das Vorhandensein der Modifikation überprüft. Lediglich bei Wildtyp-Lem3 (Lem3₁₋₅₇₀) und bei Lem3₁₋₅₀₀ konnte unmodifiziertes Rab1b detektiert werden, woraus zu schließen ist, dass der N-Terminus vermutlich wichtig für die Aktivität ist (s. Abbildung 21).

Außerdem konnte gezeigt werden, dass sowohl das Wildtypprotein als auch das verkürzte Konstrukt beide Aktivierungszustände der phosphocholinieren GTPase als Substrate akzeptieren und kein Unterschied in den Reaktionskinetiken zwischen GDP- und Guanosin-5'-[[β,γ]-imido]-triphosphat (GppNHp)-beladenem PC-Rab1b zu beobachten war (s. Abbildung 22A). Des Weiteren wurde aufgrund der leichten Ähnlichkeit von Lem3 mit magnesiumabhängigen Protein Phosphatasen vom Typ 2C (PP2C) (s. Sequenz- und Sekundärstruktur-

alignment im Anhang, Abbildung 70) die Hypothese aufgestellt, dass die Dephosphocholinierungsaktivität des Enzyms ebenfalls eine Magnesiumabhängigkeit aufweist.

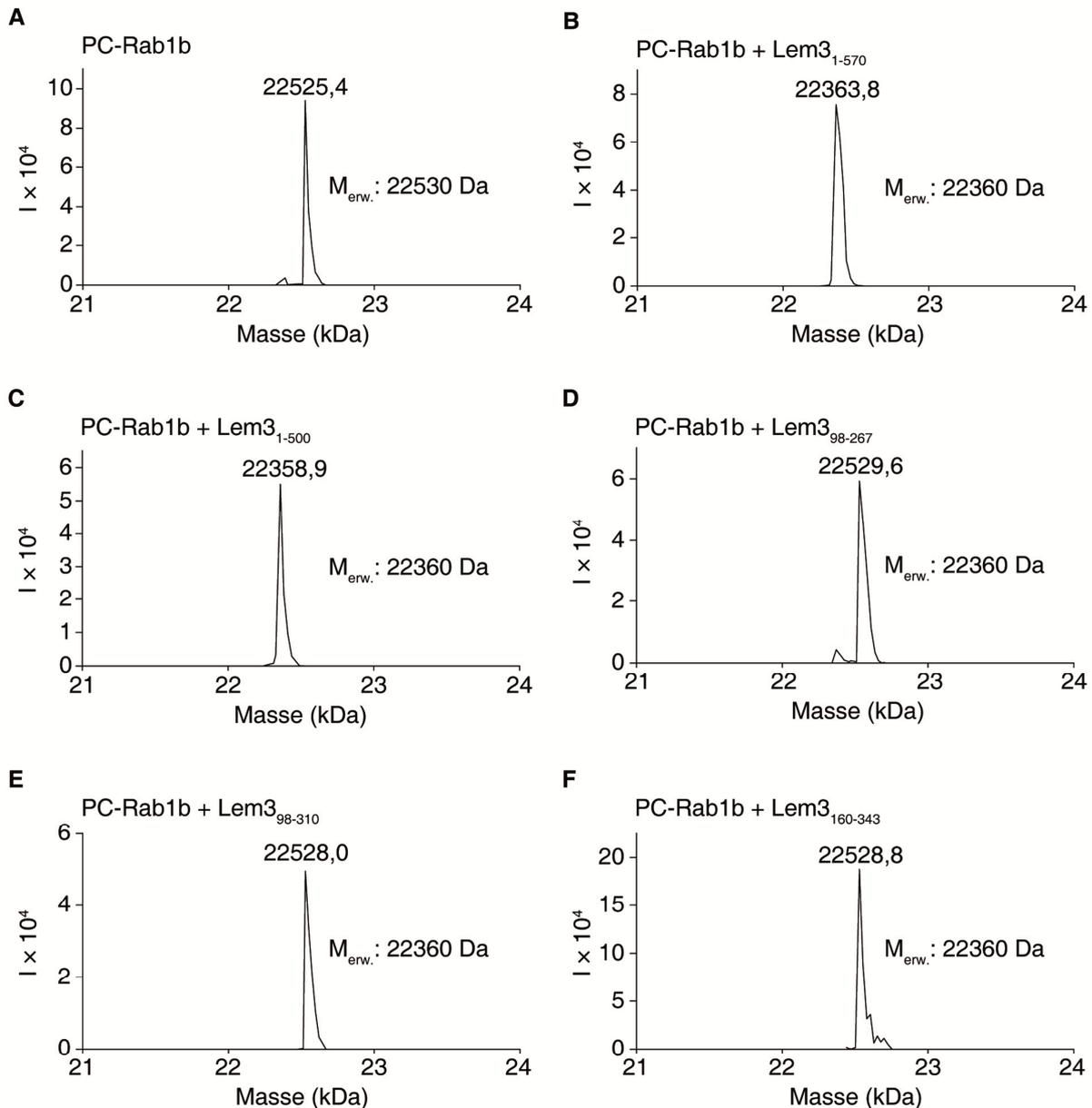


Abbildung 21: Massenspektren von PC-Rab1b vor der Inkubation mit Lem3 (A) und nach Inkubation mit Lem3₁₋₅₇₀ (B), Lem3₁₋₅₀₀ (C), Lem3₉₈₋₂₆₇ (D), Lem3₉₈₋₃₁₀ (E) und Lem3₁₆₀₋₃₄₃ (F). Lediglich im Fall von Lem3₁₋₅₇₀ konnte eine erfolgreiche Demodifizierung von PC-Rab1b₃₋₁₇₄ detektiert werden ($M_{\text{erw.}}$: erwartete Masse).

Dies wurde getestet, indem Lem3 mit einem phosphocholinieren Proteinsubstrat in Gegenwart der Metallionenchelatoren EDTA/EGTA oder MgCl_2 inkubiert und die erfolgreiche Abspaltung der PC-Gruppe mit Hilfe einer Western Blot Analyse gegen PC detektiert wurde (s. Abbildung 22B). Dabei konnte tatsächlich eine Mg^{2+} -Abhängigkeit der von Lem3 katalysierten Reaktion nachgewiesen werden. Die Abwesenheit von Mg^{2+} sowie die externe Zugabe der Metallionenchelatoren EDTA und EGTA verhinderten eine erfolgreiche Demodifizierung innerhalb von 60 min. Die Zugabe von 5 mM MgCl_2 hingegen verursachte eine effiziente Dephosphocholinierung innerhalb von wenigen Minuten.

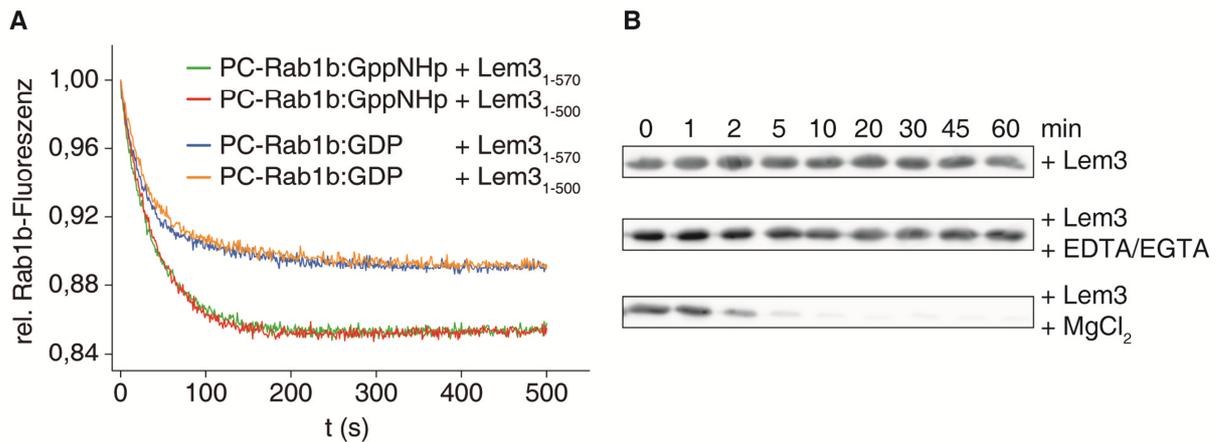


Abbildung 22: Charakterisierung von Lem3. A) Kinetik der Dephosphocholinierung von GDP- und GppNHp-gebundenem Rab1b (10 µM) durch Lem3₁₋₅₇₀ oder Lem3₁₋₅₀₀ (beide je 500 nM), gemessen mittels Trp-Fluoreszenz von PC-Rab1b. Beide Lem3-Konstrukte akzeptieren beide Aktivierungszustände der GTPase. Zwischen dem Gesamtzym und dem verkürzten Konstrukt ist hinsichtlich der Reaktionskinetik kein Unterschied festzustellen. B) Lem3 ist Mg²⁺-abhängig. Die zeitaufgelöste Abnahme der Phosphocholinierung von einem phosphocholiniierten Lem3-Substrat (50 µM PC-TITSSYYR-SUMO, s. 3.3.4) wurde mittels Western Blot gegen PC detektiert. Ohne Zusatz von Mg²⁺ zur Reaktion ist keine Dephosphocholinierung durch Lem3₁₋₅₀₀ (500 nM) zu beobachten. Gleiches gilt für die Zugabe des Metallionenchelators EDTA bzw. EGTA (je 10 mM). Durch Zugabe von 5 mM MgCl₂ dephosphocholiniiert Lem3 das PC-Protein innerhalb von wenigen Minuten (Heller, Ochtrup et al. 2015)

Des Weiteren wurde die Dephosphocholinierung von Rab35 untersucht, das nah mit Rab1b verwandt ist und das, obwohl es an Stelle des von AnkX adressierten Serins in Rab1a und Rab1b ein Threonin trägt, mit ähnlicher Effizienz wie Rab1b phosphocholiniiert werden kann (Goody, Heller et al. 2012). Die Dephosphocholinierung von Rab35 konnte allerdings durch Tryptophanfluoreszenzmessungen im Gegensatz zu Rab1b wt nicht nachgewiesen werden (s. Abbildung 23, Rab35:blaue Kurve, Rab1b wt: schwarze Kurve).

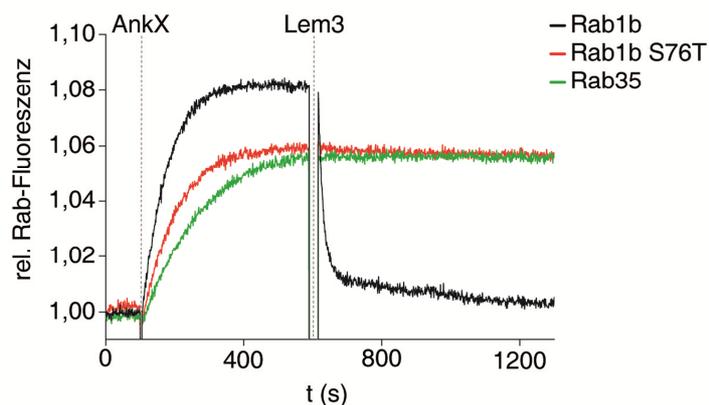


Abbildung 23: Dephosphocholinierung von Rab-Proteinen durch Lem3₁₋₅₀₀. Die Dephosphocholinierung von PC-Rab1b wt, PC-Rab1b S76T und PC-Rab35, das an Stelle des von AnkX adressierten Serins in Rab1a und Rab1b ein Threonin trägt, wurde anhand der Änderung der Trp-Fluoreszenzintensität verfolgt. 10 µM Rab und 1 mM CDP-Cholin wurden in der Küvette vorgelegt und mit der Zugabe von 100 nM AnkX₁₋₈₀₀ *in situ* phosphocholiniiert. Nach Einstellung des Reaktionsgleichgewichts wurde Lem3₁₋₅₀₀ in einer Konzentration von 1 µM hinzugefügt. Lediglich im Fall von Rab1b wt ist ein Abfall der Fluoreszenz, der auf eine erfolgreiche Dephosphocholinierung schließen lässt, zu beobachten.

Eben so wenig konnte die Dephosphocholinierung der S76T-Mutante von Rab1b auf diese Weise detektiert werden (rote Kurve). Daraus kann geschlossen werden, das Lem3 phos-

phosphocholiniertes Threonin im Gegensatz zu phosphocholiniertem Serin nicht als Substrat akzeptiert.

Für die Proteinmarkierungsmethode ist es notwendig, dass potenziell geeignete Lem3-Verkürzungskonstrukte neben PC-Rab1b auch das phosphocholinierte Octapeptid TITS-S(PC)-YYR als Substrat akzeptieren. Dies wurde überprüft, indem das synthetisch phosphocholinierte Octapeptid, das von P. Ochtrop an der Universität Umeå hergestellt wurde, mit Lem3₁₋₅₀₀ üN inkubiert und anschließend massenspektrometrisch hinsichtlich einer Massenabnahme untersucht wurde (Albers und Hedberg 2013). In den Massenspektren ist zu erkennen, dass das Peptid nach der Inkubation mit Lem3₁₋₅₀₀ eine um 165,5 Da verringerte Masse aufweist als vor der Reaktion (Abbildung 24A und B).

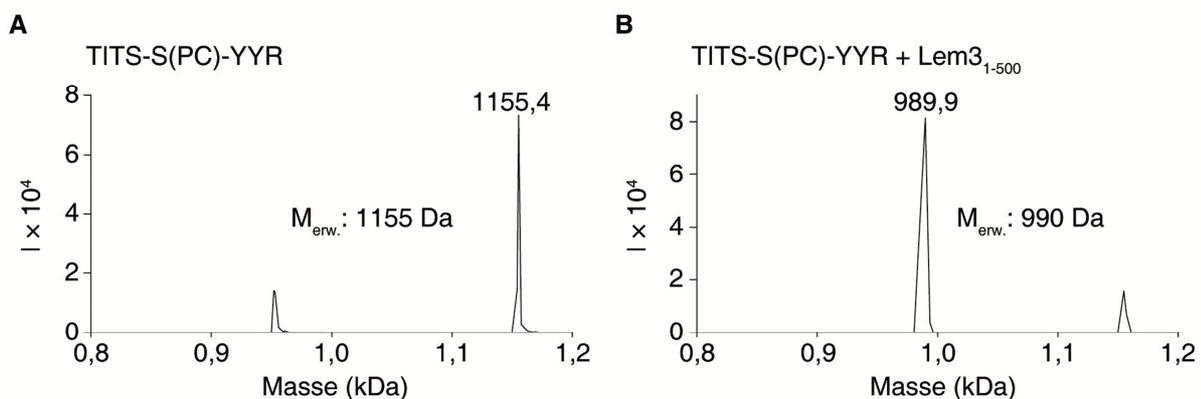


Abbildung 24: Lem3₁₋₅₀₀ demodifiziert das Octapeptid. A) Das synthetisch modifizierte Octapeptid hat eine Masse von 1155,4 Da. Nach der Inkubation mit Lem3 weist die Masse des Peptids eine Differenz von -165,5 Da auf, die der Masse von Phosphocholin entspricht (B) ($M_{\text{erv.}}$: erwartete Masse) (Heller, Ochtrop et al. 2015).

Die Tatsache, dass Lem3₁₋₅₀₀ das phosphocholinierte Octapeptid TITS-S(PC)-YYR demodifizieren kann, bildet die Grundlage für die Anwendbarkeit von Lem3₁₋₅₀₀ in der vorgestellten Markierungsmethode und somit für die Reversibilität der Markierung.

3.2 Optimierung des Erkennungsmotivs

Das Octapeptid TITSSYYR aus dem *Switch II*-Bereich von Rab1b wurde im Zuge der Entdeckung der Phosphocholinierung durch AnkX von Mukherjee *et al.* als tryptisches Rab1b-Fragment, das die Modifikation trägt, massenspektrometrisch identifiziert (Mukherjee, Liu et al. 2011). Daher wurde diese Sequenz zunächst als minimales Erkennungsmotiv von AnkX/Lem3 vorgeschlagen und die Phosphocholinierung des synthetischen Peptids erfolgreich *in vitro* getestet, was die Grundlage für das Konzept der Markierungsmethode darstellt (Goody, Heller et al. 2012). Da es für Proteinmarkierungen jedoch von herausragender Bedeutung ist, das Zielprotein zur Bewahrung der Funktion und Aktivität so wenig wie möglich zu manipulieren, sollte das Peptid hinsichtlich möglicher Verkürzungen und Aminosäuresubstitutionen untersucht werden. Das Ziel hiervon war außerdem, eine zu Rab1b orthogonale Sequenz zu identifizieren, die von AnkX/Lem3 akzeptiert wird, aber die Modifizierung endogener Rab1b-Proteine in Kombination mit optimierten Enzymen verhindert. Zu diesem Zweck

wurden von P. Ochtrop (Universität Umeå) 13 Peptide basierend auf der Sequenz ERFRTITSSYYRGG synthetisiert, die zu Alanin permutiert wurden. Diese wurden zunächst qualitativ auf ihre Phosphocholinierbarkeit durch AnkX untersucht. Ein beispielhaftes Massenspektrum des Peptids ERFRTATSSYYRGG vor (oben) und nach Inkubation (unten) mit AnkX und CDP-Cholin ist in Abbildung 25A dargestellt. Die übrigen Spektren sind im Anhang, Abbildung 59 und Abbildung 60, zu finden. Beim Wildtyp-Peptid (A1) sowie bei allen Peptiden, außer A8-A12, bei denen jeweils eine der unterstrichenen Aminosäuren in ERFRTITSSYYRGG durch Alanin substituiert wurde, konnte nach Inkubation mit AnkX und CDP-Cholin eine vollständige Massenverschiebung um ca. 165 Da verzeichnet werden, was der Masse der Phosphocholingruppe entspricht. Lediglich bei Peptid A7, bei dem das Isoleucin zu Alanin mutiert wurde, konnte nur eine unvollständige Modifizierung erzielt werden, was am Vorhandensein beider Peaks, von dem der eine dem unmodifizierten und der zweite dem modifizierten Peptid entspricht, zu erkennen ist (s. Abbildung 25A). Somit ist die Aminosäuresequenz (I)TSSYY elementar für die Modifizierung und die flankierenden Aminosäuren sind, teilweise eingeschränkt, austauschbar.

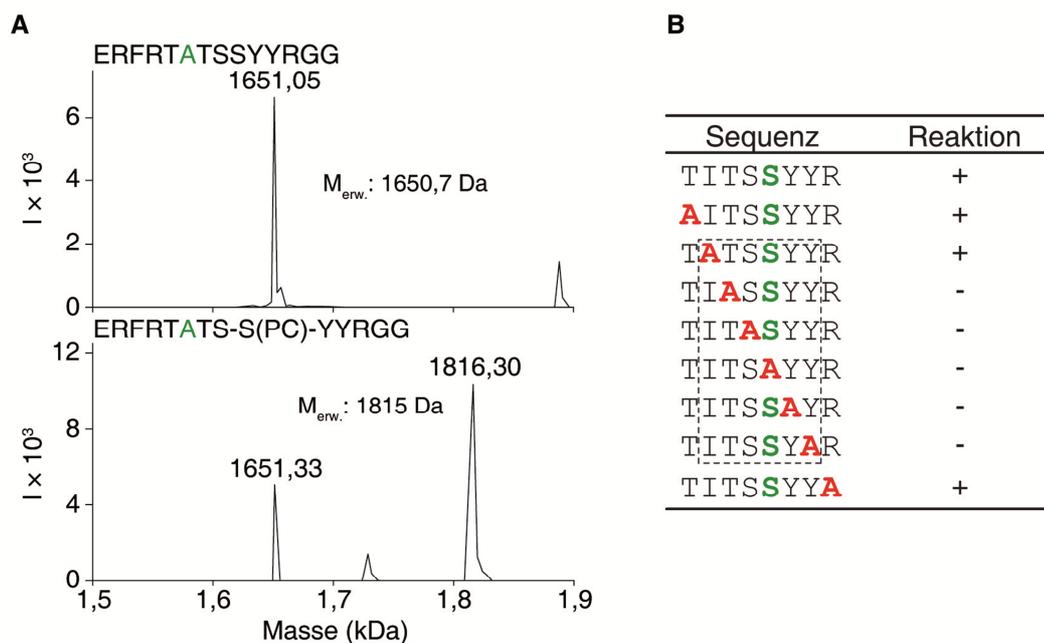


Abbildung 25: Analyse der Peptidsequenz mit Hilfe von Alaninmutanten. Die permutierten Peptide (500 μ M) wurden mit 1 μ M AnkX₁₋₈₀₀ und 5 mM CDP-Cholin in Inkubation und anschließend mittels ESI-MS analysiert. In A) ist beispielhaft das Spektrum von Peptid A7 mit der Sequenz ERFRTATSSYYRGG vor (oben) und nach der Modifikationsreaktion (unten) abgebildet. Es ist ein Massenzuwachs von ca. 165 Da und somit eine erfolgreiche Phosphocholinierung festzustellen. B) Zusammenfassung der Ergebnisse des Mutationsscreens, wobei lediglich die Octapeptidsequenz als bekanntes Kernmotiv dargestellt ist. Die flankierenden Aminosäuren des Motivs TITSSYYR haben sich als nicht essenziell für die Modifizierungsreaktion herausgestellt. Für die Phosphocholinierung ist das Pentapeptid TSSYY zwar ausreichend, aber eine katalytisch effiziente Modifizierung wird mit der Sequenz ITSSYY erreicht ($M_{\text{erw.}}$: erwartete Masse) (Heller, Ochtrop et al. 2015).

Auf die qualitative Analyse der Peptidsequenz folgte eine quantitative Analyse mit Hilfe der Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (*Reversed Phase* (RP)-HPLC), wobei die unterschiedlichen Retentionszeiten von phosphocholinierem und unmodifiziertem

Peptid ausgenutzt wurden, um den zeitlichen Fortschritt der Modifizierungsreaktion zu verfolgen (s. 6.2.2.6). Dadurch konnte bestätigt werden, dass das N-terminale Threonin und das C-terminale Arginin (TITSSYYR) keinen Einfluss auf die Phosphocholinierung durch AnkX haben und ihr Austausch zu Alanin sogar einen positiven Effekt auf die Modifizierungsrate des Peptids hat (s. Abbildung 26). Die geringe Bedeutung des Isoleucins in der Peptidsequenz konnte gegenüber der qualitativen Analyse hingegen nicht bestätigt werden, da dessen Substitution zu Alanin eine beachtliche Verringerung der Phosphocholinierungsrate um 73 % im Vergleich zum Wildtyp-Peptid verursachte. Untermuert wurde dieses Ergebnis durch die um den nahezu gleichen Wert (74 %) abgesenkte Modifizierungsrate des dreifach mutierten Peptids **AATSSYYA**, das zwar auch diejenigen Mutationen enthielt, die einen positiven Effekt auf die Phosphocholinierung haben, diese jedoch den negativen Einfluss der Mutation des Isoleucins nicht kompensieren konnten. Der ausschlaggebende Einfluss der Isoleucinmutation, neben der Threonin- und Argininmutation für die Phosphocholinierung des Peptids, wurde auch deutlich durch die identisch verlaufende Reaktionskinetik der Phosphocholinierung der Peptide **TATSSYYR** und **AATSSYYA** (vgl. blaue und orange Kurve in Abbildung 26).

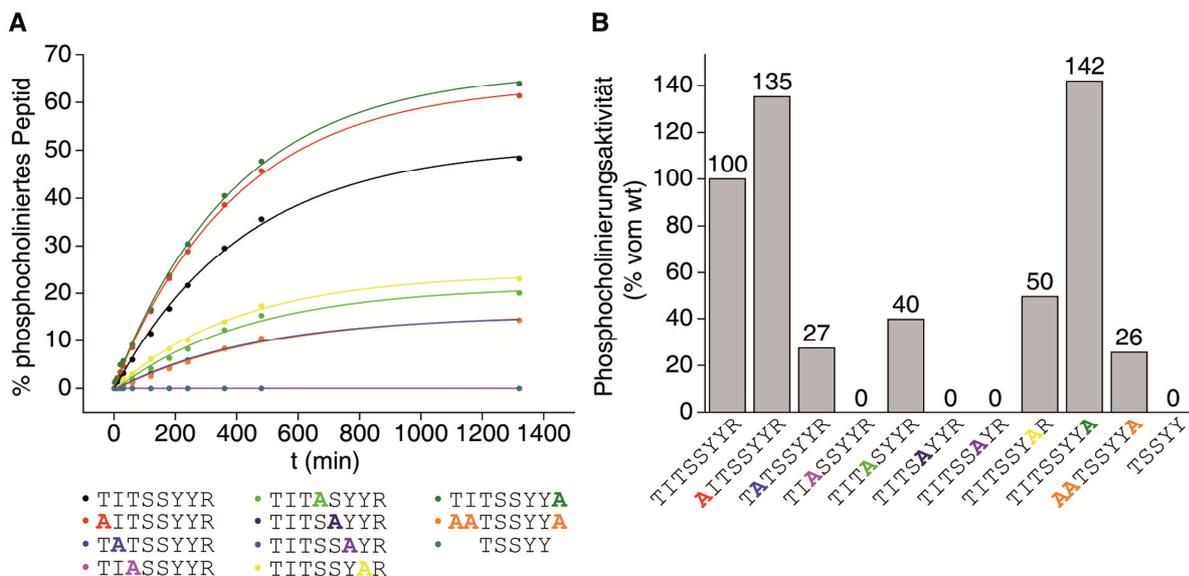


Abbildung 26: Quantitative Untersuchung von permutierten Octapeptiden. A) Die zeitaufgelösten Reaktionskinetiken der AnkX-katalysierten Phosphocholinierung von TITSSYYR-Mutanten wurden anhand der unterschiedlichen Retentionszeiten von modifiziertem und unmodifiziertem Peptid auf einer C4-HPLC-Säule aufgenommen und anschließend an eine Exponentialfunktion angepasst. Die resultierenden k_{cat}/K_M -Werte wurden mit dem Wildtyp-Peptid verglichen und in Relation zu diesem in Prozent umgerechnet (B). Daraus ergibt sich, dass ITSSYY die minimale Erkennungssequenz für eine effiziente Phosphocholinierung darstellt (Heller, Ochtrup et al. 2015).

Daraus muss abgeleitet werden, dass das Isoleucin wichtig für eine effiziente Phosphocholinierung und nicht austauschbar ist. Zudem wird dies durch die Erkenntnis bestätigt, dass am Pentapeptid TSSYY weder durch MS noch mittels RP-HPLC eine Modifikation nach Inkubation mit AnkX und CDP-Cholin nachzuweisen war, da in diesem Fall das Isoleucin

fehlte. Möglich ist aber auch, dass dieses Peptid zu kurz für die Interaktion mit AnkX ist und beispielsweise der freie C-Terminus am Tyrosin die Reaktion behindert.

Die Peptide **TIASSYYR**, **TITSAYYR** sowie **TITSSAYR** zeigten entsprechend der massenspektrometrischen Daten auch nach ca. 21 h (1300 min) keine Modifizierung, sodass das zweite Threonin, das zweite Serin sowie das erste Tyrosin in der Sequenz als essentiell für die Phosphocholinierung eingestuft werden können. Die Peptide **TITASYYR** und **TITSSYAR** erreichten entgegen der qualitativen Analyse des HPLC-basierten Experiments eine Phosphocholinierungsaktivität von 40 % bzw. 50 % im Vergleich zum Wildtyppeptid. Somit haben das erste Serin und das zweite Tyrosin in dem Erkennungsmotiv eine große Bedeutung für eine hocheffiziente Phosphocholinierung, diese wird aber nicht gänzlich verhindert, wenn eine dieser beiden Aminosäuren zu Alanin mutiert wird. Daher kann vermutet werden, dass diese beiden Aminosäuren durch jeweils eine der anderen 19 Aminosäuren substituiert werden könnten, was dann möglicherweise die Modifizierbarkeit des Peptids wieder steigert.

Die Analyse der Peptiderkennungssequenz hinsichtlich der Dephosphocholinierung durch Lem3 wurde mit synthetischen 12mer-Peptiden basierend auf der Wildtypsequenz **ERFRTITS-S(PC)-YYR** aus PC-Rab1b durchgeführt. Diese wurden permutiert zu Alanin, um die Wichtigkeit jeder einzelnen Aminosäure dieser Sequenz für die Dephosphocholinierung zu evaluieren. Für eine bessere Detektion bei der HPLC-Analyse wurden diese Peptidmutanten am N-Terminus zusätzlich mit einer fluoreszenten Dansylgruppe ausgestattet. Zunächst erfolgte eine qualitative Untersuchung der Demodifizierung der Peptidmutanten mittels ESI-MS, die von Proben vor und nach der Inkubation mit Lem3 durchgeführt wurden (s. Abbildung 27 und Anhang, Abbildung 61 und Abbildung 62). Alle Spektren der Proben nach Inkubation mit Lem3 zeigten einen um ca. 165 Da kleineren Massepeak als die entsprechenden Spektren der unbehandelten Peptide. Somit kann festgestellt werden, dass keine der Mutationen die Lem3-abhängige Abspaltung der Phosphocholingruppe vom Serin verhindert.

Um den genaueren Einfluss der einzelnen Aminosäuren auf die Aktivität von Lem3 zu analysieren, wurde die Dephosphocholinierungsrate der Peptidmutanten mittels RP-HPLC gemessen und anschließend verglichen (s. Abbildung 28). Hierbei stellte sich heraus, dass das erste Threonin in der Sequenz, wie auch bei der AnkX-abhängigen Phosphocholinierung, keine Bedeutung für die Demodifizierung durch Lem3 hat, da die entsprechende Mutante (**ERFRAITS-S(PC)-YYR**) sogar eine höhere Dephosphocholinierungsrate aufweist als das Wildtyppeptid. Die übrigen C-terminal von diesem Threonin liegenden Aminosäuren tragen hingegen stärker zu einer effizienten Abspaltung der PC-Gruppe durch Lem3 bei, da die entsprechenden Alaninmutanten Dephosphocholinierungsraten von maximal nur 53 % (im Fall von **ERFRTITS-S(PC)-AYR**) im Vergleich zum Wildtyp aufweisen.

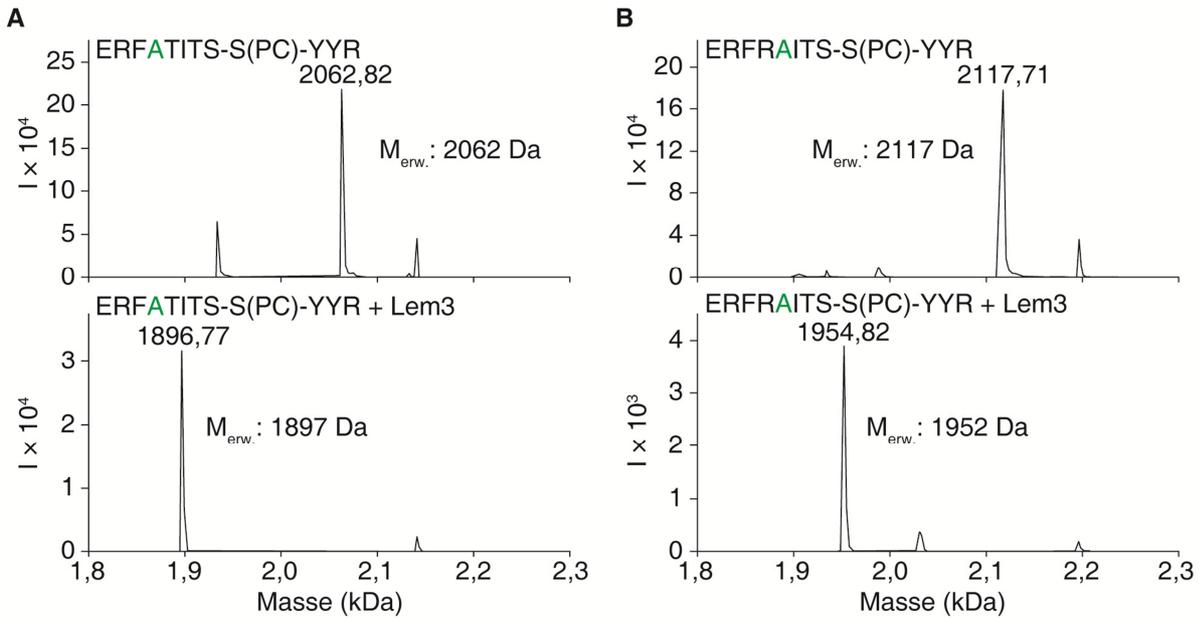


Abbildung 27: Qualitative Analyse der Dephosphocholinierung von Peptiden. Proben der Peptide vor und nach Inkubation mit Lem3 wurden massenspektrometrisch analysiert. Die Massenspektren von ERFATITSS-(PC)-YYR mit (oben) und ohne Modifikation nach Lem3-Reaktion (unten) sind in A) dargestellt. Die entsprechenden Spektren von ERFRAITSS-(PC)-YYR sind in B) gezeigt. Alle Mutanten stellten sich als Substrate für die Lem3-katalysierte Reaktion heraus ($M_{\text{erw.}}$: erwartete Masse) (Heller, Ochtrup et al. 2015).

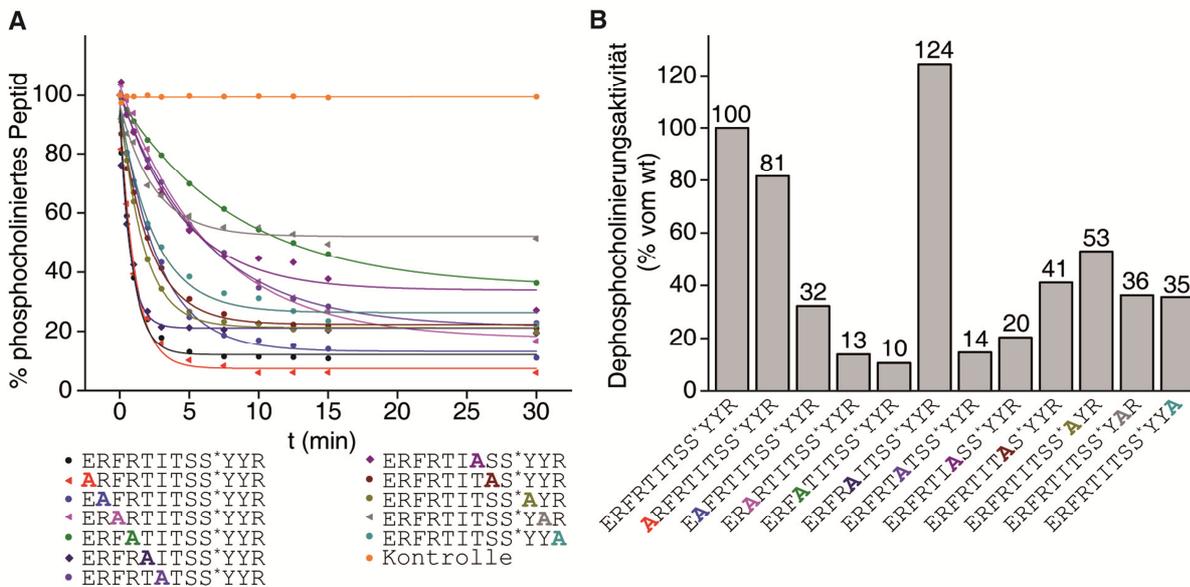


Abbildung 28: Quantitative Analyse der Dephosphocholinierung von Peptiden. A) Die zeitaufgelösten Demodifizierungskinetiken konnten anhand der unterschiedlichen Retentionszeiten von modifizierten und unmodifizierten Peptiden auf einer C4-HPLC-Säule bestimmt werden. Aus den Anpassungen der Daten an eine Exponentialfunktion wurde für jede Peptidmutante eine katalytische Effizienz bestimmt, die, ausgedrückt in Prozent von der Aktivität des Wildtyppeptids, in Abbildung B dargestellt ist. Diese Analyse zeigte, dass das erste Threonin in der Sequenz für die Lem3-katalysierte Reaktion unbedeutend ist. Die C-terminal darauf folgenden Aminosäuren sind hingegen wichtig und können nur eingeschränkt ausgetauscht werden. N-terminale Positionen dürfen außerdem nicht mit Alanin belegt werden (Heller, Ochtrup et al. 2015).

Am bedeutendsten unter diesen Aminosäuren scheinen das Isoleucin sowie das darauffolgende Threonin zu sein, da deren Substitution zu Alanin eine Absenkung der Dephosphocholinierungsaktivität auf 14 % bzw. 20 % hervorruft. Nicht zu erwarten war, dass auch die N-terminal zur Octapeptidsequenz TITSS-(PC)-YYR liegenden Aminosäuren teilweise einen

starken Einfluss auf die Demodifizierung durch Lem3 nehmen, wobei der Einfluss geringer ist, je weiter weg die Aminosäure von besagtem Threonin entfernt liegt. So sinkt beispielsweise die Dephosphocholinierungsrate von ERFATITS-S(PC)-YYR auf 10% im Vergleich zum Wildtyp, die von ARFRTITS-S(PC)-YYR hingegen nur auf 81 %.

Diese Ergebnisse zeigen, dass bezüglich der Octapeptidsequenz TITS-S(PC)-YYR alle Aminosäuren, außer dem ersten Threonin, bedeutend für die Lem3-katalysierte Demodifizierung sind und nur bedingt ausgetauscht werden können. Zudem kann aus den Ergebnissen abgeleitet werden, dass die N-terminal auf das Octapeptid folgende Sequenz ebenfalls eine Rolle spielt und in direkter Nachbarschaft des Threonins keine Alanine liegen sollten.

Zusätzlich zu den bisher genannten Peptiden, wurden noch verschiedene synthetische Octapeptide getestet, die sich nicht in ihrer Sequenz unterschieden, sondern dadurch, dass in jedem Peptid eine andere der insgesamt sechs vorhandenen Hydroxylfunktionen phosphocholiniert vorlag. Von diesen wurde neben TITS-S(PC)-YYR lediglich das Peptid TITSS-Y(PC)-YR von Lem3 dephosphocholiniert (s. Anhang, Abbildung 63). Dies zeigt, dass das Substratspektrum von Lem3 nicht auf phosphocholinierte Serine beschränkt ist und bietet Potenzial für eine gerichtete Evolution der Octapeptidsequenz hin zu Rab1b-orthogonalen Sequenzen. Das Peptid TITST-(PC)-YYR, das der Sequenz von Rab35 entspricht, konnte hingegen wie erwartet nicht durch Lem3 dephosphocholiniert werden.

3.3 Erzeugung und Untersuchung von künstlichen AnkX-Substraten

Für die Erzeugung von künstlichen AnkX/Lem3-Substraten durch die rekombinante Ausstattung von Proteinen mit dem Peptiderkennungsmotiv wurden drei verschiedene Modellproteine ausgewählt. Zum Einen wurde das etwa 100 Aminosäuren umfassende Protein SUMO (*small ubiquitin modifier*) ausgewählt, da es sehr klein, gut löslich und problemlos zu exprimieren ist (s. Abbildung 29A). Zum Anderen wurde das maltosebindende Protein (MBP) ausgewählt, weil es mit ca. 45 kDa wesentlich größer ist als SUMO, aber sich ebenfalls gut verhält, was Expression und Reinigung angeht (s. Abbildung 29B). Diese beiden Modellproteine sollten am N- oder C-Terminus mit der Erkennungssequenz ausgestattet werden und hinsichtlich ihrer Phosphocholinierbarkeit untersucht werden. Aus dem Vergleich der beiden unterschiedlich großen Proteine sollten Rückschlüsse bezüglich der von AnkX/Lem3 tolerierbaren Größe von Substratproteinen gezogen werden. Als drittes Modellprotein sollte der Rab1b-GEF DrrA hinzugezogen werden und sowohl an seinen Termini als auch in internen Schleifenregionen mit der Peptidsequenz ausgestattet werden, um die Zugänglichkeit des Peptids für AnkX/Lem3 nicht nur an terminalen Positionen des Proteins, sondern auch in Schleifenregionen zu testen (s. Abbildung 29C). Die GEF-Domäne von DrrA eignete sich besonders gut für diesen Zweck, da eine Röntgenkristallstruktur existiert, anhand welcher geeignete Regionen für die Insertion der Erkennungssequenz ausgewählt werden konnten. Außerdem ist DrrA im Gegensatz zu SUMO und MBP ein Enzym und besitzt eine katalyti-

sche Nukleotidaustauschaktivität, sodass die Auswirkungen der Peptidinsertionen und deren Phosphocholinierung auf die GEF-Aktivität mit Hilfe eines bereits etablierten Assays gemessen und evaluiert werden können.

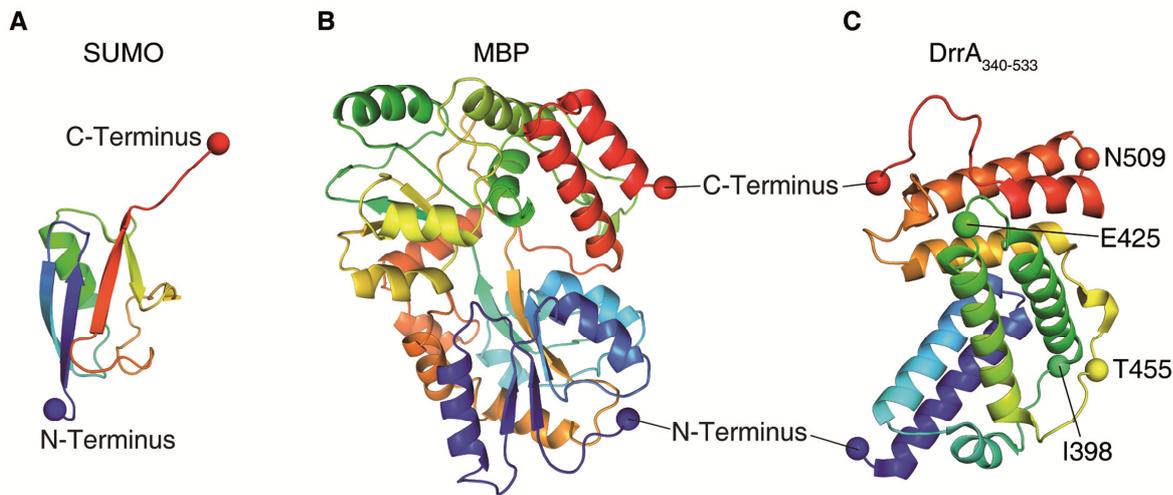


Abbildung 29: Röntgenkristallstrukturen der ausgewählten Modellproteine SUMO (A, PDB-ID: 1EUV) (Mossessova und Lima 2000), MBP (B, PDB-ID: 1ANF) (Quiocho, Spurlino et al. 1997) und DrrA₃₄₀₋₅₃₃ (C, PDB-ID: 3JZA) (Schoebel, Oesterlin et al. 2009). Die Strukturen sind farblich im Regenbogenspektrum dargestellt, vom C-Terminus in rot zum N-Terminus in blau. Mit Kugeln sind die α -Atome der Aminosäuren angedeutet, bei denen Peptidsequenzen angefügt bzw. inseriert wurden.

Die MBP- und DrrA-Varianten wurden unter meiner Anleitung von Florian B. Zauner während seiner Masterarbeit durch heterologe Expression rekombinant hergestellt und charakterisiert.

3.3.1 Modellproteine mit N- oder C-terminalem Erkennungspeptid (SUMO, MBP, DrrA)

Die Akzeptanz von AnkX für die Modellproteine SUMO und MBP, die jeweils am N- oder C-Terminus mit der Octapeptiderkennungssequenz TITSSYYR ausgestattet wurden und für DrrA, das C-terminal mit der Pentapeptidsequenz TSSYY fusioniert wurde, wurde zunächst qualitativ untersucht, indem die Protein-Peptid-Fusionskonstrukte in einer Konzentration von 50 μ M mit 500 nM AnkX₁₋₈₀₀ und 1 mM CDP-Cholin μ N inkubiert wurden. Im Anschluss wurden die Proteine mittels ESI-MS auf einen Massezuwachs überprüft. In allen Fällen, außer bei dem C-terminal modifizierten MBP und DrrA, konnte eine vollständige Umsetzung zum phosphocholinieren Produkt anhand eines Massezuwachses von ca. 165 Da beobachtet werden (s. Abbildung 30 und Abbildung 31). Bei MBP-TITSSYYR konnte neben dem Peak, der dem unmodifizierten Protein entsprach, lediglich ein kleiner Peak mit einer um ca. 165 Da größeren Masse detektiert werden, sodass festzustellen ist, dass das Peptid am C-Terminus von MBP ein sehr viel schlechteres Substrat für AnkX zu sein scheint, als das am N-Terminus von MBP fusionierte Peptid. Bei SUMO scheint es hingegen keinen Unterschied zwischen N- oder C-terminalem Peptid bezüglich der Erkennung durch AnkX zu geben. Im Fall von DrrA-TSSYY konnte im Gegensatz zu allen anderen Konstrukten unter den gewählten Bedingungen keine Phosphocholinierung verzeichnet werden.

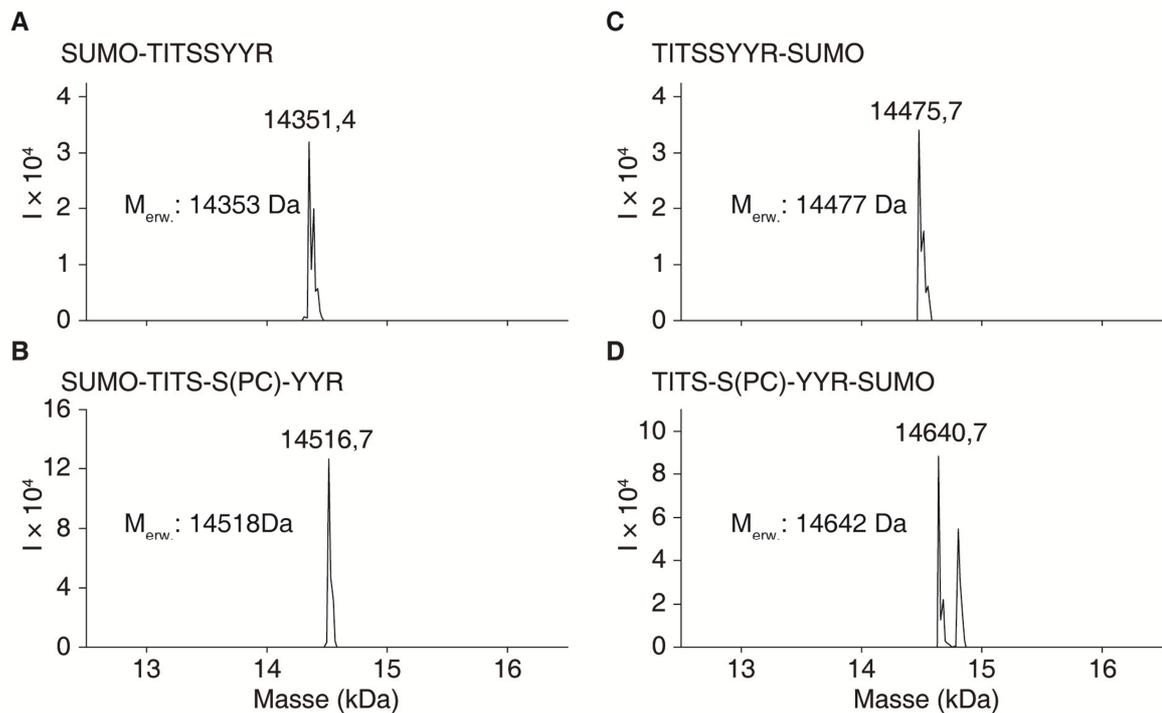


Abbildung 30: Massenspektren der SUMO-Peptidfusionskonstrukte vor und nach Inkubation mit AnkX₁₋₈₀₀ und CDP-Cholin. Sowohl bei SUMO-TITSSYYR (A und B) als auch bei TITSSYYR-SUMO (C und D) konnte nach der γ U-N Reaktion eine um ca. 165 Da größere Masse detektiert werden ($M_{\text{erw.}}$: erwartete Masse) (Heller, Ochtrop et al. 2015).

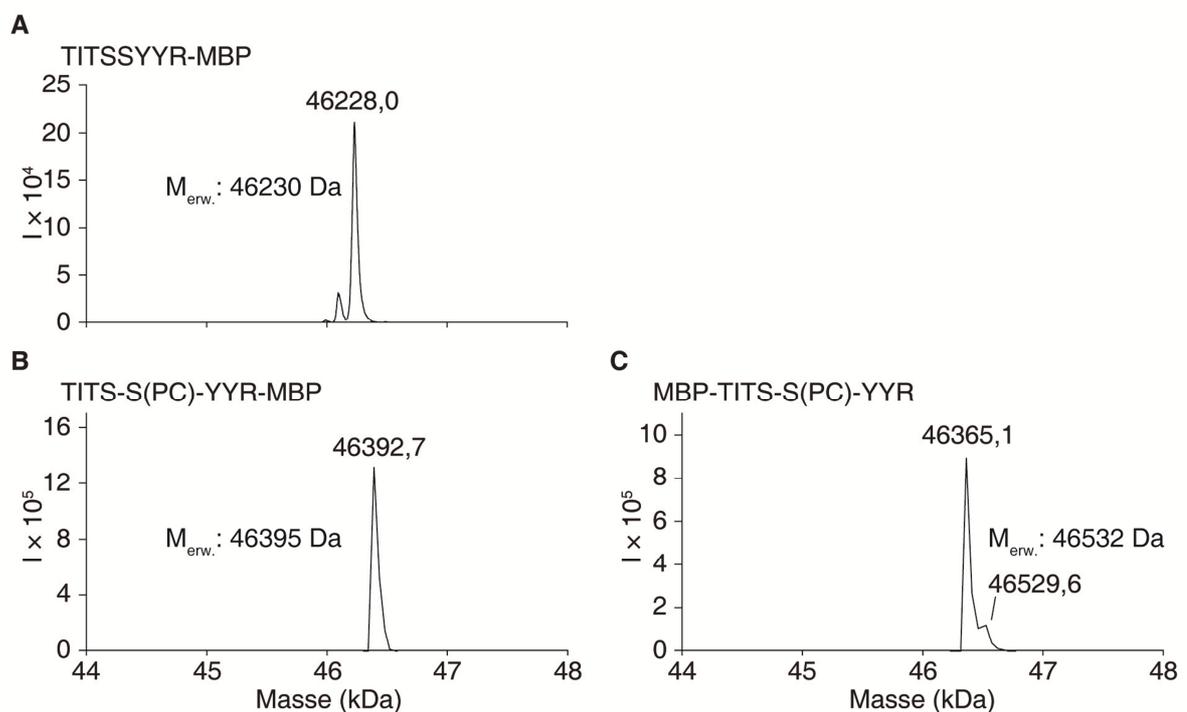


Abbildung 31: Massenspektren der MBP-Peptidfusionskonstrukte vor und nach Inkubation mit AnkX₁₋₈₀₀ und CDP-Cholin. Für TITSSYYR-MBP (A und B) konnte eine erfolgreiche Phosphocholinierung durch den Massezuwachs von ca. 165 Da verzeichnet werden. MBP-TITSSYYR (C) hingegen wurde in der gleichen Zeit nur zu einem geringen Anteil modifiziert ($M_{\text{erw.}}$: erwartete Masse) (Heller, Ochtrop et al. 2015).

Desweiteren wurde die Phosphocholinierung der im ersten Schritt identifizierten AnkX-Substrate mit Hilfe von Western Blot-Analysen quantifiziert (s. 6.2.2.2) (s. Abbildung 32).

Hierbei konnte im Gegensatz zur Massenspektrometrie auch eine Phosphocholinierung von MBP-TITSSYYR detektiert werden. Die Western Blots zeigten, dass die beiden SUMO-Konstrukte erst nach acht bzw. neun Stunden eine vollständige Phosphocholinierung aufweisen, wohingegen das natürliche AnkX-Substrat Rab1b schon nach nur wenigen Minuten eine 100 %ige Modifizierung erreichte (s. Abbildung 32A, B und C).

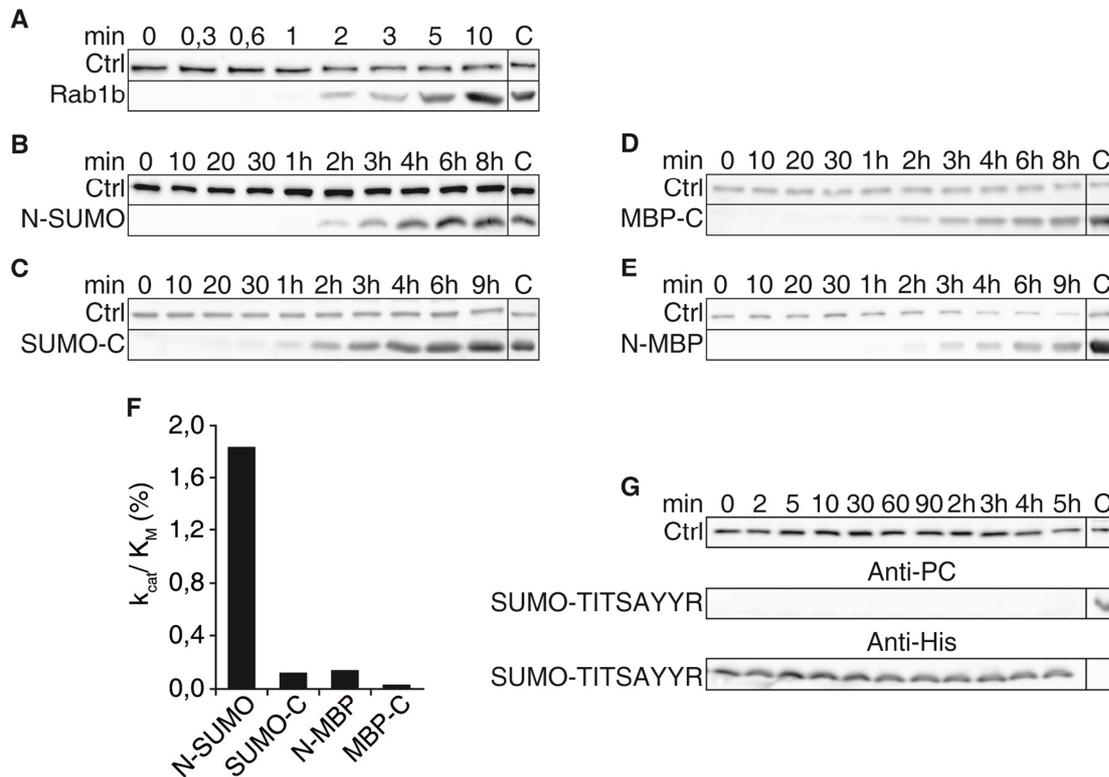


Abbildung 32: Zeitaufgelöste Western Blot-Analysen der Phosphocholinierung von verschiedenen Proteinsubstraten. Bei allen Western Blots wurde phosphocholinisiertes MBP-Rab1b als Ladekontrolle (Ctrl) mit aufgetragen. Außerdem wurde das jeweilige Zielprotein präparativ modifiziert und als vergleichende Kontrolle ebenfalls aufgetragen (C). A) Das natürliche AnkX-Substrat Rab1b wurde innerhalb von wenigen Minuten vollständig phosphocholinisiert. TITSSYYR-SUMO (N-SUMO) (B) und SUMO-TITSSYYR (SUMO-C) (C) wurden hingegen erst nach mehreren Stunden vollständig modifiziert. Mit Hilfe des Western Blots konnte auch eine Modifizierung von MBP-TITSSYYR (MBP-C) (D) detektiert werden, diese ist aber genauso wie im Fall von TITSSYYR-MBP (N-MBP) (E) auch nach acht Stunden noch nicht vollständig. Die densitometrische Auswertung der Western Blots resultierte in individuellen k_{cat}/K_M -Werten, die in Prozent vom natürlichen Substrat Rab1b in Teilabildung F) vergleichend dargestellt sind. Von den Modellproteinen ist TITSSYYR-SUMO mit ca. 2% das effektivste Substrat. G) Für die detektierte Phosphocholinierung ist tatsächlich das intakte Peptid TITSSYYR notwendig, da die Mutation des adressierten Serins zu Alanin keine Phosphocholinierung mehr erlaubt (Heller, Ochtrop et al. 2015).

Daher ist anzunehmen, dass die SUMO-Fusionskonstrukte schlechtere Substrate für AnkX sind als Rab1b. Gleiches trifft auf die MBP-Konstrukte zu, die beide auch nach acht bzw. neun Stunden keine vollständige Modifizierung aufweisen (s. Abbildung 32D und E). Durch densitometrische Auswertung der Western Blots konnte für jedes Fusionskonstrukt eine katalytische Effizienz (k_{cat}/K_M) bestimmt werden (s. Abbildung 32F und Anhang, Abbildung 64, Abbildung 65 und Abbildung 66). Auch hier zeigte sich, dass sämtliche Fusionskonstrukte im Vergleich zu Rab1b eine weniger als 2 %ige katalytische Effizienz haben und somit mindestens fünfzigfach schlechtere Substrate für die Phosphocholinierungsreaktion darstellen als

Rab1b. Zur Bestätigung, dass tatsächlich die Peptidsequenz und das darin enthaltene Serin für die Phosphocholinierung verantwortlich ist, wurde eine Alaninmutante des C-terminal mit der Erkennungssequenz ausgestatteten SUMO-Proteins (SUMO-TITSAYR) mit AnkX und CDP-Cholin inkubiert (s. Abbildung 32G). In diesem Fall konnte durch den Anti-PC-Antikörper kein phosphocholinisiertes Protein detektiert werden, woraus geschlussfolgert werden kann, dass die intakte Erkennungssequenz TITSSYYR für die Phosphocholinierung notwendig ist und keine anderen Aminosäuren der Modellproteine adressiert werden.

3.3.2 Modellproteine mit mutiertem Erkennungspeptid

Die anfängliche Hypothese, dass die Pentapeptidsequenz TSSYY möglicherweise ausreichend für eine erfolgreiche Phosphocholinierung ist, sollte auch anhand von Fusionskonstrukten mit Proteinen geprüft werden. In diesem Zusammenhang sollte ebenfalls untersucht werden, ob diese kurze Sequenz endständig, d.h. direkt auf das freie Amin des N-Terminus folgend bzw. mit der freien Carboxylgruppe des C-Terminus endend, als Substrat für AnkX dienen kann, oder ob flankierende Aminosäuren notwendig sind, um Abstand zu den freien Termini zu halten. Die mangelnde Modifizierbarkeit von DrrA-TSSYY, die in Abschnitt 3.3.1 dargelegt wurde, ist ein Hinweis darauf, dass der freie C-Terminus direkt am Ende der Erkennungssequenz nicht von AnkX toleriert werden kann. Zur weiteren Überprüfung dieser Erkenntnis wurde SUMO, das sich in den vorangegangenen Experimenten als bestes Modells substrat herausgestellt hatte, N-terminal mit den Peptiden AATSSYYA oder TSSYYA ausgestattet, sodass der freie N-Terminus im ersten Fall nicht direkt von der ersten Aminosäure der Zielsequenz (Threonin), sondern weiter entfernt von dieser von einem Alanin gebildet wurde und im zweiten Fall besagtes Threonin das freie Amin zur Verfügung stellte. Bei den C-terminalen Fusionskonstrukten wurde zum Einen die Sequenz AATSSYYA angefügt, bei der die letzte Aminosäure der Zielsequenz (Tyrosin) von einem Alanin flankiert wird. Zum Anderen wurde das Peptid AATSSYY fusioniert, sodass die freie terminale Carboxylgruppe des Proteins vom Tyrosin der Erkennungssequenz gebildet wird. Diese Peptid-Protein-Fusionskonstrukte wurden unter meiner Anleitung von Benjamin Heim im Zuge seiner Bachelorarbeit durch heterologe Expression rekombinant hergestellt. Die Überprüfung hinsichtlich der Phosphocholinierung durch AnkX erfolgte zunächst qualitativ über ESI-MS (s. Abbildung 33), wobei bei AATSSYYA-SUMO und SUMO-AATSSYYA (50 μ M) nach 24-stündiger Inkubation mit 1 μ M AnkX₁₋₈₀₀ und 1 mM CDP-Cholin zwei Massepeaks detektiert wurden, von denen der eine der Masse des jeweils unmodifizierten Proteins und der andere der Masse des modifizierten Proteins entsprach (s. Abbildung 33B und C). Somit kann festgestellt werden, dass unter diesen Bedingungen sowohl der freie C- als auch N-Terminus direkt am Peptid eine Hürde für die Phosphocholinierung durch AnkX darstellen, wohingegen die Konstrukte mit den zusätzlich flankierenden Alaninen gleichermaßen die Modifizierung ermögli-

chen wie TITSSYYR-SUMO bzw. SUMO-TITSSYYR. Dies geht einher mit dem Ergebnis, dass auch DrrA-TSSYY nicht modifiziert werden kann (vgl. 3.3.1).

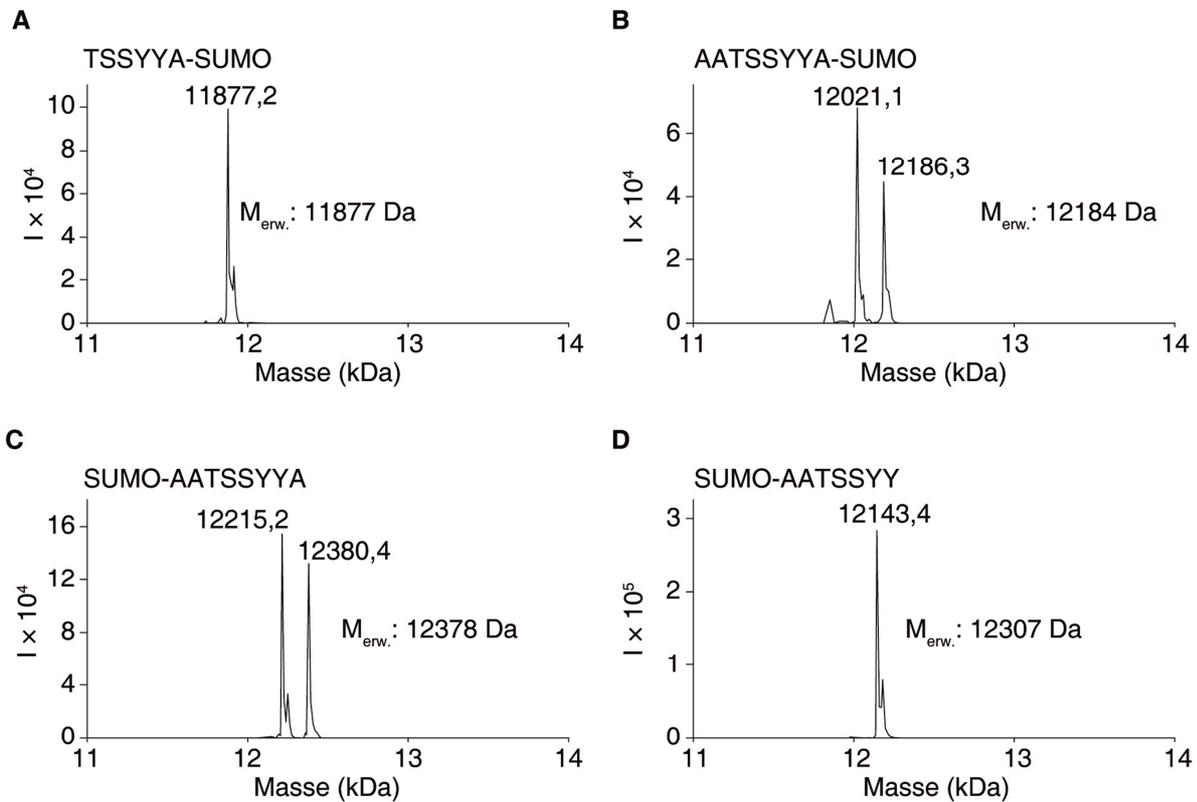


Abbildung 33: Massenspektren verschiedener SUMO-Peptid-Fusionskonstrukte nach Inkubation mit AnkX₁₋₈₀₀. Bei TSSYYA-SUMO (A) und SUMO-AATSSYY (D) konnte massenspektrometrisch keine Phosphocholinierung detektiert werden. Bei den anderen beiden Konstrukten AATSSYYA-SUMO (B) und SUMO-AATSSYYA (C) konnte jeweils nur eine partielle Modifizierung erzielt werden ($M_{\text{erw.}}$: erwartete Masse).

Zur weiteren Analyse wurde die Phosphocholinierung dieser SUMO-Konstrukte auch quantitativ mittels Western Blot erfasst (s. Abbildung 34).

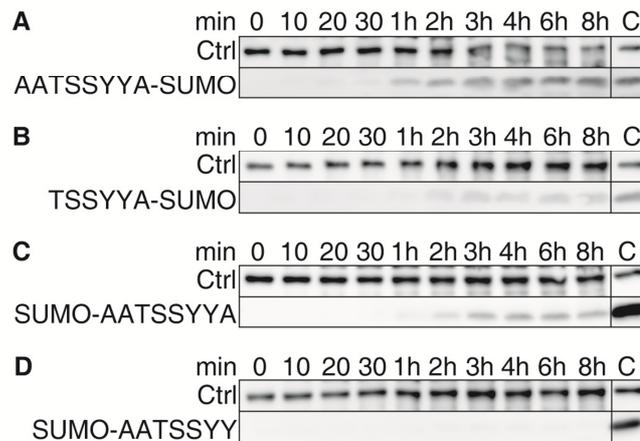
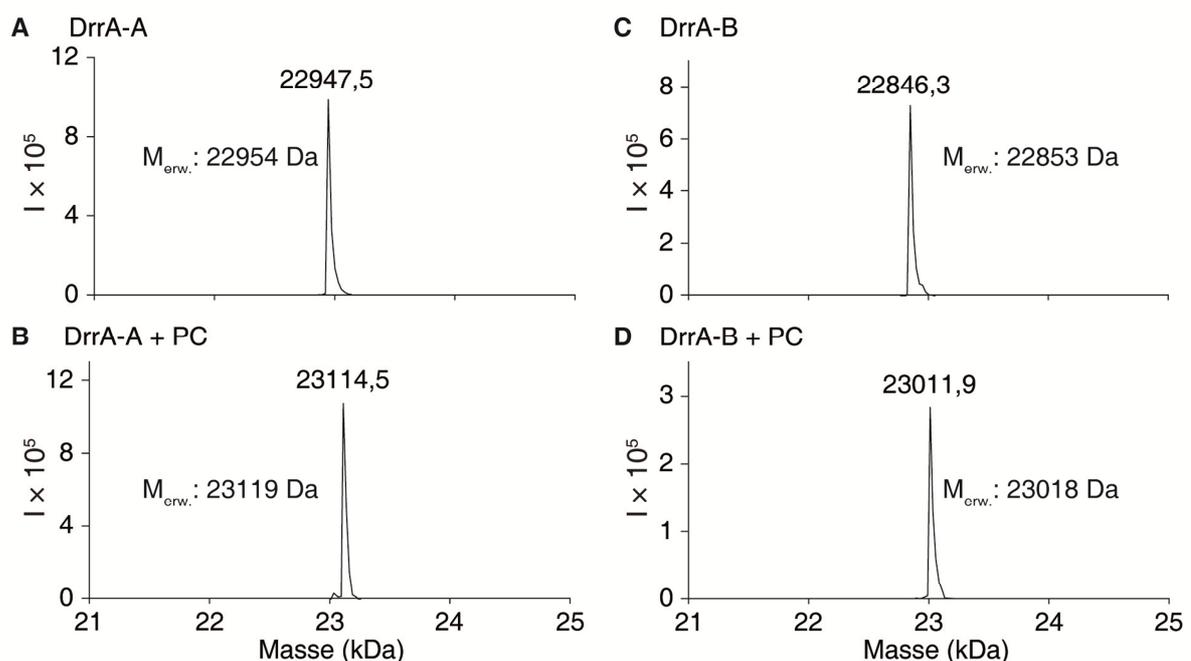


Abbildung 34: Quantitative Analyse der Phosphocholinierungsreaktion verschiedener SUMO-Peptid-Fusionskonstrukte mittels Western Blot gegen Phosphocholin. Mit dieser Methode konnte ebenfalls lediglich bei AATSSYYA-SUMO sowie SUMO-AATSSYYA eine solide Phosphocholinierung festgestellt werden. TSSYYA-SUMO zeigt nur eine äußerst geringe Modifizierung und mit SUMO-AATSSYY ist keine Phosphocholinierung detektierbar.

Dabei zeigte sich, dass TSSYYA-SUMO innerhalb von 8 h zu einem geringen Teil phosphocholiniert wird, aber ein viel schlechteres Substrat für AnkX darstellt als AATSSYYA-SUMO. Gleiches trifft auf SUMO-AATSSYYA zu, das nach 8 h im Vergleich zum präparativ phosphocholinierten Protein (Kontrolle C) eine schwache Modifizierung zeigt. Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass auch das kurze Pentapeptid für eine erfolgreiche Phosphocholinierung ausreichend, aber im Vergleich zum Octapeptid nicht effizient ist. Das Pentapeptid muss für eine quantitative und effiziente Modifizierung durch AnkX zudem von weiteren Aminosäuren flankiert werden.

3.3.3 Modellproteine mit inseriertem Erkennungspeptid (DrrA)

Die Möglichkeit der Insertion des Erkennungspeptids in Schleifenregionen von Proteinen wurde mit Hilfe des Rab1-GEF DrrA₃₄₀₋₅₃₃ überprüft. Hierbei wurden anhand der Röntgenkristallstruktur des Rab1b-DrrA₃₄₀₋₅₃₃-Komplex (PDB-ID: 3JZA) vier flexible Regionen, die keine Helix- oder Faltblattstrukturen ausbilden, ausgewählt, um so das Risiko der Fehlfaltung durch die Peptidinsertion zu minimieren (Schoebel, Oesterlin et al. 2009). Das Octapeptid wurde rekombinant zwischen die folgenden Aminosäurepaare eingefügt: E425-S426 (DrrA-A), T455-P456 (DrrA-B), N509-V510 (DrrA-C) und I398-S399 (DrrA-D). Alle Insertionskonstrukte wurden von Florian B. Zauner unter meiner Anleitung im Zuge seiner Masterarbeit rekombinant hergestellt. DrrA-D konnte im Gegensatz zu den übrigen Konstrukten nicht löslich exprimiert werden, weswegen die folgenden Experimente lediglich mit DrrA-A bis -C durchgeführt wurden. Qualitativ konnte bei allen drei DrrA-Varianten eine vollständige Modifizierung per ESI-MS detektiert werden (s. Abbildung 35), sodass davon auszugehen ist, dass die Erkennungssequenz in allen Fällen für AnkX zugänglich ist.



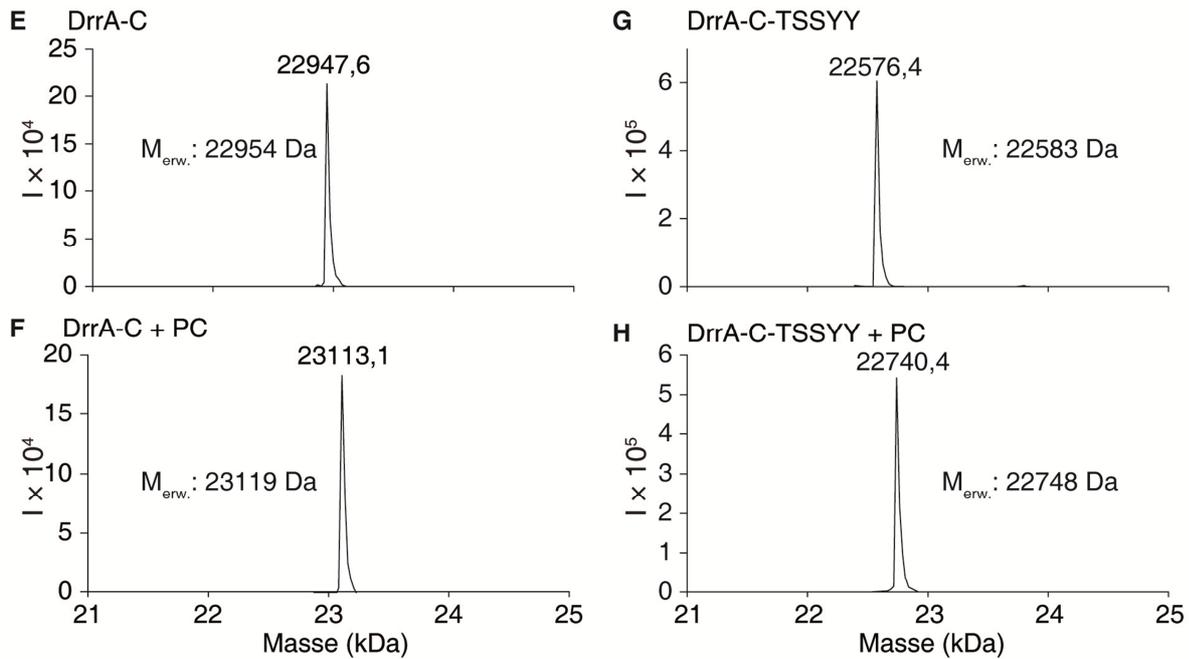


Abbildung 35: Qualitative Analyse der Phosphocholinierung von DrrA-Peptid-Insertionskonstrukten. Die DrrA-Konstrukte wurden in einer Konzentration von 50 μM mit 1 μM AnkX₁₋₈₀₀ und 1 mM CDP-Cholin üN inkubiert. Alle DrrA-Konstrukte (DrrA-A bis C) zeigten nach der Inkubation mit AnkX₁₋₈₀₀ und CDP-Cholin einen Massezuwachs von ca. 165 Da, der auf eine erfolgreiche Phosphocholinierung zurückzuführen ist ($M_{\text{erw.}}$: erwartete Masse) (Heller, Ochtrup et al. 2015).

Die quantitative Evaluierung der Phosphocholinierung der DrrA-Konstrukte mittels Western Blot und die anschließende densitometrische Auswertung zeigten, dass sich die drei Proteine mit der Octapeptidinsertion mit ungefähr der gleichen katalytischen Effizienz von ca. $10 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ phosphocholinieren lassen (s. Abbildung 36A-C). Die $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ -Werte entsprechen somit in etwa denen von SUMO-TITSSYYR oder TITSSYYR-MBP (s. Abbildung 37). Somit sind auch die DrrA-Peptidinsertionskonstrukte im Vergleich zum natürlichen Substrat Rab1b schlechtere Substrate für AnkX.

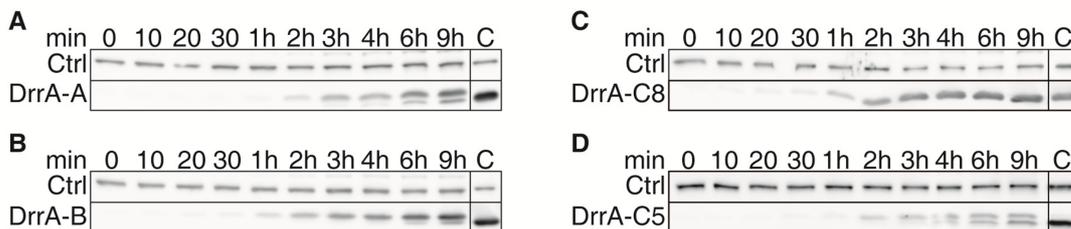


Abbildung 36: Zeitaufgelöste Analyse der Phosphocholinierung von DrrA-Insertionskonstrukten mittels Western Blot. Bei allen drei DrrA-Varianten konnte bereits nach 1 oder 2 h Inkubation mit AnkX₁₋₈₀₀ und CDP-Cholin eine anfängliche Phosphocholinierung beobachtet werden, die nach 9 h Reaktionszeit bereits weiter fortgeschritten war. Die durch densitometrische Auswertung der Western Blots erhaltenen katalytischen Effizienzen lagen bei allen DrrA-Octapeptid-Konstrukten bei ca. $10 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Heller, Ochtrup et al. 2015).

Von DrrA-C wurde noch eine weitere Variante mit dem Pentapeptid TSSYY zwischen den Aminosäurepositionen 509 und 510 an Stelle des Octapeptids angefertigt und hinsichtlich der Modifizierung untersucht. Auch in diesem Fall konnte sowohl durch qualitative als auch durch quantitative Analyse eine Phosphocholinierung von DrrA-C-Pentapeptid (DrrA-C5)

festgestellt werden, die weniger effizient zu sein scheint, als bei dem entsprechenden Octapeptidkonstrukt. Dennoch ist festzuhalten, dass eine prinzipielle Modifizierung des inserierten im Gegensatz zum terminalen Pentapeptid TSSYY möglich ist.

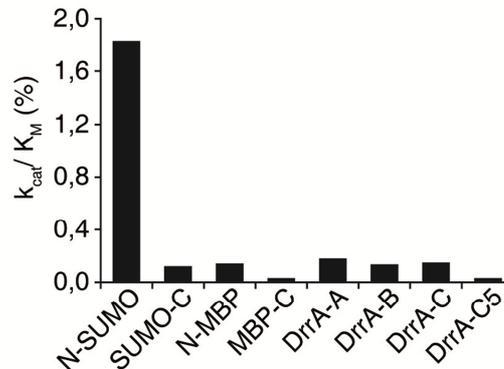


Abbildung 37: Vergleich der katalytischen Effizienzen der verschiedenen künstlichen AnkX-Proteinsubstrate. Die k_{cat}/K_M -Werte der DrrA-Konstrukte liegen mit $10 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ etwa im Bereich der katalytischen Effizienzen von SUMO-TITSSYYR oder TITSSYYR-MBP. Die Aktivitäten aller Proteine liegen mit Ausnahme von TITSSYYR-SUMO relativ weit unter der Aktivität von Rab1b mit $6670 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Heller, Ochtrop et al. 2015).

Um die Auswirkungen der verschiedenen Peptidinsertionen auf die GEF-Aktivität zu untersuchen, wurde mit allen DrrA-Varianten ein fluoreszenzspektrometrischer GEF-Assay durchgeführt. Dabei wurde der durch DrrA katalysierte Austausch von Rab1b-gebundenem GDP zu GTP durch die von diesem Vorgang abhängige Änderung der Fluoreszenzintensität intrinsischer Rab1b-Tryptophane verfolgt (Goody, Heller et al. 2012). Dazu wurde $1 \mu\text{M}$ Rab1b:GDP mit 1 mM GTP in der Fluoreszenzküvette vorgelegt und die Austauschreaktion mit der Zugabe von DrrA₃₄₀₋₅₃₃ (50 nM) oder einer der DrrA-Varianten (400 nM) gestartet. In Abbildung 38 sind die entsprechenden Kurven abgebildet. Es ist zu erkennen, dass sowohl das Octa- als auch das Pentapeptidinsertionskonstrukt von DrrA-C (hell- und dunkelgrüne Kurven) eine ähnlich schnelle Austauschreaktion erzielen wie der Wildtyp-GEF (schwarze Kurve), sodass geschlossen werden kann, dass die Insertion der AnkX-Erkennungssequenz zwischen N509 und V510 keine schwerwiegende Beeinträchtigung der Austauschaktivität des Enzyms hervorruft. Die Peptidinsertion C-terminal von E425 (DrrA-A, blaue Kurve) sowie von T455 (DrrA-B, rote Kurve) verursachte hingegen eine stärkere Inhibition der Austauschreaktion. Auf die gleiche Weise wurde der Einfluss der Phosphocholinierung der DrrA-Varianten auf deren Nukleotidaustauschaktivität untersucht. Dazu wurden DrrA-Proteine verwendet, die im Vorfeld präparativ phosphocholinieren wurden. Hierbei zeigte sich, dass die PC-Gruppe bezüglich der DrrA-C-Konstrukte keinen zusätzlichen Einfluss auf die katalytische Aktivität nimmt und die Austauschraten ungefähr denen der nicht phosphocholinieren Proteine entsprechen. Bei DrrA-A und DrrA-B hingegen wurde die ohnehin schon schwache Aktivität durch die Anbringung der PC-Gruppe noch weiter abgeschwächt. Somit ist abschließend festzustellen, dass die Einfügung des Octa- oder Pentapeptids in flexible Schleifenregionen von DrrA und deren Phosphocholinierung durch AnkX grundsätzlich mög-

lich ist, für eine maximale Aktivität des markierten Proteins allerdings eine Position ausgewählt werden muss, die keine katalytische Bedeutung hat.

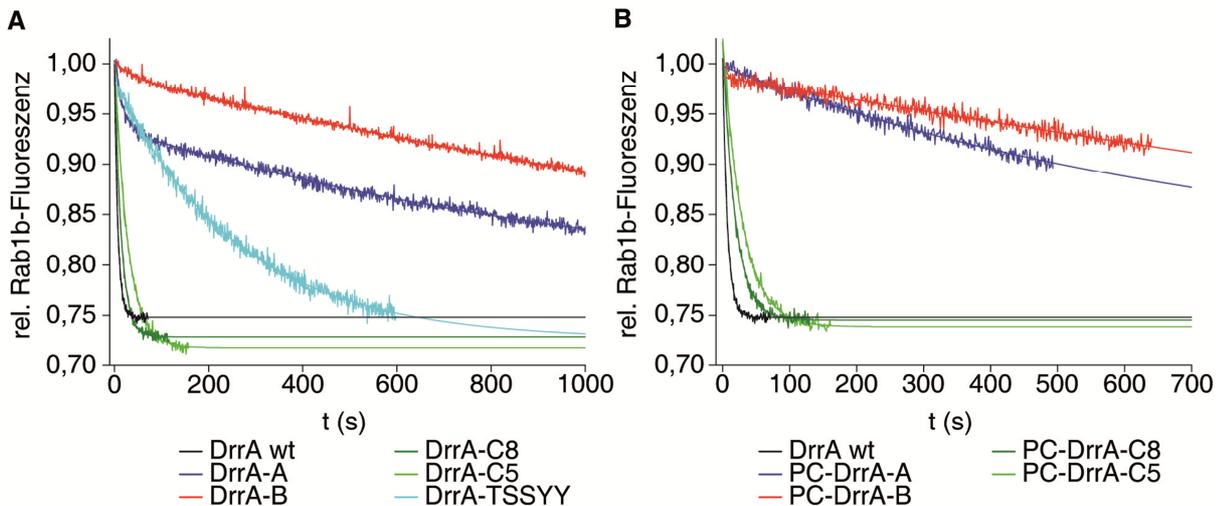


Abbildung 38: GEF-Assay zur Bestimmung der Nukleotidaustauschaktivität der DrrA₃₄₀₋₅₃₃-Peptid-Fusionskonstrukte für Rab1b im Vergleich zu Wildtyp-DrrA₃₄₀₋₅₃₃. Der Nukleotidaustausch wurde anhand der Änderung der Tryptophanfluoreszenzintensität des Rab-Proteins verfolgt. Dazu wurde 1 μM Rab1b₃₋₁₇₄ in der Küvette vorgelegt, 1 mM GTP zugefügt und die Reaktion mit 400 nM der DrrA-Varianten oder 50 nM DrrA wt gestartet. Die abgebildeten Graphen zeigen den jeweiligen Kurvenverlauf ab dem Zeitpunkt der Zugabe des GEF. A) Der GEF-Assay mit den unmodifizierten DrrA-Varianten zeigte, dass die beiden DrrA-C-Varianten (hell- bzw. dunkelgrüne Kurve, mit dem Octa- bzw. Pentapeptid zwischen N509 und V510) eine um den Faktor 30 bzw. 15 verringerte Aktivität im Vergleich zum Wildtyp haben (DrrA wt: $k_{\text{cat}}/K_M = 2.8 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, DrrA-C8: $k_{\text{cat}}/K_M = 0.9 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, DrrA-C5: $k_{\text{cat}}/K_M = 1.8 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$). DrrA-TSSYY, das das Pentapeptid am C-Terminus trägt, hat mit $9.6 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ eine ca. 300fach geringere Austauschaktivität als der Wildtyp. Die Kurven von DrrA-A und -B konnten aufgrund ihrer Biphasizität nur unzureichend gefittet werden, aber dennoch ist eine deutlich verringerte Reaktionsgeschwindigkeit festzustellen. B) Die präparativ phosphocholinierten DrrA-C-Varianten zeigten nahezu die gleiche Austauschaktivität wie die jeweils unmodifizierten Enzyme (DrrA-C8: $k_{\text{cat}}/K_M = 0.86 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, DrrA-C5: $k_{\text{cat}}/K_M = 1.3 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$). DrrA-A und DrrA-B zeigten hingegen eine weitere Verringerung der Aktivität verursacht durch die Modifikation. Die hier gezeigten Messungen wurden unter meiner Anleitung von Florian B. Zauner im Rahmen seiner Masterarbeit durchgeführt.

3.3.4 Demodifizierung der Modellproteine durch Lem3

Die Dephosphocholinierung sämtlicher als AnkX-Substrate identifizierter Protein-Peptid-Fusionskonstrukte wurde qualitativ überprüft, indem die zuvor präparativ phosphocholinierten Proteine mit Lem3 inkubiert und anschließend mittels ESI-MS hinsichtlich der Abspaltung der Phosphocholingrouppe untersucht wurden. Hierbei zeigten lediglich die Konstrukte TITS-S(PC)-YYR-SUMO, SUMO-TITS-S(PC)-YYR sowie TITS-S(PC)-YYR-MBP eine vollständige Abspaltung der Modifizierung durch Lem3 (s. Anhang, Abbildung 67). Bei allen übrigen Modellproteinen konnte keine Dephosphocholinierung durch Lem3 detektiert werden. Hinsichtlich der Konstrukte, die mit der Pentapeptid- an Stelle der Octapeptidsequenz ausgestattet waren, ist auffällig, dass keines dieser Proteine von Lem3 als Substrat akzeptiert wurde. Dies bestätigt die Ergebnisse des Alanin-Peptid-Screens (s. 3.2), die darauf hinwiesen, dass das Isoleucin der Sequenz TITSSYYR für eine erfolgreiche Demodifizierung durch Lem3 essentiell ist. Da dieses Isoleucin in den Pentapeptidkonstrukten fehlt, ist die Dephosphocholinierung nicht möglich.

3.4 Evaluierung von CDP-Cholin-Derivaten

Nach der Analyse der Peptiderkennungssequenz und der Modellproteine als Substrate für die Phosphocholinierung, war der nächste Schritt, die Evaluierung unterschiedlich derivatisierter CDP-Cholinmoleküle als Cosubstrate für AnkX bzw. Lem3. Zu diesem Zweck wurden von Philipp Ochtrup und Prof. Dr. Christian Hedberg von der Universität Umeå in Kooperation verschiedene CDP-Cholin-Varianten synthetisiert (für Synthesedetails s. (Heller, Ochtrup et al. 2015)). Diese wurden dann im Zuge dieser Arbeit als Substrate für die AnkX/Lem3-katalysierte Modifizierung von Rab1b und TITSSYYR-SUMO getestet.

3.4.1 Evaluierung nicht-fluoreszenter CDP-Cholin-Derivate

Zunächst wurden CDP-Cholin-Derivate für die Modifizierung von Rab1b erprobt, die als Intermediate der Synthese von CDP-Cholin-konjugierten Sonden entstanden sind (s. Abbildung 39). Mit diesen Vorläufermolekülen sollte die Akzeptanz von AnkX für derivatisiertes CDP-Cholin schon im Vorfeld abgeschätzt werden, um erste Hinweise bezüglich der Toleranz des Enzyms gegenüber niedriger substituierten Aminen an Stelle des quartären Ammoniums und PEG-Linkern zu erhalten. Zu diesen Molekülen gehörte das CDP-Ethanolamin, das an Stelle des quartären Ammoniums ein primäres Amin trägt, sowie dessen *tert*-Butyloxycarbonyl-(Boc)-geschützte Form (CDP-Ethanolamin-N-Boc). Außerdem wurde ein Derivat getestet, bei dem eine Methylgruppe am quartären Amin mit einem Boc-geschützten PEG-Linker substituiert wurde (CDP-Cholin-N-PEG₆-N'-Boc).

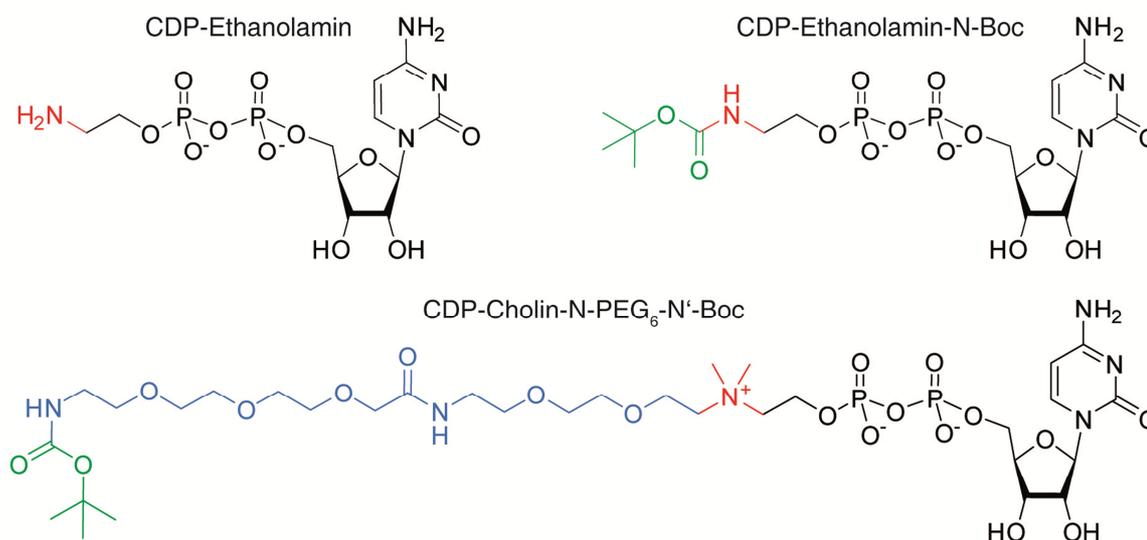


Abbildung 39: Strukturformeln von CDP-Cholin und den Derivaten CDP-Ethanolamin, CDP-Ethanolamin-N-Boc sowie CDP-Cholin-N-PEG₆-N'-Boc. Die Ammonium- bzw. Aminfunktion ist jeweils in rot hervorgehoben, der PEG-Linker in blau und die Boc-Schutzgruppe in grün.

Diese Derivate sollten als Substrate für die Modifizierung von Rab1b durch AnkX untersucht werden, um Rückschlüsse über die Toleranz von AnkX/Lem3 gegenüber anderen Aminen (primär statt quartär) sowie sterisch anspruchsvollen Gruppen (Boc) und langen PEG-

Linkern an der Aminfunktion ziehen zu können. Die Modifizierung mit diesen Nukleotiden wurde qualitativ untersucht, indem 50 μM Rab1b mit 1 mM Nukleotid und 100 nM AnkX üN inkubiert wurde und anschließend per ESI-MS auf einen entsprechenden Massenzuwachs überprüft wurde. Die zugehörigen Spektren sind in Abbildung 40 dargestellt.

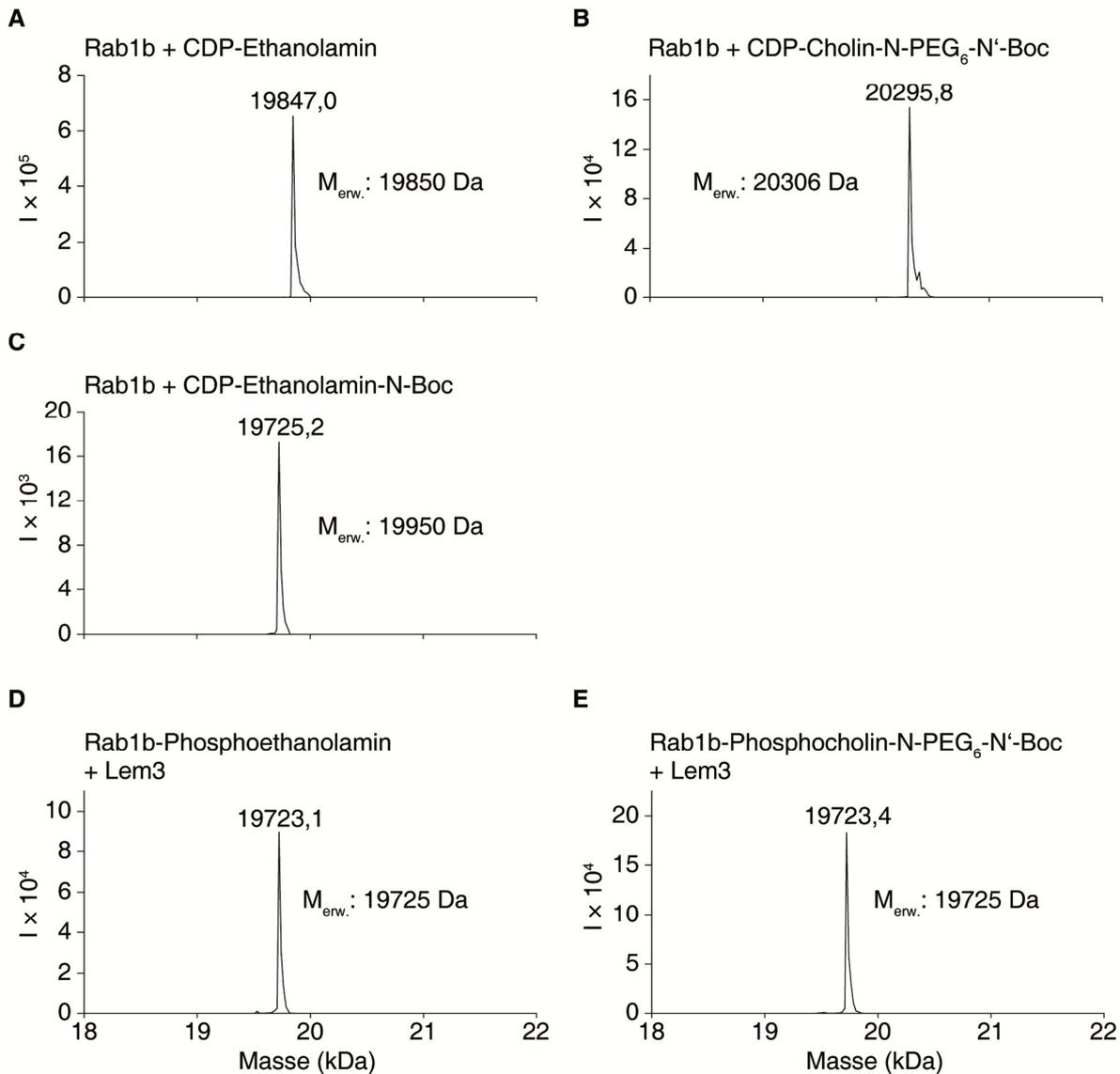


Abbildung 40: Massenspektren von Rab1b nach Reaktion mit AnkX₁₋₈₀₀ und jeweils einem der in Abbildung 39 dargestellten CDP-Cholin-Derivate (A-C). Sowohl bei der Reaktion mit CDP-Ethanolamin (A) als auch mit CDP-Cholin-N-PEG₆-N'-Boc (B) konnte ein Massezuwachs gegenüber dem Wildtypprotein (19729 Da), der in beiden Fällen der transferierten Gruppe entspricht, detektiert werden. Die Übertragung des Boc-geschützten Phosphoethanolamins konnte hingegen unter den gleichen Bedingungen nicht beobachtet werden. In D) und E) sind die Spektren von präparativ modifiziertem Rab1b nach Lem3-Zugabe abgebildet. Lem3 toleriert sowohl das Phosphoethanolamin (D) als auch das Phosphocholin mit dem Boc-geschützten PEG₆-Linker (E) und spaltet beide von Rab1b ab ($M_{\text{erw.}}$: erwartete Masse) (Heller, Ochtrup et al. 2015).

Sowohl mit CDP-Ethanolamin als auch mit CDP-Cholin-N-PEG₆-N'-Boc konnte eine Peakverschiebung zu größeren Massen, die der Größe des Phosphoethanolamins mit 125 Da bzw. der Größe des Phosphocholin-N-PEG₆-N'-Boc (574 Da) entsprachen, detektiert werden (s. Abbildung 40A und B), sodass festgestellt werden konnte, dass AnkX auch ein primäres

an Stelle eines quartären Amins sowie einen am Cholin verknüpften Boc-geschützten PEG-Linker akzeptiert. Im Gegensatz dazu konnte mit CDP-Ethanolamin-N-Boc keine Modifizierung von Rab1b erzielt werden (s. Abbildung 40C). Zur Untersuchung der Aktivität von Lem3 wurde Rab1b präparativ mit den zuvor identifizierten AnkX Substraten CDP-Ethanolamin und CDP-Cholin-N-PEG₆-N'-Boc modifiziert und anschließend mit 1 μ M Lem3 μ N inkubiert. Beide Modifikationen konnten durch Lem3 entfernt werden (s. Abbildung 40D und E), sodass auch hier festzustellen ist, dass Lem3 verschiedene Amine und auch den PEG-Linker toleriert.

3.4.2 Evaluierung fluoreszenter CDP-Cholin-Derivate

Auf der Grundlage der Erkenntnisse aus den zuvor getesteten Modifikationsexperimenten wurden zunächst CDP-Cholin-Konjugate mit Fluorescein als Reportermolekül analysiert. Der Fluorophor wurde dabei über unterschiedlich lange PEG-Linker (PEG₆, PEG₄ und PEG₂) mit dem Ammonium verknüpft (s. Abbildung 41), um so die minimale Linkerlänge und die Akzeptanz von AnkX/Lem3 für das sterisch relativ anspruchsvolle Fluorescein zu bestimmen.

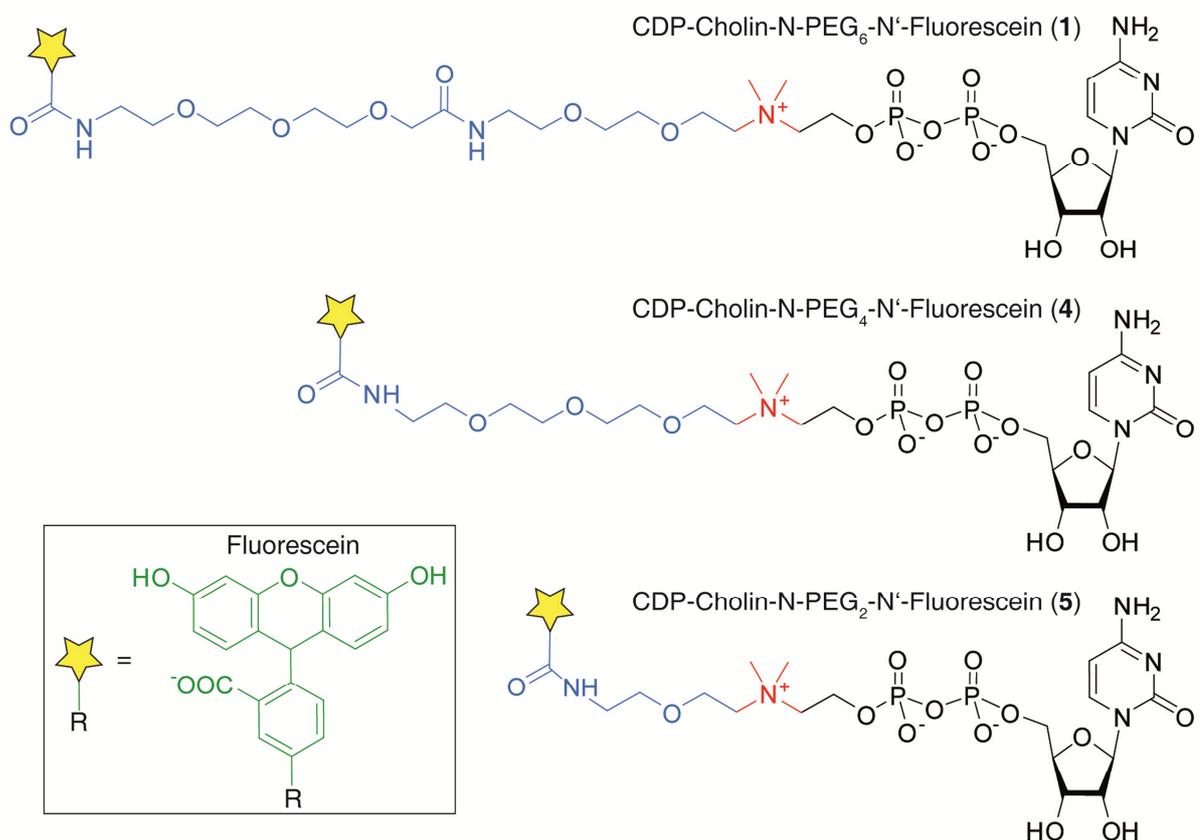


Abbildung 41: Strukturformeln der CDP-Cholin-Derivate, die über unterschiedlich lange PEG-Linker mit Fluorescein verknüpft wurden. Das quartäre Ammonium ist in rot und der PEG-Linker in blau hervorgehoben. Der Stern stellt die Sonde, in diesem Fall Fluorescein, dar. Derivat 1 enthält einen sechsgliedrigen, Derivat 4 einen viergliedrigen und Derivat 5 einen zweigliedrigen PEG-Linker.

Das qualitative Experiment mit 50 μ M Rab1b, 1 mM Nukleotid und 100 nM AnkX, die μ N zusammen inkubiert und anschließend mittels ESI-MS hinsichtlich einer Modifikation analysiert wurden, ergab, dass das Fluorescein grundsätzlich von AnkX akzeptiert wird, aber nur in

Kombination mit einem Linker, der mindestens vier PEG-Gruppen umfasst (s. Abbildung 42). Denn es zeigte sich, dass CDP-Cholin-N-PEG₂-N'-Fluorescein, das den kürzesten PEG-Linker aufweist, nicht von AnkX als Substrat akzeptiert wird (s. Abbildung 42C). Vermutlich ist in diesem Fall der Linker so kurz, dass das Fluorescein zu nah an der Nukleotidbindetasche von AnkX liegen und mit dieser kollidieren würde. Es wird folglich ein ausreichend langer Linker benötigt, der den Fluorophor aus der Nukleotidbindetasche herausragen lässt.

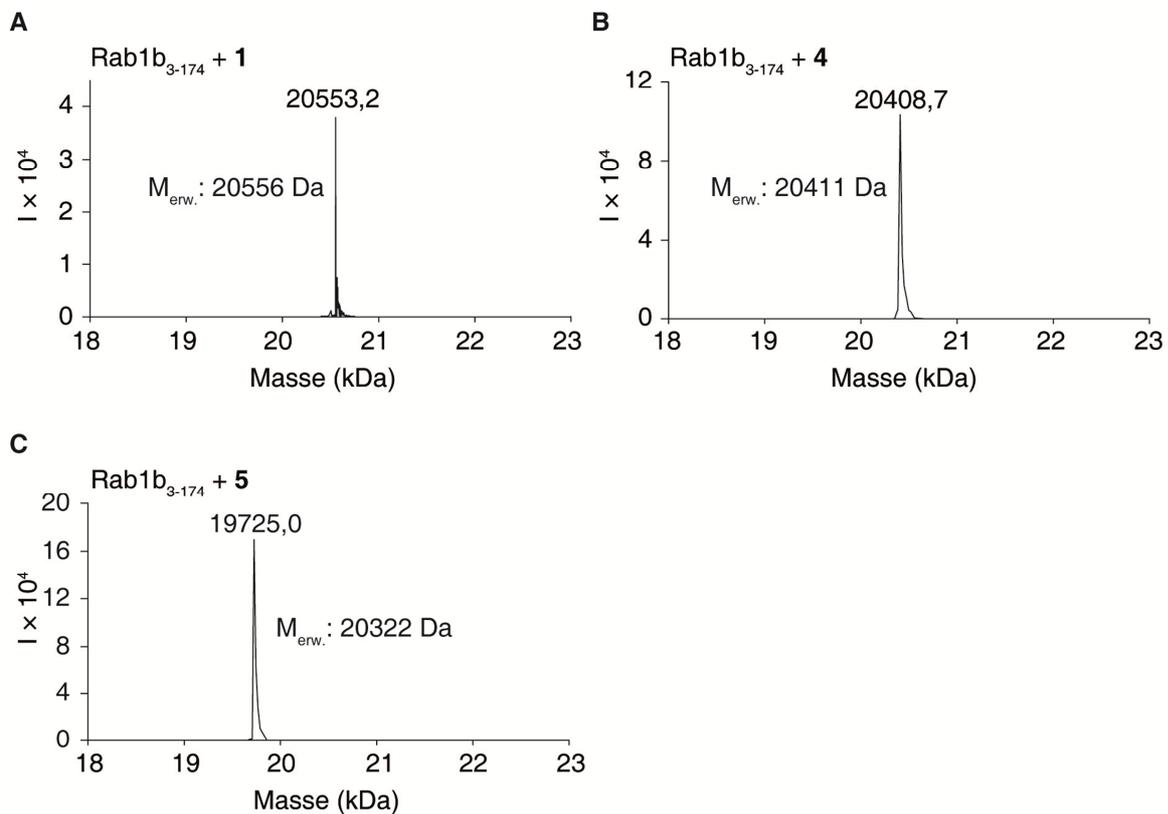


Abbildung 42: Massenspektren von Rab1b₃₋₁₇₄ nach Modifizierung mit Derivat **1** (A), **4** (B) oder **5** (C). Mit Derivat **5**, das den kürzesten PEG-Linker aufweist, konnte im Gegensatz zu den anderen beiden Derivaten keine erfolgreiche Modifizierung erzielt werden, da in diesem Fall lediglich ein Peak mit der Masse des unmodifizierten Rab-Proteins detektiert werden konnte (M_{erw.}: erwartete Masse) (Heller, Ochtrop et al. 2015).

Desweiteren wurden Derivate von CDP-Cholin-N-PEG₆-N'-Fluorescein (**1**) für die Modifizierungsreaktion getestet, bei denen das quartäre Amin entweder mit einer Ethergruppe oder einem tertiären Amin substituiert wurde (s. Abbildung 43). Damit sollte die Notwendigkeit der Anwesenheit einesamins und dessen Substituierung für die Modifizierung überprüft werden. Die massenspektrometrische Analyse ergab, dass das etherfunktionalisierte Nukleotid nicht als Substrat von AnkX akzeptiert wird, da keine Verschiebung des Rab1b-Peaks nach Inkubation mit dem Enzym und diesem Derivat detektiert werden konnte (s. Abbildung 44B). Mit dem Nukleotid, das an Stelle des tertiären ein quartäres Amin trägt, konnte hingegen eine vollständige Modifizierung von Rab1b erzielt werden (s. Abbildung 44A). Somit kann geschlossen werden, dass die Aminfunktion essentiell für einen erfolgreichen Transfer ist, deren Substituierungsgrad aber weniger bedeutend ist.

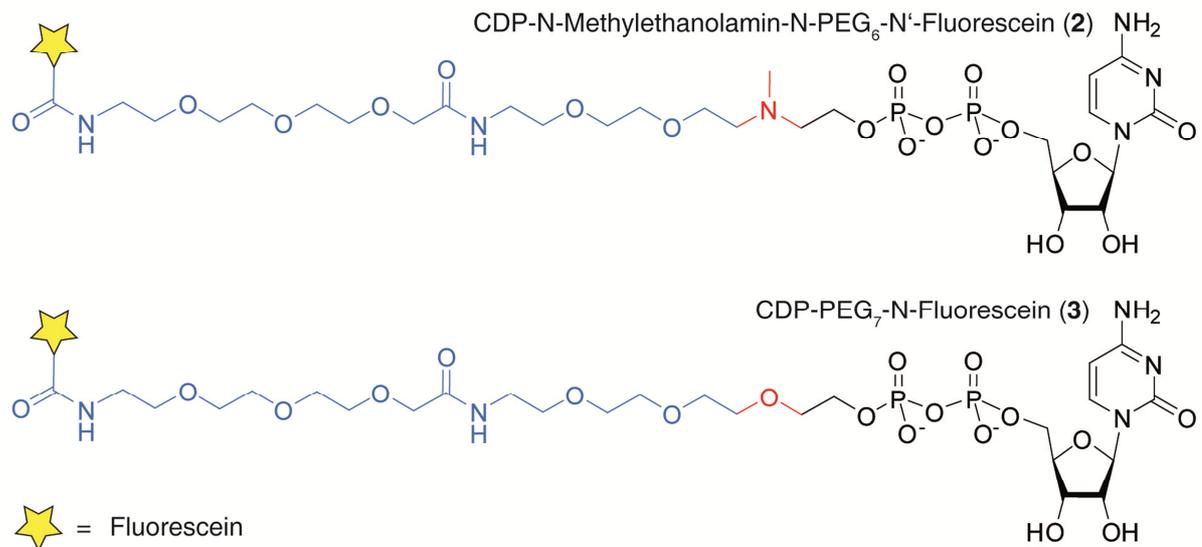


Abbildung 43: Strukturformeln von CDP-Cholin-Derivaten mit unterschiedlichen funktionellen Gruppen. Die funktionelle Gruppe, die das quartäre Ammonium ersetzt, ist jeweils rot hervorgehoben und der PEG-Linker in blau. Als Sonde wurde Fluorescein (Stern) mit dem Nukleotid verknüpft. Derivat **2** trägt an Stelle des quartären Ammoniuns ein tertiäres Amin und in Derivat **3** wurde das Ammonium mit einem Ether substituiert.

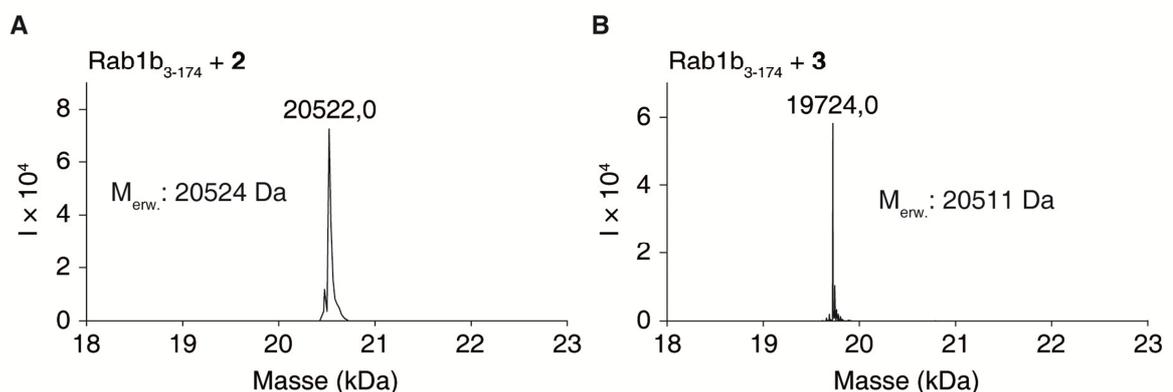


Abbildung 44: Massenspektren von Rab1b nach Inkubation mit Derivat **2** (A) oder **3** (B). Lediglich mit Derivat **2** (A) konnte ein Massenzuwachs des Rab-Proteins von ca. 800 Da detektiert werden, was der Masse des Phosphomethylethanolamin-N-PEG₆-N'-Fluorescein entspricht. Mit Molekül **3** (B) konnte hingegen keine Modifikation erzielt werden ($M_{\text{erw.}}$: erwartete Masse) (Heller, Ochtrup et al. 2015).

Hinsichtlich aller identifizierten AnkX-Nukleotidsubstrate (Derivat **1**, **2** und **4**) konnte massenspektrometrisch zudem eine erfolgreiche Abspaltung der Modifikationen durch Lem3 beobachtet werden, sodass festgestellt werden kann, dass Lem3 sowohl längere PEG-Linker, als auch das relativ große Fluorescein toleriert und gleichermaßen unterschiedlich substituierte Amine an der Cholin-Kopfgruppe akzeptiert.

Desweiteren wurde die Eignung der verschiedenen Nukleotid-Fluorescein-Konjugate für die AnkX-vermittelte Markierung von Rab1b mittels In-Gel-Fluoreszenz und Gel-Shift-Assay quantifiziert (s. 6.2.2.3) (s. Abbildung 45). Dabei konnte bestätigt werden, dass die Derivate **3** und **5** tatsächlich nicht für eine Modifizierung geeignet sind, denn es konnten keine fluoreszenten Banden im Gel detektiert werden (s. Abbildung 45A).

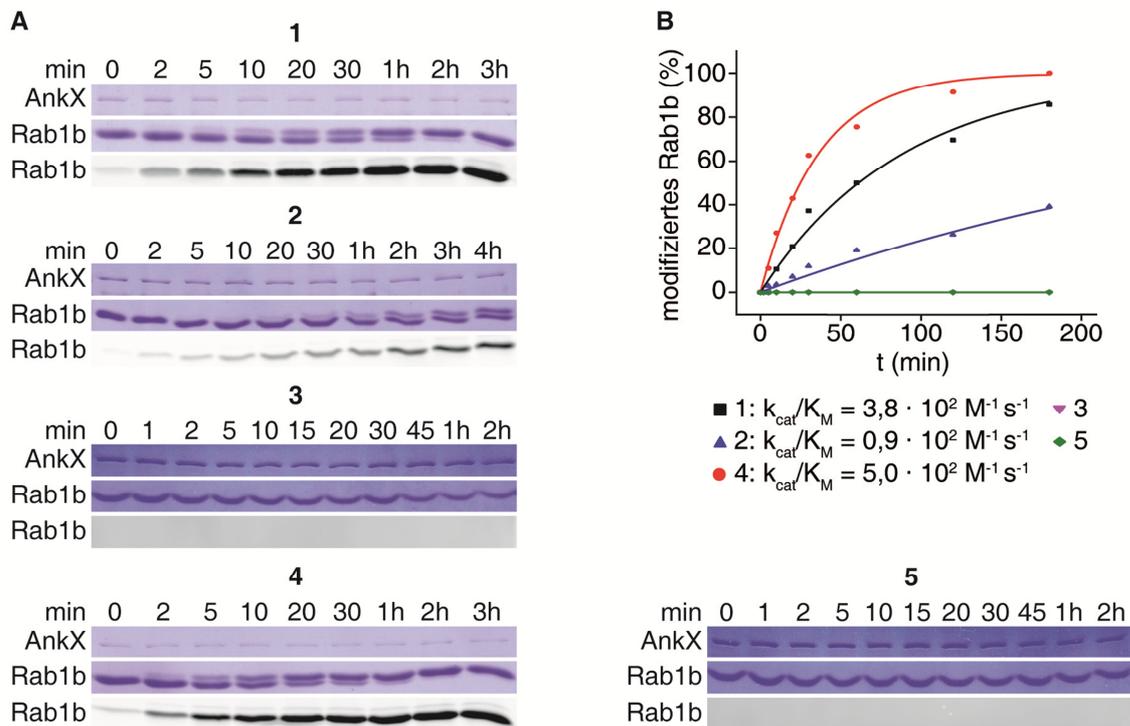


Abbildung 45: Quantifizierung der Modifizierung von Rab1b mit fluoreszenten Nucleotiden. A) Die Modifizierung von Rab1b mit den verschiedenen Nucleotid-Fluorescein-Konjugaten wurde zeitaufgelöst mittels In-Gel-Fluoreszenz sowie durch die Bandenverschiebung im Coomassie gefärbten Gel verfolgt. Mit Nucleotid **1**, **2** und **4** konnte eine Modifizierung anhand der Entstehung von fluoreszenten Rab-Banden innerhalb von 3-4 h detektiert werden, nicht aber mit Nucleotid **3** und **5**. B) Die Bandenverschiebung, die durch die fortschreitende Modifizierung verursacht wurde, wurde quantifiziert, gegen die Zeit aufgetragen und an eine Exponentialfunktion angepasst, sodass katalytische Effizienzen für jedes CDP-Cholin-Derivat ermittelt werden konnten. Derivat **4** ist mit einem k_{cat}/K_M von $5 \cdot 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ das Konjugat mit der höchsten Reaktivität (Heller, Ochtrop et al. 2015).

Bezüglich der übrigen drei Nucleotide konnte festgestellt werden, dass Derivat **4**, das die quartäre Ammoniumgruppe in Kombination mit dem PEG₄-Linker enthält, im Vergleich zu den anderen Nucleotiden **1** und **2** am besten für die Modifizierungsreaktion geeignet ist, da in diesem Fall eine quantitative Modifizierung bereits nach 2 h erreicht ist. Mit Derivat **1** ist die Markierung erst nach 3 h vollständig und mit Derivat **2** nach 4h nur etwa zur Hälfte. Diese Aktivitätsunterschiede spiegeln sich auch in den Unterschieden der katalytischen Effizienzen wider, wobei für die Reaktion mit Molekül **4** der k_{cat}/K_M -Wert bei $5 \cdot 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ liegt, wohingegen Derivate **1** und **2** niedrigere k_{cat}/K_M -Werte von $3,8 \cdot 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ und $0,9 \cdot 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ aufweisen (s. Abbildung 45B). Im Vergleich zur nativen Reaktion von Rab1b mit CDP-Cholin weist die Fluoreszenzmarkierung von Rab1b mit Nucleotidderivat **4** jedoch lediglich eine 13 %ige Effizienz auf (s. Abbildung 45B), sodass ausgesagt werden kann, dass die Ausstattung des Nucleotidsubstrats mit dem PEGylierten Fluorescein eine 7,5 fache Verringerung der Markierungseffizienz hervorruft.

Die Modifizierung mit den als AnkX-Substrate identifizierten Nucleotiden **1**, **2** und **4** sollte neben dem natürlichen Proteinsubstrat Rab1b auch auf die Modellproteine angewendet werden, um so die Kombination aus künstlichem Nucleotidsubstrat und künstlichem Proteinsubstrat für die AnkX-katalysierte Reaktion zu testen. Zu diesem Zweck wurde das Modellprotein

TITSSYYR-SUMO ausgewählt, das sich in den vorangegangenen Experimenten als bestes Proteinsubstrat herausgestellt hat (s. 3.3.1). Die Markierungsreaktionen von TITSSYYR-SUMO wurden ebenfalls mit Hilfe von In-Gel-Fluoreszenz und Gel-Shift-Assay quantitativ untersucht (s. Abbildung 46A). Dabei zeigte Derivat **4**, wie bei der Modifizierung von Rab1b, mit einem k_{cat}/K_M von $1,4 \cdot 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ im Vergleich zu Derivat **1** (k_{cat}/K_M : $0,4 \cdot 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) und Derivat **2** (k_{cat}/K_M : $0,1 \cdot 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) die höchste katalytische Effizienz (s. Abbildung 46B).

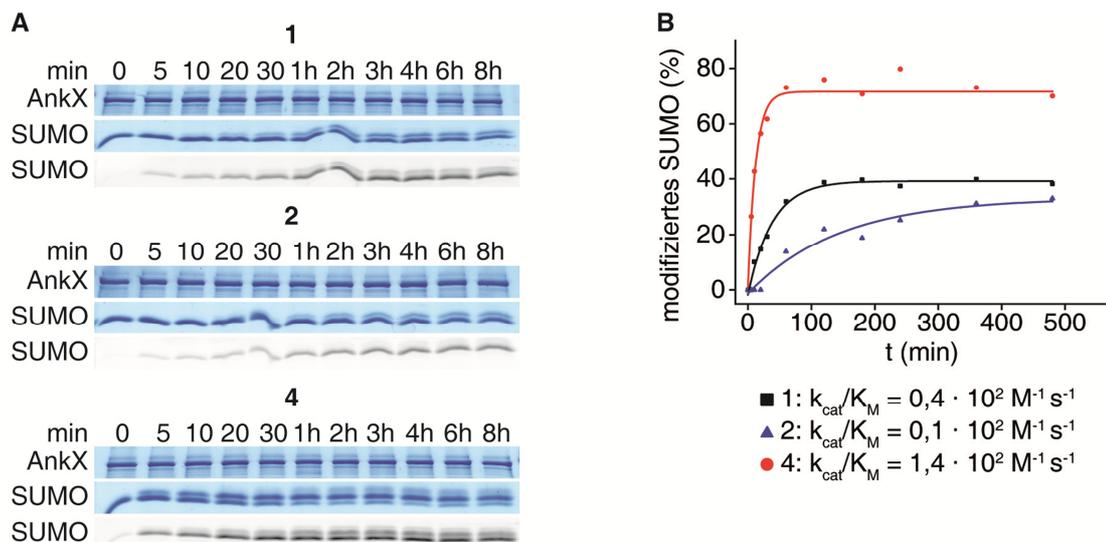


Abbildung 46: In-Gel-Fluoreszenz und Gel-Shift-Assay zur Quantifizierung der Markierung von TITSSYYR-SUMO mit Fluorescein. A) Mit allen drei getesteten Derivaten (**1**, **2** und **4**) können fluoreszierende Rab-Banden generiert werden, woraus eine erfolgreiche Markierung zu schließen ist. B) Die Quantifizierung der Bandenverschiebung des kollektiv gefärbten TITSSYYR-SUMO ergab k_{cat}/K_M -Werte von $1,4 \cdot 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ für Molekül **4**, $0,4 \cdot 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ für Molekül **1** und $0,1 \cdot 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ für Molekül **2** (Heller, Ochtrop et al. 2015).

Außerdem ist Nukleotidderivat **1** etwas besser geeignet als Nukleotid **2**, was ebenfalls eine Parallelität zur Rab1b-Markierung darstellt. Es ist also festzuhalten, dass Nukleotid-Konjugat **4** sowohl bei der Markierung von Rab1b als auch von TITSSYYR-SUMO die vergleichsweise höchste Effizienz aufweist (s. Abbildung 47). Die Markierung von TITSSYYR-SUMO mit Nukleotid **4** hat außerdem eine ähnlich hohe katalytische Effizienz wie die entsprechende Reaktion mit dem natürlichen Cosubstrat CDP-Cholin (k_{cat}/K_M von $1,2 \cdot 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) (vgl. Abbildung 32), sodass angenommen werden kann, dass die Addition des PEG₄-Linkers zusammen mit dem Fluorescein an das CDP-Cholin im Fall der Markierung von TITSSYYR-SUMO keine zusätzlichen Einbußen bezüglich der Reaktionseffizienz verursacht und die Verschlechterung dieser im Vergleich zur nativen Reaktion (Rab1b mit CDP-Cholin) ausschließlich auf das Modellprotein zurückzuführen ist.

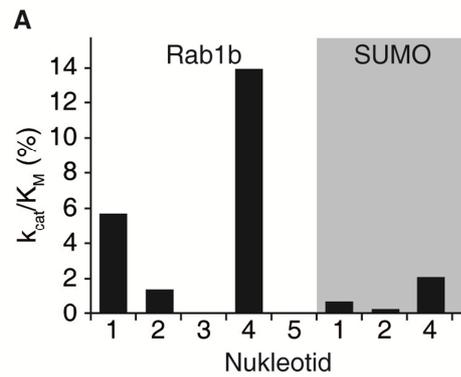


Abbildung 47: Vergleich der katalytischen Effizienzen der Modifizierungsreaktionen von Rab1b und TITSSYYR-SUMO mit verschiedenen Fluorescein-Nukleotid-Konjugaten. Nukleotid **4** weist sowohl hinsichtlich der Modifikation von Rab1b als auch von TITSSYYR-SUMO mit 14 % bzw. 2 % die vergleichsweise höchsten katalytischen Effizienzen hinsichtlich der Modifizierungsreaktion auf (Heller, Ochtrup et al. 2015).

Desweiteren wurde auf die gleiche Art und Weise die Demodifizierung der mit den Cosubstraten **1**, **2** und **4** präparativ modifizierten Proteinsubstrate Rab1b und TITSSYYR-SUMO durch Lem3 (2 μM) untersucht (s. Abbildung 48). Bezüglich der Demodifizierung von Rab1b konnte in allen drei Reaktionen bereits nach wenigen Minuten nur noch die Bande, die dem unmodifizierten Protein entspricht, detektiert und somit die vollständige Abspaltung der Markierung festgestellt werden (s. Abbildung 48A und B). Mit einer katalytischen Effizienz von $7,4 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ war in diesem Fall die Abspaltung des Phosphocholin-N-PEG₆-N'-Fluoresceins (Derivat **1**) am effektivsten. Darauf folgte mit einem sehr ähnlichen $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ von $6,6 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ die Reaktion des mit Nukleotidderivat **2** modifizierten Rab1b. Das mit dem tertiären Amin-PEG₆-Fluorescein-Konjugat markierte Rab1b zeigte hingegen mit einem $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ von $3,9 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ eine um ca. 50 % langsamere Reaktion als das beste Lem3-Substrat. Ein etwas anderes Bild ergibt sich allerdings bei den entsprechenden Lem3-katalysierten Reaktionen mit fluoreszenzmarkiertem TITSSYYR-SUMO (s. Abbildung 48C und D). Die katalytischen Effizienzen lagen alle in derselben Größenordnung wie bei den Reaktionen mit modifiziertem Rab1b, aber in diesem Fall scheint das Phosphocholin-N-PEG₄-N'-Fluorescein am effizientesten abgespalten zu werden ($k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ von $1,6 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$). Die anderen beiden Markierungen eignen sich mit $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ -Werten von 5,6 bzw. $6,0 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ nur etwa halb so gut für eine effektive Abspaltung durch Lem3. Bei den Reaktionen mit markiertem SUMO ist zudem auffällig, dass bei keiner Spezies eine vollständige Demodifizierung erreicht wurde und auch nach einer Inkubationszeit von 4 h im Fluoreszenzgel immer noch leicht fluoreszierende Banden detektiert werden konnten. Hingegen waren schon nach wenigen Minuten keine Doppelbanden im coomassiegefärbten Gel mehr zu sehen, was auf eine vollständige Abspaltung der Markierung schließen ließ.

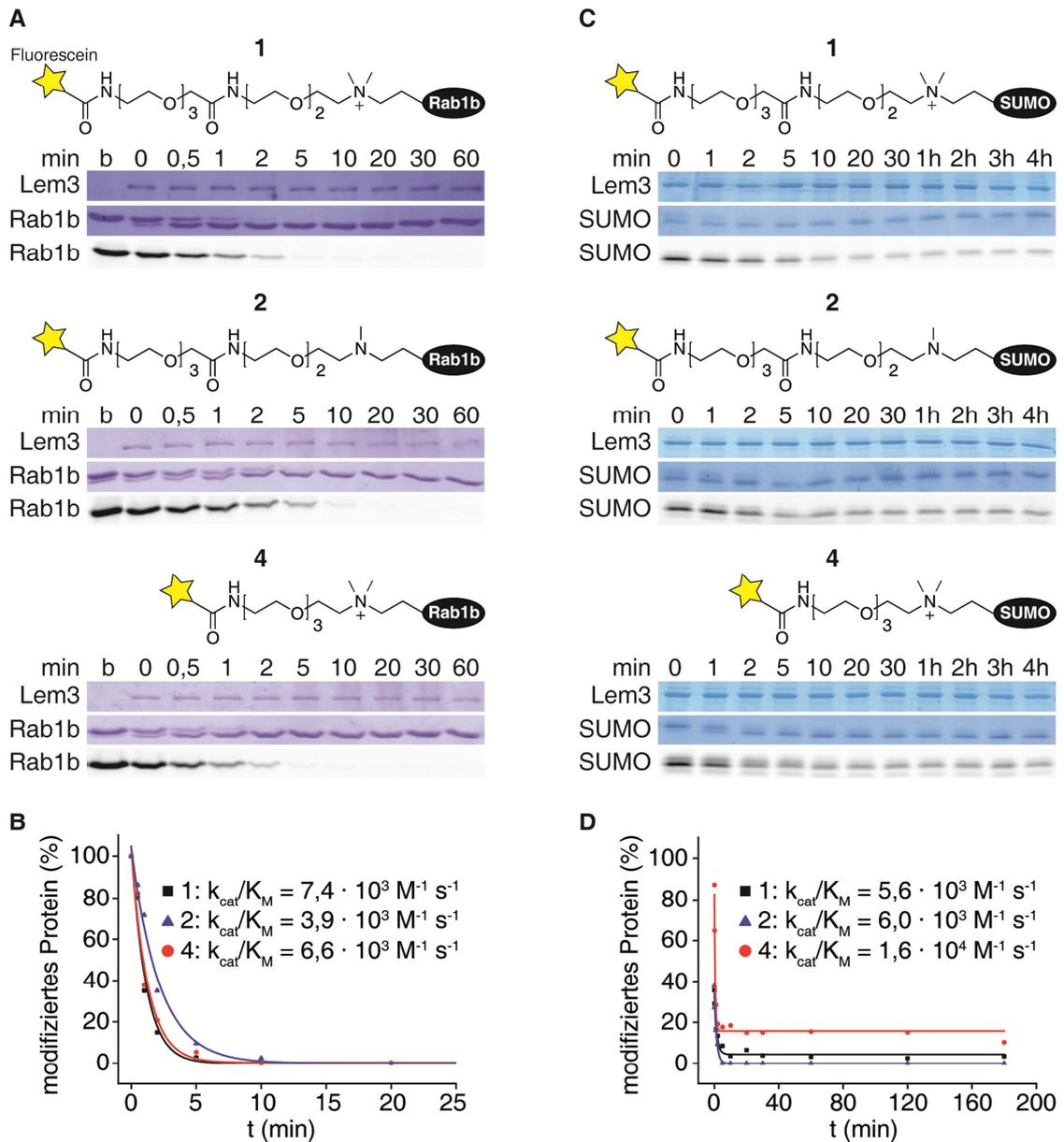


Abbildung 48: Quantifizierung der Lem3-abhängigen Abspaltung der Fluoreszenzmarkierung von Rab1b und TITSSYYR. A) Bei allen drei modifizierten Rab1-Proteinen konnte eine Abnahme der Fluoreszenzintensität der Proteinbanden mit der Zeit beobachtet werden, sodass festgestellt werden kann, dass Lem3 alle Phosphocholin-Derivate toleriert und von Rab1b abspalten kann. B) Die Quantifizierung der entsprechend der voranschreitenden Demodifizierung verstärkten Bandenverschiebung, ergab, dass die Derivate **1** und **4** mit katalytischen Effizienzen von $7,4 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ bzw. $6,6 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ am effizientesten durch Lem3 abgespalten werden können. C) Bezüglich des mit Nukleotid **1**, **2** oder **4** modifizierten TITSSYYR-SUMO konnte in allen Fällen eine Lem3-abhängige Abnahme der Fluoreszenzbanden detektiert werden. D) Die Quantifizierung der Bandenverschiebung ergab k_{cat}/K_M -Werte von $6,0 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ für das mit Derivat **2** modifizierte Protein, $5,6 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ für Derivat **1**, sowie $1,6 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ für Derivat **4**, welches somit mit der höchstens Effizienz von Lem3 abgespalten wird (Heller, Ochtrop et al. 2015).

Zuletzt wurden noch CDP-Cholin-Derivate, die mit anderen Fluorophoren konjugiert waren, für die Modifizierung von Rab1b durch AnkX getestet, um ausschließen zu können, dass AnkX außer Fluorescein keine anderen Sonden akzeptiert (s. Abbildung 49).

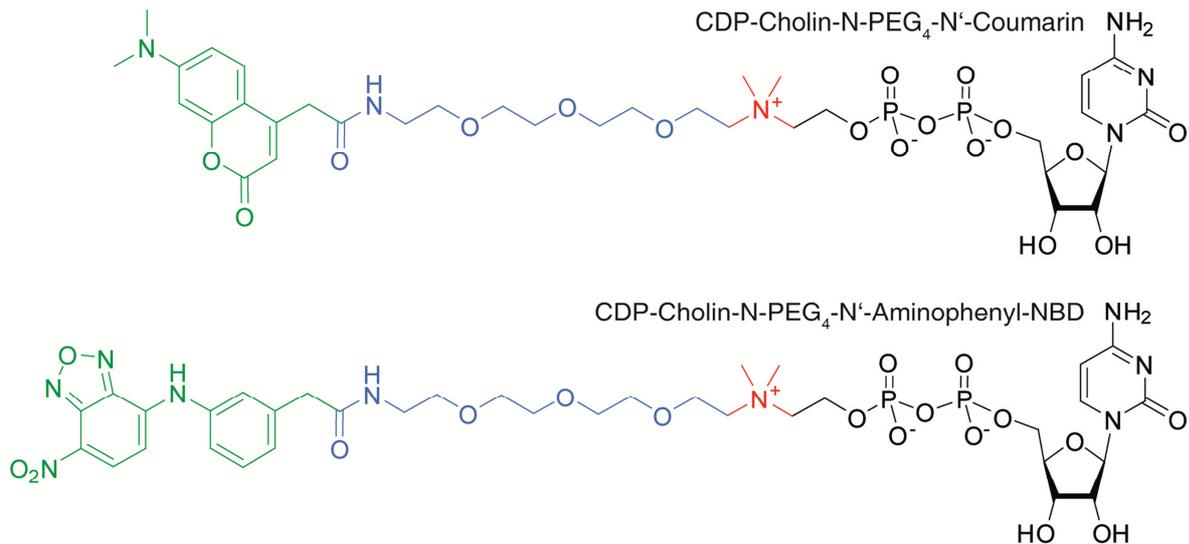


Abbildung 49: Strukturformeln von CDP-Cholin-Derivaten, die Coumarin oder Aminophenyl-NBD als Sonde tragen. In rot ist jeweils das quartäre Amin des Cholins, sowie in blau der Linker und in grün der Fluorophor hervorgehoben.

Dazu wurde das Nukleotidderivat **4**, das sich in den vorangegangenen Experimenten als am besten geeignet für die Markierungsreaktion herausgestellt hat, statt mit Fluorescein mit Coumarin bzw. Aminophenyl-7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl (Aminophenyl-NBD) konjugiert. In beiden Fällen ergab die γ -N-Inkubation dieser Moleküle mit Rab1b (50 μ M) und AnkX (100 nM) eine vollständige Umsetzung zum markierten Produkt, da im Massenspektrum außer des Peaks mit der im Vergleich zum Wildtypprotein erhöhten Masse, kein weiterer Peak detektiert wurde, der auf eine unvollständige Modifizierung hindeuten würde (s. Abbildung 50).

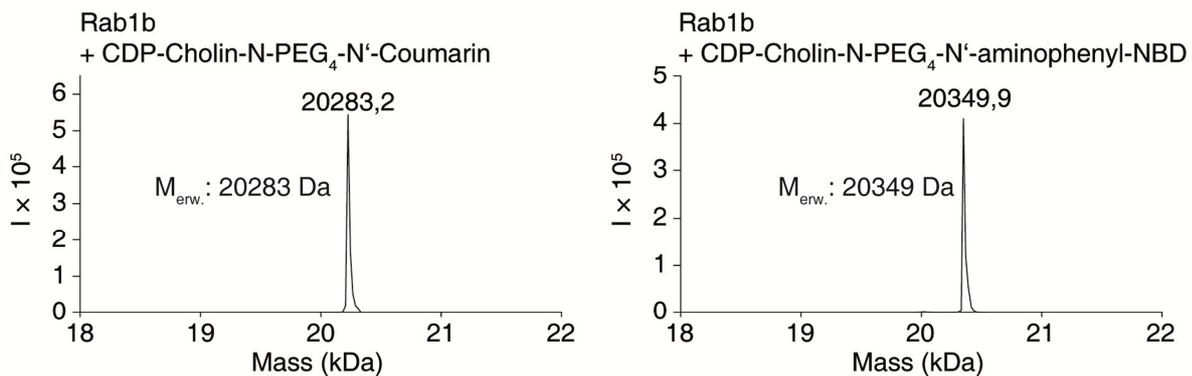


Abbildung 50: Massenspektren von Rab1b nach Inkubation mit CDP-Cholin-N-PEG₄-N'-Coumarin (A) oder CDP-Cholin-N-PEG₄-N'-Aminophenyl-NBD (B). Bezüglich beider Nukleotide konnte in den Spektren ein Massenzuwachs entsprechend der jeweils transferierten Gruppe festgestellt werden ($M_{\text{erw.}}$: erwartete Masse).

3.5 Anwendung der Markierungsmethode *in vivo*

Die in den vorangegangenen Kapiteln demonstrierte Markierung von Proteinen *in vitro* mit Hilfe der AnkX/Lem3-basierten Modifizierungsstrategie sollte schließlich auch *in vivo* getestet werden. Zunächst wurde zu diesem Zweck die Aktivität von AnkX₁₋₈₀₀ und die Stabilität des Nukleotids unter Zellkulturbedingungen überprüft, indem AnkX₁₋₈₀₀ mit CDP-Cholin oder CDP-Cholin-N-PEG₄-N'-Fluorescein und Rab1b₃₋₁₇₄ in Kulturmedium (Dulbecco's Modified Eagles Medium, DMEM mit 10 % fötalem Rinderserum (*fetal bovine serum*, FBS) bzw. 5 % BSA in Hank's Balanced Salt Solution (HBSS)) mit darin kultivierten humanen embryonalen Nierenzellen (*human embryonic kidney cells*, HEK293T) inkubiert wurde. In der massenspektrometrischen Analyse des Zellkulturüberstandes konnte modifiziertes Rab1b₃₋₁₇₄ detektiert werden (s. Anhang, Abbildung 68), sodass festgestellt werden konnte, dass AnkX₁₋₈₀₀ unter den Zellkulturbedingungen aktiv ist. Ebenfalls konnte demonstriert werden, dass AnkX₁₋₈₀₀ in Lysat von HEK293T-Zellen aktiv ist, da nach Inkubation von AnkX₁₋₈₀₀ mit CDP-Cholin und Rab1b₃₋₁₇₄ mittels Western Blot Analyse autophosphocholiniertes AnkX sowie phosphocholiniertes Rab1b nachgewiesen werden konnten (s. Anhang, Abbildung 69). Auf die gleiche Weise konnte die Stabilität von phosphocholiniertem Rab1b₃₋₁₇₄ in HEK293T-Lysat gezeigt werden (s. Anhang, Abbildung 69).

Des Weiteren sollte die Markierungsmethode *in vivo* erprobt werden. Da allerdings noch keine zellpermeablen CDP-Cholin-Derivate zur Verfügung standen, wurde die Markierung zunächst an der äußeren Zellmembran getestet, wofür das Nukleotid die Membran nicht passieren musste. Dies sollte Erkenntnisse über die Akzeptanz von AnkX/Lem3 für Proteinsubstrate in ihrem zellulären Kontext liefern. Als Modellprotein wurde der hY₂R (humaner Neuropeptid Y₂ Rezeptor) ausgewählt, der zur Familie der helicalen G-Protein gekoppelten Rezeptoren gehört. Der Rezeptor ist in der Zellmembran lokalisiert, wobei der N-Terminus dem Extrazellulärraum zugewandt ist und der C-Terminus ins Zytosol ragt (schematisch dargestellt in Abbildung 51). Dieses Protein eignet sich als Adressat für Markierungen der äußeren Zellmembran, da der nach außen exponierte N-terminale Bereich mit Peptiden fusioniert werden kann, die als Akzeptoren für Modifizierungsreaktionen dienen, ohne dass die Funktion des Rezeptors beeinträchtigt wird (Reinhardt, Lotze et al. 2014). Der Rezeptor wurde daher am N-Terminus rekombinant mit der Erkennungssequenz TITSSYYR bzw. TSSYY ausgestattet, sodass dieser ein potenzielles Substrat für AnkX bzw. Lem3 darstellt und somit die Zellmembran von außen, beispielsweise mit Fluorescein, markiert werden kann. Am C-Terminus wurde hY₂R mit dem fluoreszierenden Protein mCherry (s. Abbildung 51, in rot dargestellt) fusioniert, um in fluoreszenzmikroskopischen Experimenten die Colokalisierung des auf den N-Terminus übertragenen Fluoresceins mit dem FP und somit mit der Zellmembran beobachten zu können.

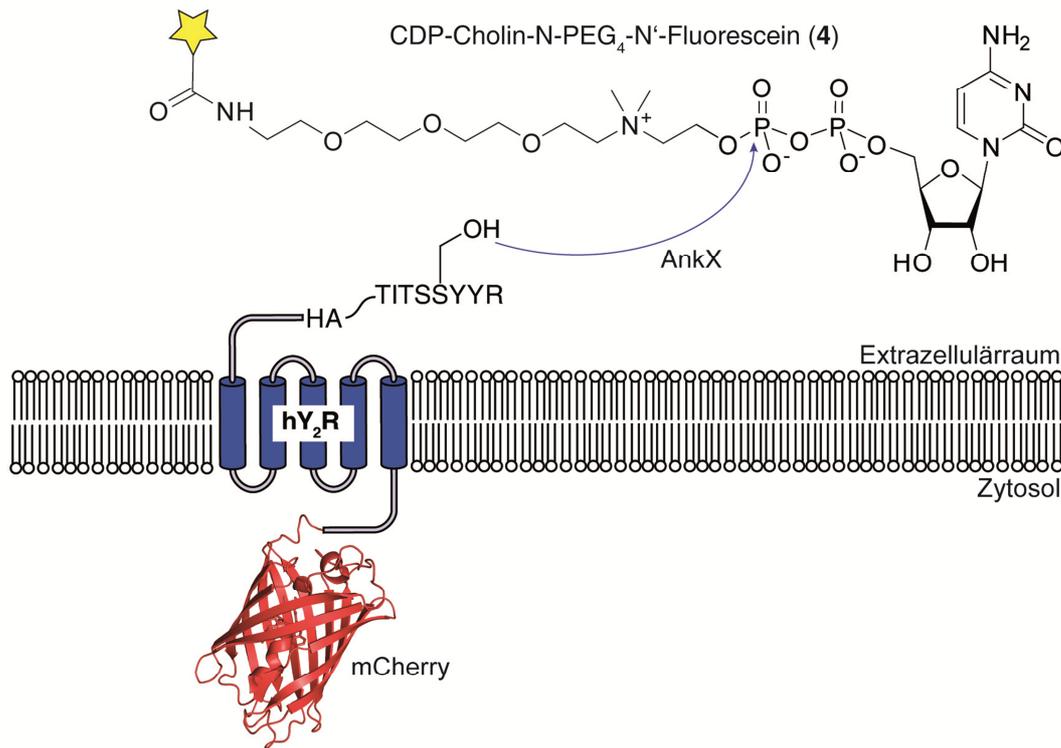


Abbildung 51: Schematische Darstellung des membraninsertierten hY_2 Rezeptors (blau) als Fusionskonstrukt mit dem fluoreszierenden Protein mCherry (rot) (PDB-ID: 2H5Q) (Shu, Shaner et al. 2006) am C-Terminus und dem Hemagglutinin-Epitop (HA) gefolgt von der AnkX-Peptid-Erkennungssequenz TITSSYYR am N-Terminus. Da der peptidfusionierte N-Terminus des Membranproteins vom Extrazellulärraum aus zugänglich ist, besteht die Möglichkeit, dass AnkX ein PC-Fluoresceinkonjugat (Fluorescein als gelber Stern dargestellt) ausgehend von Derivat 4 auf das Erkennungspeptid überträgt und somit den Rezeptor und die Zellmembran fluoreszent markiert. Die C-terminale Fusionierung des Proteins mit mCherry erlaubt zudem die fluoreszenzmikroskopische Colokalisierung der Fluoresceinmarkierung mit der Membran.

Zunächst wurde die Modifizierung des Rezeptors mit underivatisiertem Phosphocholin erprobt und mittels Western Blot analysiert (s. Abbildung 52). Da das hY_2R -Konstrukt neben der AnkX-Erkennungssequenz am N-Terminus auch noch mit dem Hemagglutinin-(HA)-Epitop ausgestattet war, bestand die Möglichkeit, den Rezeptor unabhängig von der Phosphocholinierung mit Hilfe eines Anti-HA-Antikörpers zu identifizieren. Das Markierungsexperiment wurde mit HEK293T-Zellen durchgeführt, die in DMEM und 10 % FBS in einer 24-Well Mikrotiterplatte (MTP) kultiviert wurden. Die Zellen wurden zudem 24 Stunden vor der Markierung mit einem Plasmid, das den Rezeptor bzw. Varianten davon codiert, transfiziert (s. 6.2.5.2). Hierfür wurden Konstrukte, die die Octapeptid- oder Pentapeptid-Erkennungssequenz tragen, ausgewählt (TITSSYYR-HA- hY_2R -mCherry oder TSSYY-HA- hY_2R -mCherry) und als Kontrolle wurde der HA-fusionierte hY_2 Rezeptor ohne Erkennungssequenz transfiziert. Eine weitere Kontrolle stellten untransfizierte HEK293T-Zellen dar, um ausschließen zu können, dass AnkX oder das Nukleotid unspezifisch mit anderen Bestandteilen der Zellmembran wechselwirkt. Für die Markierungsreaktion wurden AnkX₁₋₈₀₀ und CDP-Cholin nach der Expression des Rezeptors zu den mit BSA behandelten Zellkulturen zugefügt und für 3 h mit diesem inkubiert (s. 6.2.5.3).

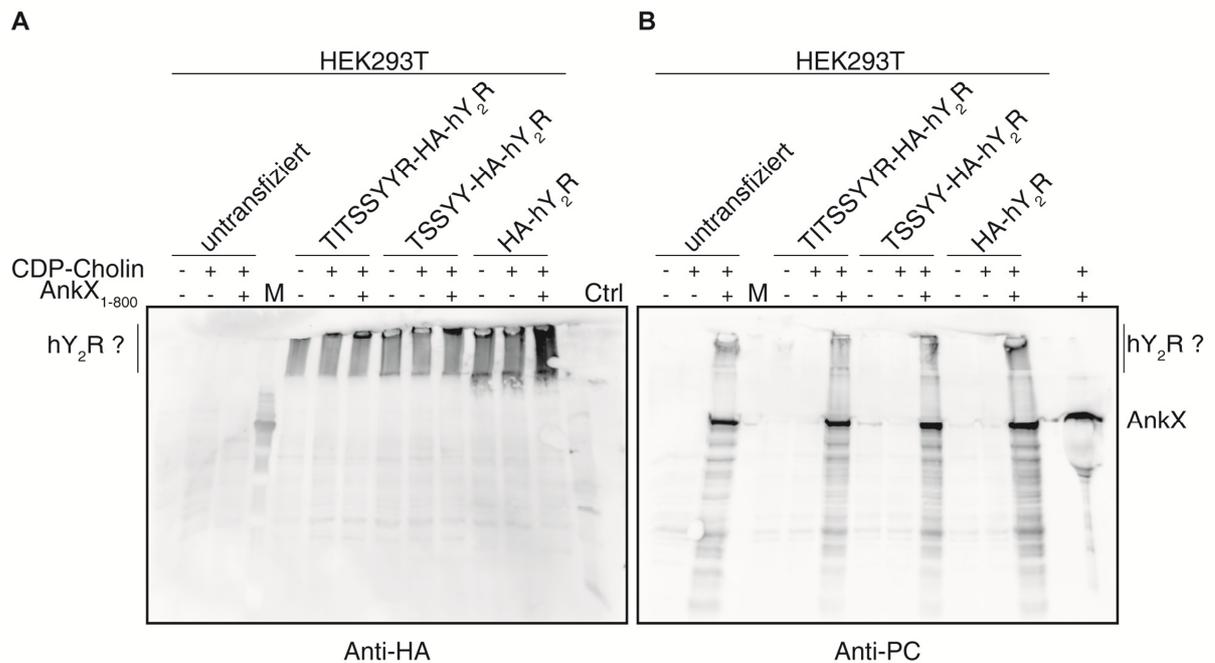


Abbildung 52: Phosphocholinierung von hY₂R *in vivo*. Die Phosphocholinierung verschiedener HA-hY₂R-Varianten in der Membran von HEK293T-Zellen wurde mittels Western Blot detektiert. Die mit unterschiedlichen Rezeptor-Konstrukten transfizierten Zellen wurden entweder mit AnkX₁₋₈₀₀ und CDP-Cholin, nur mit CDP-Cholin oder ohne Zusatz für 24 h inkubiert. Nach mehreren Waschschritten wurden die Zellen dann lysiert, das Zelllysate schließlich elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran geblottet. Die Detektion von HA-fusionierten Proteinen erfolgte mit einem Anti-HA-Antikörper (A), die Detektion von phosphocholinieren Proteinen hingegen mit einem Anti-PC-Antikörper (B).

Die lysierten Zellen wurden im Anschluss mittels Western Blot gegen HA und gegen PC auf die Anwesenheit des Rezeptors und dessen Phosphocholinierung untersucht. In Abbildung 52A ist der Anti-HA-Blot zu sehen, auf dem allerdings in keiner Bahn Banden zu erkennen sind, die dem 72 kDa großen HA-hY₂R-mCherry-Konstrukt entsprechen. Lediglich in den Bahnen, in denen transfizierte Zelllysate aufgetragen wurden, sind im Bereich des Sammelgels verschmierte Banden zu sehen. Die Tatsache, dass diese Banden in den untransfizierten Lysaten nicht zu sehen sind, deutet möglicherweise darauf hin, dass diese Banden den hY₂R-Konstrukten zugeordnet werden können. Möglicherweise handelt es sich hierbei um aggregierte Fraktionen des Rezeptors. In Abbildung 52B ist ein identischer Blot dargestellt, der aber an Stelle des Anti-HA-Antikörpers mit dem Anti-PC-Antikörper inkubiert wurde, um phosphocholinierte Proteine zu detektieren. Darauf ist zu sehen, dass lediglich in Lysaten von Zellen, die sowohl mit AnkX als auch mit CDP-Cholin inkubiert wurden, Signale detektierbar sind. Die dominante Bande in diesen Bahnen entspricht dem autophosphocholinierten AnkX, das als Kontrolle ganz rechts auf dem Blot zu sehen ist. Die verschmierten Banden oberhalb dieser Banden, im Bereich des Sammelgels sind hingegen nicht in der Kontrollbahn zu sehen und können daher nicht von AnkX oder CDP-Cholin stammen, sondern müssen vielmehr von dem Rezeptorprotein oder den Zellen herrühren. Möglicherweise handelt es sich bei diesen Banden, wie auch bei dem Anti-HA-Blot in Teilabbildung A vermutet, um die hY₂R-Konstrukte, die eventuell Aggregate ausgebildet haben und daher nicht weiter in das

SDS-Gel, das dem Blot zugrunde liegt, mobilisiert werden konnten. Gegen die Annahme, dass es sich bei diesen Banden um das phosphocholinierte Membranprotein handelt, spricht die Tatsache, dass auch in der Bahn mit untransfiziertem Zelllysate eine derartige Bande zu erkennen ist, die in diesem Fall nicht von dem Rezeptor stammen kann. Daher ist anzunehmen, dass die verschmierten Banden von anderen Bestandteilen der Zellen stammen müssen, die möglicherweise auch von AnkX modifiziert werden.

Des Weiteren wurde die Modifizierung der HEK293T-Zellmembran mit dem fluoreszierenden CDP-Cholin-Fluorescein-Konjugat **4** (CDP-Cholin-N-PEG₄-N'-Fluorescein) fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Dabei wurden die Zellen analog zu der für die Markierung mit Phosphocholin beschriebenen Prozedur behandelt. Allerdings wurden die Zellen an Stelle von einer MTP in einem mikroskopietauglichen *Chamber slide* kultiviert und statt CDP-Cholin wurde das Nukleotid **4** gewählt. In Abbildung 53 sind die Mikroskopieaufnahmen einzelner Zellen nach der Inkubation mit AnkX₁₋₈₀₀ und Nukleotid **4** (oben) oder als Kontrolle ohne AnkX und nur mit Nukleotid **4** (unten) abgebildet.

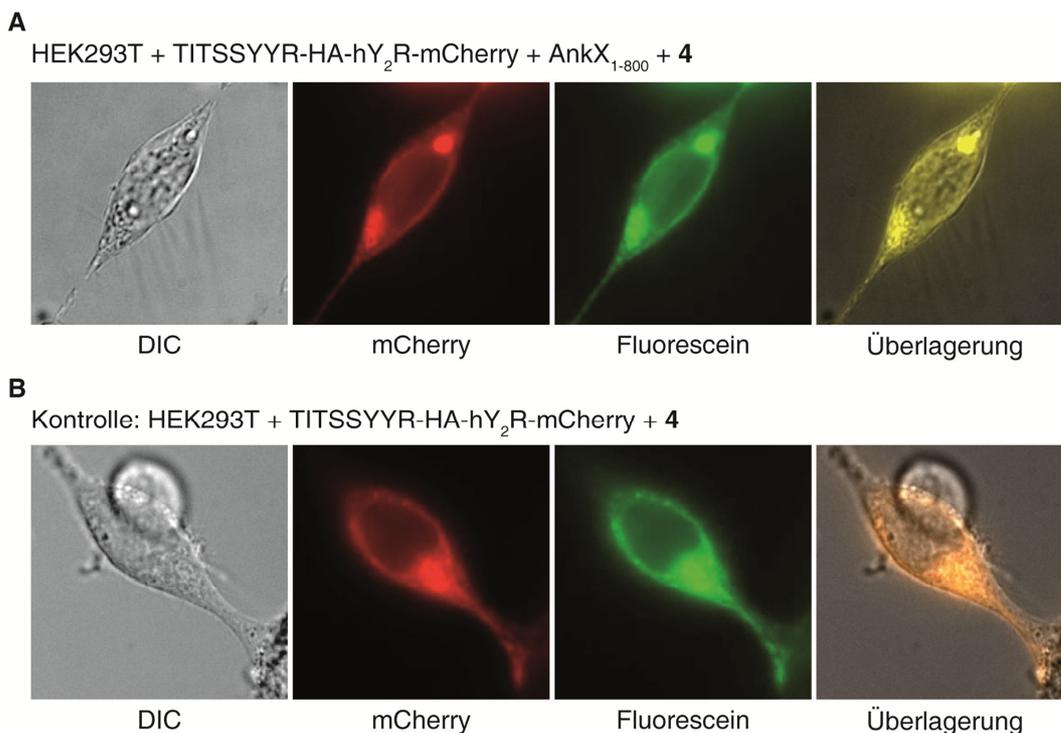


Abbildung 53: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von markierten Zellen. HEK293T-Zellen wurden in *chamber slides* mit DMEM und 10% FBS kultiviert und mit TITSSYYR-HA-hY₂R-mCherry transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit BSA geblockt und anschließend für 3 h mit AnkX₁₋₈₀₀ und CDP-Cholin-N-PEG₄-N'-Fluorescein (Nukleotid **4**) (oben) oder als Kontrolle nur mit Nukleotid **4** (unten) inkubiert. Die Aufnahmen wurden nach drei Waschschritten mit PBS und finalem Versetzen der Zellen mit Indikatorfreiem DMEM gemacht. Es ist jeweils eine Aufnahme im Differentialinterferenzkontrast (DIC)-Modus (links, grau), sowie im mCherry- (rot) und GFP- bzw. Fluorescein-Kanal (grün) dargestellt. Ganz rechts ist die Überlagerung aller drei Bilder (gelb) zu sehen.

In beiden Fällen ist ein Fluoresceinsignal (grün), das mit dem Fluoreszenzsignal von mCherry (rot) annähernd hundertprozentig überlagert (s. auch Überlagerung, gelb) zu sehen. Das

bedeutet, dass allein das Nukleotid in Abwesenheit von AnkX mit mCherry und somit mit dem hY₂R colokalisiert, sodass die beobachtete Colokalisation von Fluorescein und mCherry nach Inkubation der Zellen mit dem fluoreszierenden Nukleotid und AnkX₁₋₈₀₀ nicht auf eine erfolgreiche Markierung des Rezeptorproteins zurückgeführt werden kann. Stattdessen interagiert das Nukleotid scheinbar unspezifisch mit dem Rezeptor oder aber auch anderen Bestandteilen der Zelle oder deren Membran.

4. Diskussion

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse, die in Kapitel 3 dargestellt wurden, diskutiert und im Kontext der Literatur betrachtet. Dabei soll bewertet werden, inwiefern das Ziel dieser Arbeit, eine neue Proteinmarkierungsmethode basierend auf der enzymatischen Phosphocholinierung zu entwickeln, erreicht wurde und wie die Erkenntnisse, die während dieses Prozesses gewonnen wurden einzuordnen sind. Die aus der Untersuchung der fünf, für die Etablierung der Markierungsstrategie essentiellen Teilaspekte, erhaltenen Ergebnisse werden dabei als Grundlage für die universelle Anwendbarkeit der Methode evaluiert. Zunächst sollen aus den Ergebnissen der Optimierung der beteiligten Enzyme AnkX und Lem3 weitere Schlüsse bezüglich ihrer möglichen Funktionsweisen und den daraus resultierenden Konsequenzen für ihre Nutzung als molekulare Werkzeuge zur Markierung von Proteinen gezogen werden. Außerdem wird reflektiert, wie sowohl das Erkennungspeptid als auch das Nukleotidderivat beschaffen sein müssen, um für eine Proteinmarkierungsmethode geeignet zu sein und welche strukturellen Eigenschaften des Peptids bzw. von AnkX/Lem3 diesen Erkenntnissen zu Grunde liegen. Im Ergebnisteil dieser Arbeit konnte demonstriert werden, dass Proteine durch Fusion mit dem Erkennungspeptid von AnkX zu Substraten für die Markierungsreaktion gemacht werden können. Welche Positionen sich aufgrund bestimmter Voraussetzungen des Zielproteins für die Anbringung des Motivs am besten eignen, soll in den folgenden Kapiteln diskutiert und eine Empfehlung für die Übertragung auf andere Proteine formuliert werden. Des Weiteren soll die Anwendbarkeit der Methode *in vivo* diskutiert werden und mögliche Ursachen für die nicht erfolgreiche Markierung des membranständigen Modellproteins identifiziert und daraus Schlüsse für das Gelingen zukünftiger zellbasierter Markierungsexperimente gezogen werden. Eine abschließende Diskussion zum Entwicklungsstand der Methode und bezüglich weiteren Optimierungsbedarfs, der zur Konkurrenzfähigkeit der enzymatischen Phosphocholinierung im Vergleich zu anderen Markierungsstrategien führt, soll als Grundlage für die weitere Etablierung der Methode analysiert werden.

4.1 Optimierung der Enzyme

Die Optimierung und Charakterisierung der Enzyme AnkX und Lem3 für die reversible Proteinmarkierung resultierte in den verkürzten Konstrukten AnkX₁₋₈₀₀ und Lem3₁₋₅₀₀, die im Gegensatz zu allen übrigen getesteten Verkürzungsvarianten jeweils eine minimale Größe mit maximaler Aktivität kombinieren (s. 3.1). Im Fall von AnkX konnte die Hypothese, dass die FIC-Domäne (Aminosäuren 1-350) allein für eine effiziente Phosphocholinierung genügt, nicht bestätigt werden. Stattdessen wurde herausgefunden, dass die ARHD ebenfalls in hohem Maße zu einer erfolgreichen posttranslationalen Modifizierung von Rab1b *in vitro* beiträgt und nicht eliminiert werden kann. Dies entspricht den Erkenntnissen von Pan et al., die darauf hindeuten, dass für die pathologischen Auswirkungen von AnkX sowohl die N-

terminale Domäne als auch die ARHD essentiell ist (Pan, Luhrmann et al. 2008). Es ist denkbar, dass die ARHD an der Bindung des Proteinsubstrats beteiligt ist und somit dessen Erkennung durch die FIC-Domäne erst möglich macht. Durch Überlagerung der Kristallstruktur von AnkX₁₋₄₈₄ und der anhand des Modells Ankyrin R vorhergesagten Struktur der ARHD, kann ein Proteinmodell erstellt und davon eine mögliche Funktionsweise des Enzyms abgeleitet werden (s. Abbildung 54) (Michaely, Tomchick et al. 2002). Wie in Abbildung 54A zu erkennen ist, hat die modellierte ARHD eine sichelförmige Struktur, die am N-Terminus mit den Ankyrinwiederholungselementen von AnkX₁₋₄₈₄ überlagert. Die konkave Seite der ARHD-Sichel, die sog. Ankyringrube, zeigt zur Nukleotidbindetasche der FIC-Domäne, wobei der C-Terminus der ARHD jedoch in einiger Distanz von dieser absteht (Al-Khodor, Price et al. 2010). Eine Haarnadelschleife am C-Terminus der ARHD ist hingegen der Nukleotidbindetasche zugewandt. Die bei diesem Modell einzig mögliche Position eines Substratproteins liegt zwischen der Nukleotidbindetasche bzw. der Insertionsdomäne und dem C-Terminus der ARH-Domäne. In diese Position wurde die Struktur von Rab1a (magenta) in seiner aktiven Konformation so modelliert, dass die *Switch II*-Schleife (gelb) mit dem modifizierbaren Serin79 (entspricht Serin76 in Rab1b) in die aktive Tasche von AnkX ragt und das Serin in die Nähe des Phosphocholins rückt. Tatsächlich ist zu erkennen, dass das Rab-Protein fast genau in diesen Zwischenraum passt. In der Ansicht in Abbildung 54B ist deutlicher zu erkennen, dass die Haarnadelschleife die am C-Terminus der ARHD gebildet wird, seitlich von dieser absteht und der Nukleotidbindetasche genau gegenüber liegt, sodass vermutet werden kann, dass diese Haarnadel an der Interaktion mit dem Proteinsubstrat beteiligt ist. In der dargestellten Konstellation könnte die Haarnadelschleife über eine flexible Schleife zwischen β -Strang 5 und α -Helix 4 der GTPase (Aminosäuren 126-133) interagieren und so das Substratprotein in der Ankyringrube einklemmen. Möglicherweise ist dies ein Mechanismus zur Stabilisierung des Enzym-Substrat-Komplex. Die hypothetische Interaktion von Rab1b mit den Ankyrinwiederholungselementen von AnkX stellt keine außergewöhnliche Wechselwirkung dar, denn auch bei anderen Vertretern der Rab-Familie konnten Interaktionen mit Effektorproteinen über deren Ankyrindomänen beobachtet werden. Zum Beispiel wird der Effektor Varp zu Rab38-positiven Vesikeln rekrutiert, indem dessen Ankyrindomäne 1 (ANK1) mit Rab38 interagiert (Wang, Zhang et al. 2008). Auch Rab7, das einen zentralen Regulator von Transportprozessen später Endosomen darstellt, interagiert mit dem Effektor ORP1L über dessen N-terminale Ankyrindomäne (Johansson, Lehto et al. 2005). Ankyrindomänen spielen häufig eine wichtige Rolle bei Protein-Protein-Interaktionen, wobei die Bindung des Zielproteins in den meisten Fällen über die Oberfläche der Ankyringrube bewerkstelligt wird (Sedgwick und Smerdon 1999). Da in dem Modellkomplex von AnkX und Rab1a die Interaktion ebenfalls über die Ankyringrube erfolgt, ist dieses Modell als realistisch einzustufen.

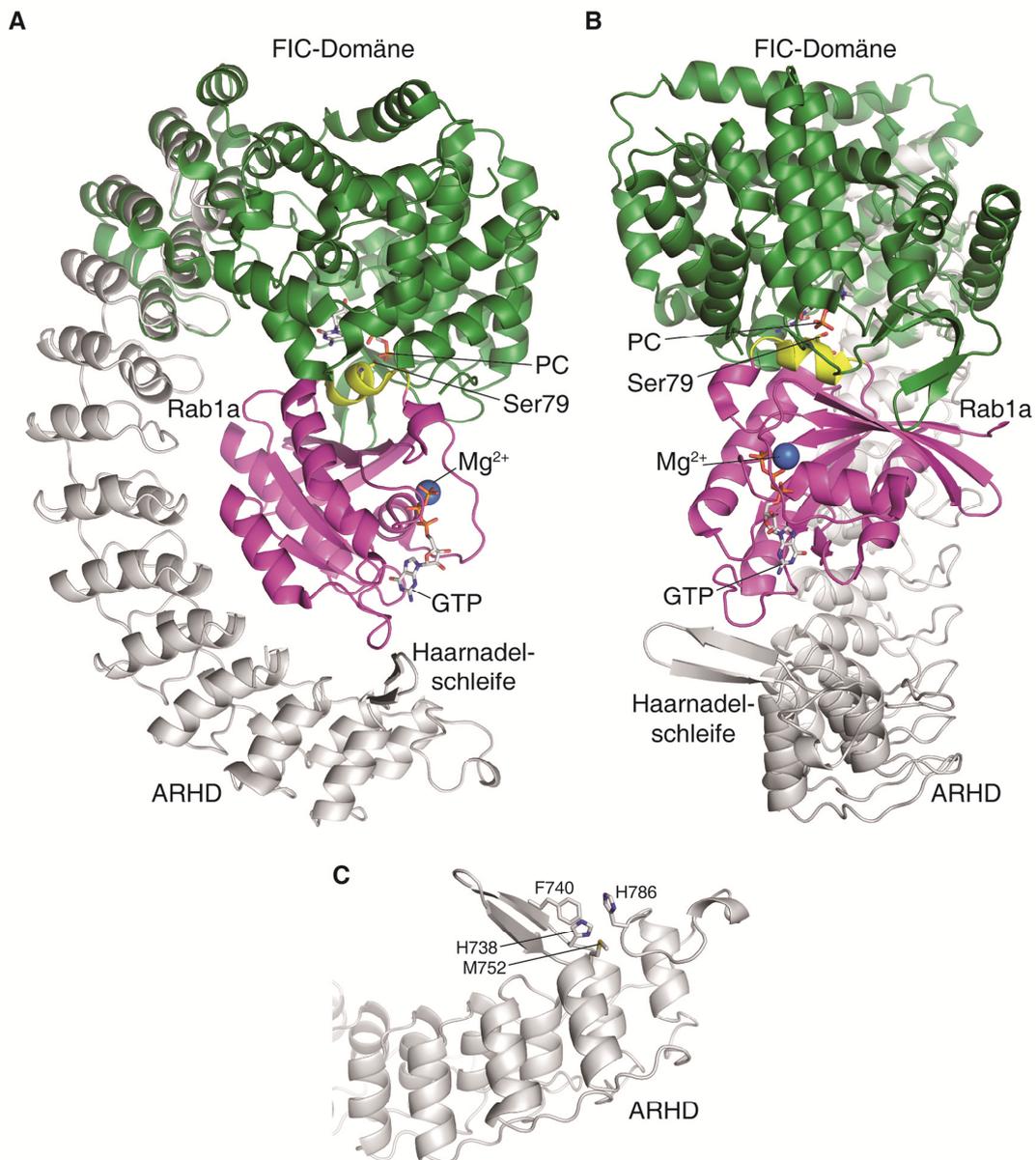


Abbildung 54: Überlagerung der Kristallstruktur von AnkX₁₋₄₈₄ (grün) (PDB-ID: 4BES) (Campanacci, Mukherjee et al. 2013) und der vorhergesagten Struktur der ARHD in grau. Die Vorhersage der ARHD wurde mit dem *Protein Fold Recognition Server phyre²* (Protein Homology/Analogy Recognition Server V 2.0) mit der AnkX-Sequenz 350-949 durchgeführt und die Struktur anhand der d34-Region des humanen Ankyrin R mit einer Konfidenz von 100% modelliert (Michaely, Tomchick et al. 2002). Die Überlagerung wurde mit PyMOL durchgeführt und dargestellt. Zudem wurde Rab1a (magenta, *Switch II*-Schleife in gelb, PDB-ID: 3TKL) so in die Ankyringrube modelliert, dass das Serin79 von Rab1a in unmittelbarer Nähe zum Phosphat des Phosphocholins liegt, sodass ein realistischer Komplex zwischen AnkX und Rab1 modelliert werden kann. In A) ist dieser hypothetische Komplex seitlich, mit Aufsicht auf die Flanke der ARHD und die CMP-Subdomäne der FIC-Domäne dargestellt. In B) ist die Ansicht auf den modellierten Komplex im Vergleich zu A) um 90° gedreht und bietet eine Sicht von oben auf die Nukleotidbindetasche und das Rab-Protein, das in der Ankyringrube liegt. In C) sind die Aminosäuren der Haarnadelschleife und des C-terminal darauf folgenden Ankyrin-Elements abgebildet, deren Interaktion vermutlich eine wichtige Rolle bei der Ausbildung und Stabilisierung des Haarnadelschleifenmotivs spielt, weswegen Verkürzungen von AnkX in diesem Bereich möglicherweise eine starke Beeinträchtigung der Aktivität zur Folge hat.

Anhand dieses modellierten Komplexes ist ein Szenario vorstellbar, bei dem die FIC-Domäne das Peptid TITSSYYR unabhängig von dessen Kontext erkennt und mit einer geringen Affinität bindet, die Ankyrin-Domäne und dabei vor allem besagte Haarnadelschleife

aber entscheidend zu einer stabilen Komplexbildung beitragen. Dabei muss offensichtlich die potenzielle Wechselwirkung zwischen ARHD und Proteinsubstrat unspezifisch sein, da AnkX₁₋₈₀₀, wie in Kapitel 3.3 dargestellt wurde, auch andere Proteine, wie z.B. TITSSYYR-SUMO als Substrate akzeptiert. Daher ist es denkbar, dass die Erkennung eines Substrats tatsächlich ausschließlich über die TITSSYYR-Sequenz erfolgt und davon ausgelöst möglicherweise eine Konformationsänderung der ARHD stattfindet, die zum Einklemmen des Substrats führt, sodass eine spezifische Wechselwirkung zwischen ARHD und Proteinsubstrat überflüssig ist.

Die Haarnadelschleife am C-Terminus der ARHD wird in dem Modell von den Aminosäuren 739-750 gebildet, was die Frage aufwirft, warum das Konstrukt AnkX₁₋₇₆₉, das diese Aminosäuren noch enthält, bei Zutreffen der aufgestellten Hypothese, nicht eine zu AnkX₁₋₈₀₀ identische Aktivität aufweist. Dies kann damit erklärt werden, dass die Haarnadelschleife in der modellierten ARHD-Struktur insbesondere Kontakte zu Aminosäuren ausbildet, die C-terminal, also jenseits von Aminosäure 769, zu dieser liegen (s. Abbildung 54C). Zum Beispiel bildet F740 der Haarnadelschleife eine π - π -Interaktion mit H786 der auf die Haarnadelschleife folgenden Helix aus und da dieses Histidin in AnkX₁₋₇₆₉ fehlt, kann die Haarnadelschleife in diesem Konstrukt vermutlich nicht ausgebildet werden, was in einem dramatischen Verlust der Aktivität resultiert.

Die Hypothese, dass es sich bei der Haarnadelschleife am C-Terminus der ARHD um ein für die Phosphocholinierungsreaktion essentielles Element handelt, könnte überprüft werden, indem Mutanten von AnkX₁₋₈₀₀ oder AnkX₁₋₉₄₉ hergestellt würden, in denen die Aminosäuren 739-750 entweder ganz fehlen oder mit anderen Aminosäuren substituiert werden. Eine zu AnkX₁₋₈₀₀ oder AnkX₁₋₉₄₉ identische Aktivität würde dann auf die Bedeutungslosigkeit der Haarnadelstruktur hinweisen, eine wesentlich geringere Aktivität jedoch auf deren Wichtigkeit für eine katalytisch effiziente Modifizierung. Des Weiteren könnte die gesamte ARH-Domäne von AnkX mit der Ankyrin-Domäne eines anderen Proteins ausgetauscht werden, um zu untersuchen, ob die AnkX-ARHD für die Funktionsweise des Enzyms essentiell ist oder ob sie austauschbar ist. Möglicherweise könnten so auch andere Domänen identifiziert werden, die in Fusion mit der FIC-Domäne eine effizientere Modifizierung verschiedener Proteine erlauben.

Für die Anwendung des Enzyms in einer universellen Proteinmarkierungsmethode hätte diese Hypothese die Konsequenz, dass eine erfolgreiche Modifizierung hauptsächlich von der Zugänglichkeit der Octapeptiderkennungssequenz im Proteinkontext abhängen würde, aber vermutlich auch von der Größe bzw. Quartärstruktur des Zielproteins, da einige Proteine aufgrund ihrer Größe bzw. Form eventuell nicht in den zur Verfügung stehenden Zwischenraum von FIC- und ARH-Domäne passen. Um dies zu überprüfen müssten zusätzlich zu

SUMO, MBP und DrrA weitere Modellproteine, die entweder wesentlich größer oder anders geformt sind, für die AnkX-abhängige Modifizierung getestet werden.

Hinsichtlich der Legionelleninfektion lassen sich aus diesem Interaktionsmodell von Rab1b und AnkX weitere Vermutungen zur Funktion von AnkX anstellen. Wie in der Einleitung (s. 1.7.1) bereits erläutert wurde, inhibiert die Phosphocholinierung von Rab1b die Bindung der GTPase zu GDI (Oesterlin, Goody et al. 2012). Da sich die prenylierte GTPase in einem Gleichgewicht zwischen Membraninsertion und zytosolischer GDI-Komplexierung befindet, hat die PTM von Rab1b wahrscheinlich die dauerhafte Membranverankerung zur Folge (Goody, Rak et al. 2005, Goody, Heller et al. 2012, Oesterlin, Goody et al. 2012). Es ist denkbar, dass AnkX durch seine Phosphocholinierungsaktivität ähnlich zur GEF- und Adenylylierungsaktivität von DrrA, die Freisetzung von Rab1b aus dem Komplex mit GDI bewirkt und somit dessen dauerhafte Insertion in die Membran der LCV fördert (Schoebel, Oesterlin et al. 2009, Goody, Heller et al. 2012). Möglicherweise ist AnkX ebenfalls in der LCV-Membran verankert (z.B. vermittelt durch die C-terminale Domäne, deren Funktion unbekannt ist) und phosphocholinert Rab1b sobald es aus dem GDI-Komplex entlassen und in die Membran inseriert wird (Goody, Heller et al. 2012). Dadurch kann Rab1b nicht mehr durch GDI gebunden werden und verbleibt somit zunächst in der LCV-Membran. Bei dem vorgeschlagenen Komplex zwischen AnkX und Rab1b (s. Abbildung 54A und B) ist der C-Terminus der GTPase, an dem die für die Membranverankerung essentiellen Prenylgruppen liegen, nicht direkt an Interaktionen mit AnkX beteiligt, sondern liegt lösungsmittel exponiert vor. Somit ist es vorstellbar, dass das in der LCV-Membran verankerte Rab1b von einem benachbarten AnkX-Molekül auf die dargestellte Weise gebunden und dadurch möglicherweise zusätzlich gegenüber der GDI-vermittelten Extraktion durch die ARHD abgeschirmt wird. Zudem muss die FIC-Domäne von AnkX mit der *Switch II*-Region von Rab1b wechselwirken, um die Phosphocholinierung durchzuführen. Da diese allerdings einen Großteil der Interaktionsoberfläche für GDI darstellt, kann auch aus diesem Grund GDI nicht mehr binden (Pylypenko, Rak et al. 2006). Nach erfolgreicher Phosphocholinierung dissoziiert Rab1b aus dem Komplex mit AnkX und kann wegen der Modifikation nicht mehr von GDI extrahiert werden. Erst die Aktivität von Lem3 macht die GDI-Bindung von Rab1b wieder möglich (Oesterlin, Goody et al. 2012).

Gegen die Theorie, dass AnkX die Freisetzung von Rab1b aus dem Komplex mit GDI fördert, spricht, dass von Hardiman und Roy gezeigt wurde, dass die Phosphocholinierung durch AnkX nicht die gleichen zellulären Auswirkungen hat wie die Adenylylierung durch DrrA, von der ebenfalls vermutet wird, dass sie die dauerhafte Insertion von Rab1b in die LCV-Membran auslöst (Hardiman und Roy 2014). Da die eine PTM die andere nicht substituieren kann, ohne dass andere zelluläre Effekte resultieren, wurde vermutet, dass beide modifizierenden Enzyme unterschiedliche Rab1b-Populationen adressieren und die Phosphochol-

linierung nicht die Freisetzung von Rab1b aus dem GDI-Komplex bewirkt, sondern dass diese Aufgabe lediglich DrrA zukommt (Hardiman und Roy 2014).

Die Charakterisierung von Lem3 führte zur Identifikation des C-terminal verkürzten Konstrukts Lem3₁₋₅₀₀, das sich in Aktivität und Stabilität nicht vom Wildtyp unterscheidet und sich deshalb gut als molekulares Werkzeug für die Demodifizierung von markierten Proteinen eignet. Die Akzeptanz des phosphocholinierten Octapeptids als Substrat trägt ebenfalls zur Eignung dieses Konstrukts für die reversible Markierungsmethode bei. Die Tatsache, dass bei den übrigen Lem3-Konstrukten, die qualitativ hinsichtlich der Dephosphocholinierung analysiert wurden, keine Aktivität gegenüber PC-Rab1b festgestellt werden konnte, lässt den Schluss zu, dass sowohl die N-terminale Region von Aminosäure 1 bis 98 wichtig für die Aktivität ist und auch C-terminale Verkürzungen ab Position 500 zu einer Verringerung der Dephosphocholinierungsaktivität führen. Die Magnesiumabhängigkeit von Lem3 deutet möglicherweise darauf hin, dass das Enzym Ähnlichkeit mit Mg²⁺-abhängigen Serin/Threonin-spezifischen Phosphatasen aufweist, was durch Tertiärstrukturvorhersagen mittels Phyre² allerdings nicht bestätigt werden konnte. Allerdings konnte durch ein Sequenzalignment und eine Sekundärstrukturvorhersage mit Hilfe des HHPred-Servers eine Homologie der Region 56-328 von Lem3 mit Proteinphosphatasen vom Typ 2C festgestellt werden (s. Anhang, Abbildung 70)(Soding 2005, Soding, Biegert et al. 2005). Somit ist es als wahrscheinlich einzustufen, dass der Bereich von Aminosäure 56 bis 328 essentiell für die Lem3-abhängige Dephosphocholinierung ist, was die mangelnde Aktivität der N-terminal verkürzten Konstrukte erklärt. Interessant ist zudem, dass Lem3 die Phosphocholingruppe lediglich von Serin, aber nicht von Threonin abspalten kann (vgl. 3.1). Da sich Threonin lediglich durch eine zusätzliche Methylgruppe am β -C-Atom von Serin unterscheidet, ist anzunehmen, dass die aktive Tasche von Lem3 räumlich sehr begrenzt ist und wenig Platz für diese Substitution zur Verfügung steht. Im Widerspruch hierzu scheint allerdings die Erkenntnis zu stehen, dass Lem3 das synthetisch phosphocholinierte Tyrosin im Peptid TITSS-Y(PC)-YR demodifizieren kann, denn in diesem Fall trägt das β -C-Atom der phosphocholinierten Aminosäure einen sterisch noch anspruchsvolleren Benzylring, der für Lem3 aber keine Hürde darstellt. Daraus kann geschlossen werden, dass das aktive Zentrum von Lem3 eine gewisse räumliche Flexibilität aufweisen muss. Im Fall des phosphocholinierten Tyrosins befindet sich die veresterte Hydroxylfunktion nicht am β -C-Atom wie beim Threonin und Serin, sondern in einigem Abstand zum Peptidrückgrat in *para*-Position am Benzylring, sodass dieser Umstand möglicherweise zu einer besseren Zugänglichkeit für Lem3 im Gegensatz zum Threonin beiträgt.

4.2 Optimierung der Peptidsequenz

Die Analyse der Peptiderkennungssequenz TITSSYYR aus Rab1b hinsichtlich essenzieller Aminosäuren, ergab, dass sowohl AnkX als auch Lem3 für die Akzeptanz der Sequenz auf das initiale Threonin verzichten können. Für die Erkennung durch AnkX ist außerdem das

Arginin entbehrlich. Daraus kann geschlossen werden, dass die Aminosäuren, die in naher Nachbarschaft zum Zielserin liegen, für die Bindung durch AnkX am wichtigsten, weiter entfernte hingegen vermutlich nicht an der Interaktion zum Enzym beteiligt und somit unbedeutend sind. Da über die Bindungsmodalitäten zwischen AnkX und Rab1b bzw. dem Peptid TITSSYYR keine Informationen vorliegen, können keine genauen Aussagen darüber gemacht werden, warum das Motiv ITSSYY bedeutend für die Reaktion ist. Es ist auch nicht bekannt, ob die *Switch II*-Region von Rab1b im Komplex mit AnkX ungeordnet, wie im inaktiven Zustand der GTPase oder helical, wie in ihrem aktiven Zustand vorliegt. Anhand der Kristallstruktur von GTP-gebundenem Rab1a im Komplex mit dem *L. pneumophila* Effektor LidA (PDB-ID: 3TKL) kann allerdings die Vermutung angestellt werden, dass sich die Faltung des *Switch II*-Bereichs oder zumindest die Orientierung der Seitenketten der beteiligten Aminosäuren bei der Interaktion mit AnkX wahrscheinlich von der des aktiven Zustands unterscheidet (Cheng, Yin et al. 2012). Denn das Arginin (R82, entspricht R79 in Rab1b), das im Alanin-Screen als unbedeutend für die AnkX-Erkennung bewertet wurde, kommt dem Serin, das von AnkX phosphocholiniert wird, sehr nahe (s. Abbildung 55).

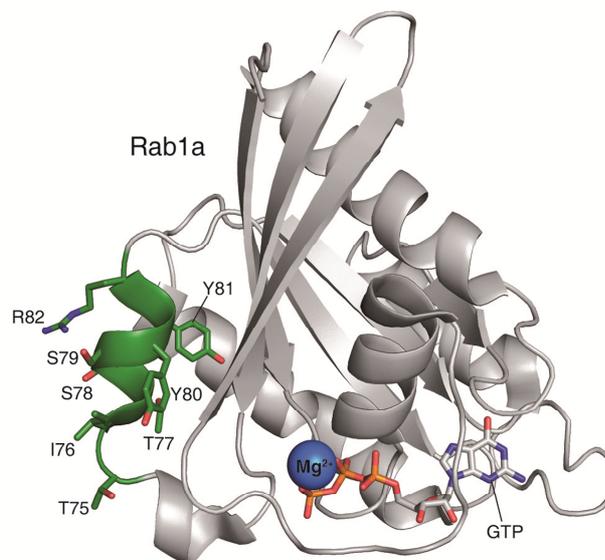


Abbildung 55: Röntgenkristallstruktur von aktivem Rab1a im LidA-Komplex (PDB-ID: 3TKL). Die Tertiärstruktur von Rab1a und das gebundene Nukleotid sind in grau dargestellt und das Magnesiumion als blaue Kugel. Die Sequenz T₇₅ITSSYYR₈₂ in der *Switch II*-Region ist in grün hervorgehoben und die einzelnen Aminosäuren sind zusätzlich in der Stick-Darstellung gezeigt (Cheng, Yin et al. 2012).

Diese Anordnung weist vielmehr darauf hin, dass das Arginin eine große Rolle bei der AnkX-Rab1b-Interaktion spielt. Nun muss aber aufgrund der Erkenntnisse aus dem Alanin-Screen vermutet werden, dass das Arginin bei der Bindung aus dem Umfeld des Zielserins verdrängt wird, was auf eine Umorientierung oder Flexibilisierung dieses Sequenzabschnitts bei AnkX-Bindung hindeutet. Möglicherweise muss AnkX den im GTP-Zustand des Rab-Proteins helicalen *Switch II*-Bereich zunächst in eine flexiblere Konformation bringen, die dem inaktiven Zustand ähnelt, um die Modifizierung durchführen zu können. Im Fall des initialen Threonins

(T75, entspricht T72 in Rab1b) der Octapeptidsequenz, das ebenfalls als nicht essenziell deklariert wurde, kann in der Kristallstruktur von GTP-gebundenem Rab1 erkannt werden, dass es keinen Kontakt zu Serin79 (entspricht Serin76 in Rab1b), das von AnkX adressiert wird, ausbildet. Da es relativ weit entfernt von Serin79 liegt, ist es wahrscheinlich, dass es an keiner essentiellen Interaktion mit AnkX beteiligt und deswegen unbedeutend für die Reaktion ist.

4.3 Modellproteine

Die rekombinante Ausstattung der Modellproteine SUMO, MBP und DrrA mit der Octapeptid-erkenntnissequenz an den Termini und in internen Schleifenregionen sowie deren erfolgreiche Phosphocholinierung durch AnkX, haben gezeigt, dass Proteine unterschiedlicher Sequenz, Struktur und Größe auf diese Weise in AnkX-Substrate umgewandelt werden können (s. Zusammenfassung in Tabelle 1).

Tabelle 1: Auflistung der verschiedenen Peptid-Protein-Fusionskonstrukte und Bewertung der jeweiligen (De-)Modifizierbarkeit durch AnkX bzw. Lem3. Mit + sind diejenigen Proteine bewertet, bei denen eine Modifikation bzw. deren Abspaltung beobachtet wurde, mit - diejenigen, die keine Substrate für AnkX oder Lem3 darstellen. / bedeutet, dass in diesen Fällen die Dephosphocholinierung nicht getestet werden konnte, weil das jeweilige Protein kein AnkX-Substrat darstellt.

Modellprotein	Phosphocholinierung	Dephosphocholinierung
TITSSYYR-SUMO	+	+
SUMO-TITSSYYR	+	+
TITSSYYR-MBP	+	+
MBP-TITSSYYR	+	-
AATSSYYA-SUMO	+	-
TSSYYA-SUMO	+	-
SUMO-AATSSYYA	+	-
SUMO-AATSSYY	-	/
DrrA-TSSYY	-	/
DrrA-A	+	-
DrrA-B	+	-
DrrA-C	+	-
DrrA-C5	+	-
DrrA-D	unlöslich	/

Die Termini eignen sich dabei gut als Position für die Erkennungssequenz, da sie in vielen Fällen die Faltung des Proteins nicht beeinflussen. Außerdem sind die Termini häufig flexibel und exponiert und somit für Interaktionspartner leichter zugänglich. So war sowohl bei SUMO als auch bei MBP die Herstellung der entsprechenden terminalen Peptidfusionskonstrukte im Vergleich zu den Wildtypproteinen gleichermaßen unproblematisch, was darauf schließen lässt, dass der Peptid-Tag keinen negativen Einfluss auf die Faltung und Löslichkeit des

Proteins hat. Im Hinblick auf die Modifizierung konnte zwar mit keinem dieser Proteine eine so gute Phosphocholinierungsrate wie bei Rab1b beobachtet werden, aber das Konstrukt TITSSYYR-SUMO, das mit einem k_{cat}/K_M von $122 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ im Vergleich zu Rab1b eine lediglich um den Faktor 50 verringerte katalytische Effizienz aufweist, lässt vermuten, dass mit künstlichen Substraten prinzipiell eine ähnlich effiziente Modifizierung möglich ist, wie bei Rab1b. Bei manchen Proteinen bedarf es möglicherweise noch weiterer Aminosäuren, die zwischen der Peptidsequenz und dem Terminus eingefügt werden müssen, um die nötige Flexibilität und Zugänglichkeit zu gewährleisten. So ist im Fall von MBP-TITSSYYR die verhältnismäßig schwache Modifizierbarkeit möglicherweise darauf zurückzuführen, dass das Peptid am C-Terminus von MBP für AnkX nicht gut zugänglich ist. Im Fall der Peptid-Insertionskonstrukte von DrrA konnte die Erkennungssequenz in drei von vier flexiblen Schleifenregionen ohne Einbußen bezüglich der löslichen Expression des Proteins eingefügt werden. Lediglich die Insertion zwischen I398 und S399 (DrrA-D) (s. 3.3.3) führte zu einer unlöslichen Expression des Proteins. Dies ist möglicherweise damit zu erklären, dass die gewählte Position direkt am Beginn einer α -Helix liegt, deren Ausbildung durch die Insertion des Octapeptids vermutlich gestört ist (s. Abbildung 56). Vermutlich ist auch die gesamte Faltung des Proteins dadurch stark beeinträchtigt. In den anderen drei Fällen wurde das Peptid jeweils inmitten einer Schleife mit einigem Abstand zu benachbarten Sekundärstrukturen inseriert, was die Proteinfaltung weniger stark beeinflusste. Die Phosphocholinierungsaktivität von AnkX erwies sich bezüglich aller drei löslichen DrrA-Octapeptidvarianten als ähnlich hoch und vergleichbar mit SUMO-TITSSYYR oder TITSSYYR-MBP. Damit kann festgestellt werden, dass die Erkennungssequenz auch in internen Schleifenregionen für AnkX zugänglich sein kann. Lediglich das Konstrukt DrrA-C5 mit der Pentapeptidinsertion zeigte eine geringere Phosphocholinierungsrate als die DrrA-Octapeptidkonstrukte. In diesem Fall ist vermutlich anzunehmen, dass die schwächere Phosphocholinierung auf das Fehlen des wichtigen Isoleucins in der Sequenz zurückzuführen ist.

Des Weiteren wurde untersucht, ob und wie die GEF-Aktivität von DrrA durch die Octapeptidinsertion und deren Modifizierung beeinträchtigt wird. Hierbei stellte sich heraus, dass die Insertion zwischen N509 und V510 den geringsten Einfluss auf die Aktivität des Enzyms nimmt. Auch das Anbringen der Phosphocholingruppe verringert die Aktivität nicht weiter. Dies ist damit zu erklären, dass diese Schleife nicht direkt an der Ausbildung der Interaktionsoberfläche zwischen DrrA und Rab1b beteiligt ist, was in der Komplexstruktur von DrrA-gebundenem Rab1b in Abbildung 56 deutlich zu erkennen ist, und somit der Einfluss dieser Region auf den katalytischen Nukleotidaustausch gering ist. Bei den anderen beiden DrrA-Insertionskonstrukten liegen die Insertionsstellen in Regionen, die direkt mit Rab1b wechselwirken, sodass die Interaktion und somit auch die katalytische Austauschaktivität vermutlich stärker beeinträchtigt werden. Dementsprechend zeigen die DrrA-A und -B-Mutante eine

um den Faktor 300 bzw. 1000 verringerte Austauschaktivität für Rab1b (s. Abbildung 38). Daher sollte für die Modifizierung von Proteinen durch AnkX eine Insertionsstelle für die Erkennungssequenz ausgewählt werden, die nicht an katalytischen Motiven, Interaktionsoberflächen oder Bindetaschen beteiligt ist, sodass eine maximale Aktivität des Zielproteins bewahrt wird.

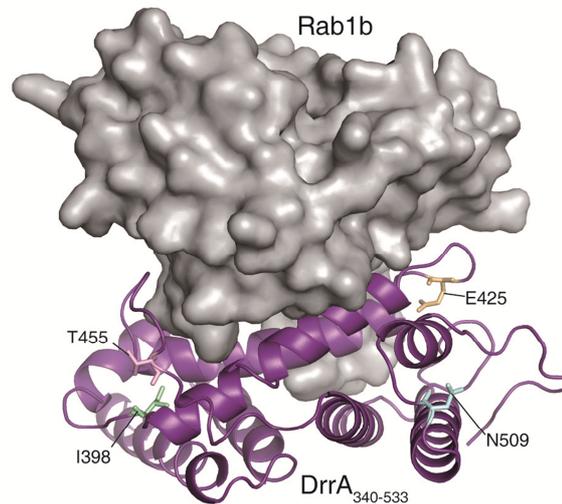


Abbildung 56: Röntgenkristallstruktur des Komplexes zwischen Rab1b und der GEF-Domäne von DrrA (DrrA₃₄₀₋₅₃₃) (PDB-ID: 3JZA) (Schoebel, Oesterlin et al. 2009). Das Rab-Protein ist im Oberflächenmodus in grau dargestellt. Die GEF-Domäne ist in der Tertiärstrukturdarstellung in lila gezeichnet. Die Aminosäuren, nach denen die Erkennungssequenz für die Herstellung der verschiedenen DrrA-Modellsubstrate eingefügt wurde, sind als *sticks* dargestellt und markieren die Schleifenregionen, in denen die Peptidinsertionen vorgenommen wurden. I398 ist in hellgrün, E425 in hellorange, T455 in rosa und N509 in hellblau gefärbt. Die engsten Kontakte zum Rab-Protein bilden die Schleifen aus, die durch die Positionen 425 und 455 gekennzeichnet sind.

Die Schlussfolgerungen der Untersuchung von Modellproteinen sind daher, dass die Insertion des AnkX-Erkennungsmotivs in Schleifenregionen grundsätzlich möglich ist, aber eine Position ausgewählt werden muss, die für AnkX leicht zugänglich ist, die nicht direkt flankiert wird von Sekundärstrukturen und entfernt von katalytisch aktiven Motiven oder Strukturen liegt.

Lem3 scheint im Gegensatz zu AnkX wählerischer im Hinblick auf potenzielle Substrate zu sein, da beispielsweise keines der phosphocholinierten DrrA-Peptidinsertionskonstrukte von Lem3 demodifiziert werden konnte (s. 3.3.4). Dies könnte daran liegen, dass die inserierten Peptide für Lem3 nicht zugänglich sind oder dass möglicherweise die Phosphocholingrouppe konformationelle Änderungen hervorruft, die dazu führen, dass der Phosphodiester von anderen Aminosäuren verdeckt wird und somit für Lem3 nicht mehr erreichbar ist. Möglicherweise ist aber auch DrrA als Modellprotein aufgrund seiner Struktur oder Oberfläche grundsätzlich nicht mit Lem3 kompatibel. Um dies zu überprüfen, müsste ein DrrA-Konstrukt mit C-terminalem phosphocholiniertem Octapeptid hinsichtlich der Lem3-abhängigen Dephosphocholinierung getestet werden. Eine andere Option wäre die Insertion der Erkennungssequenz in Schleifenregionen anderer Modellproteine, um auszuschließen, dass Lem3 generell

das in flexiblen Regionen inserierte Peptid nicht akzeptiert. Gleichmaßen konnte mit sämtlichen phosphocholinierten Konstrukten, die lediglich mit dem Pentapeptid TSSYY ausgestattet waren, keine Demodifizierung beobachtet werden, was vermutlich an dem fehlenden Isoleucin und Arginin liegt, die sich in vorangegangenen Experimenten als essentiell für die Demodifizierungsreaktion erwiesen haben (vgl. 3.2). Die grundsätzliche Anwendbarkeit von Lem3 im Hinblick auf künstliche Substrate konnte aber am Beispiel von TITS-S(PC)-YYR-SUMO, SUMO-TITS-S(PC)-YYR und TITS-S(PC)-YYR-MBP demonstriert werden, denn diese terminalen Peptid-Protein-Fusionskonstrukte konnten von Lem3 erfolgreich dephosphocholiniert werden, sodass festgestellt werden kann, dass Lem3 keine ausschließliche Spezifität für PC-Rab1b aufweist, sondern das Peptid prinzipiell auch in einem anderen Proteinkontext erkennt und akzeptiert. Vermutlich ist die Peptidsequenz an den Termini von Proteinen für Lem3 besser erreichbar, als in weniger exponierten internen Schleifenregionen.

4.4 CDP-Cholin-Derivate

Die Nukleotidbindetasche von AnkX wurde hinsichtlich der Akzeptanz für verschiedene CDP-Cholin-Derivate analysiert. Dabei stellte sich heraus, dass die Anwesenheit eines Amins an der Cholinkopfgruppe essentiell für eine erfolgreiche Markierungsreaktion ist, wobei der Substituierungsgrad des Amins zweitrangig ist. Denn es konnte gezeigt werden, dass sich sowohl Derivate mit primärem Amin (CDP-Ethanolamin), tertiärem Amin (Nukleotidderivat **2**) sowie mit quartärem Ammonium (CDP-Cholin und Moleküle **1**, **4**, **5**) als Cosubstrate für eine Proteinmarkierung eignen. Die Substitution des Ammoniums durch eine Etherfunktion verhinderte hingegen die Übertragung des Reportermoleküls. Eine Erklärung dafür lässt sich aus der Kristallstruktur von AnkX₁₋₄₈₄ mit gebundenem CDP-Cholin ableiten (s. Abbildung 18B). Darin ist die Koordination des positiv geladenen quartären Ammoniums durch ein Phenylalanin (F107) sowie ein Aspartat (D265) und ein Glutamat (E226) zu erkennen. Das Phenylalanin bildet dabei eine Kation- π -Interaktion aus und die beiden Säuren koordinieren das Amin jeweils über ionische Wechselwirkungen. Auch bei dem primären oder tertiären Amin sind diese Interaktionen möglich, denn sowohl das primäre als auch das tertiäre Amin liegt in wässriger Umgebung protoniert und somit positiv geladen vor. Die Ethergruppe an Stelle des Amins kollidiert hingegen aufgrund seiner negativen Partialladung mit den Elektronenwolken des Phenylalanins und den Säurefunktionen von Asp265 und Glu226, sodass dieses derivatisierte Nukleotid nicht von AnkX gebunden werden kann. Ebenfalls nicht gebunden wurde das Boc-geschützte CDP-Ethanolamin, wobei vermutet werden kann, dass die Koordination der Boc-Gruppe zum einen sterisch inhibiert ist, zum anderen aber auch die negative Partialladung der Boc-Funktion eine Rolle spielt, da sie von den Aminosäuren, die das Ammonium koordinieren wahrscheinlich abgestoßen wird. Dies konnte auch dadurch bestätigt werden, dass CDP-Cholin-N-PEG₆-N'-Boc, bei dem die Boc-Gruppe durch den langen PEG-Linker weit aus der Nukleotidbindetasche herausragen kann, ohne dass es zu einer sterischen Kol-

lision kommt, von AnkX akzeptiert und für eine erfolgreiche Proteinmodifizierung genutzt werden konnte (s. Abbildung 40). Mit diesem Molekül wurde zudem die generelle Verträglichkeit von PEG-Ketten mit dem Markierungssystem unter Beweis gestellt.

Des Weiteren wurden unterschiedlich lange PEG-Linker, über die die Sonde an das Nukleotid verknüpft werden sollte, getestet, um die minimale Linkerlänge zu identifizieren. Dabei stellte sich heraus, dass ein mit einem zweigliedrigen im Gegensatz zu einem vier- und sechsgliedrigen PEG-Linker ausgestattetes Nukleotid keine Übertragung der Sonde (Fluorescein) auf das Zielprotein ermöglicht. Hierbei kann vermutet werden, dass das sterisch relativ anspruchsvolle Fluorescein mit der Nukleotidbindetasche von AnkX kollidiert, wenn es über einen kurzen PEG₂-Linker am Nukleotid verknüpft ist und nicht, wie bei längeren Linkern aus dieser herausragen kann. Der PEG₄-Linker (Derivat **4**) konnte in dieser Studie als am besten für die Proteinmarkierung geeignet identifiziert werden, da er vergleichsweise kurz ist, aber maximale Übertragungsaktivität erlaubt (s. Abbildung 45-Abbildung 47). In einem nächsten Schritt müsste noch getestet werden, ob ein Linker mit drei PEG-Einheiten die gleiche Modifizierungseffizienz erlaubt wie der PEG₄-Linker, um die tatsächlich minimal mögliche Linkerlänge zu bestimmen. Ein kürzerer Linker hätte den Vorteil, dass das Zielprotein nur mit einem möglichst kleinen Molekül markiert würde, sodass das Risiko der Beeinträchtigung der Proteinfunktion ebenfalls minimiert werden würde. Außerdem könnten als Alternative Polyaminlinker an Stelle der PEG-Ketten erprobt werden, da diese die zusätzliche Eigenschaft besitzen, durch ihre positiven Ladungen die negativen Ladungen der Nukleotidphosphate zu kompensieren. Damit könnten ladungsneutrale Nukleotide geschaffen werden, die leichter die Zellmembran passieren können (Fouda und Pflum 2015).

Des Weiteren konnte herausgefunden werden, dass nicht nur Fluorescein als Sonde für die Markierung akzeptiert wird, sondern auch andere Fluorophore wie Coumarin und Aminophenyl-NBD (s. Abbildung 50). Dies und die Tatsache, dass auch Boc, wenn es über einen Linker mit dem Amin verknüpft vorliegt, durch AnkX-Katalyse auf ein Zielprotein übertragen werden kann, zeigen, dass bei ausreichender Länge des Linkers die Art und in einem gewissen Rahmen auch die Größe der Sonde keinen Einfluss auf die Transferreaktion nehmen. Somit kann geschlussfolgert werden, dass prinzipiell jedes kleine organische Molekül mit dem Nukleotid konjugiert und durch AnkX übertragen werden kann. Inwiefern größere Moleküle, wie z.B. verzweigte Glykanketten, übertragen werden können, muss in weiteren Studien untersucht werden.

Hinsichtlich der Lem3-katalysierten Hydrolysereaktion konnte gegenüber allen CDP-Cholin-Derivaten, die als AnkX-Substrate identifiziert werden konnten, ebenfalls eine Toleranz festgestellt werden. Da allerdings der Bindungsmodus von Lem3 gegenüber Phosphocholin und phosphocholinierten Proteinen noch unklar ist, kann an dieser Stelle nur spekuliert werden, dass für Lem3 aufgrund von ähnlichen strukturellen Gegebenheiten wie bei AnkX der Substi-

tutionsgrad des Amins keine große Rolle spielt. Möglicherweise wird das Amin im Lem3-Komplex ebenfalls mit Hilfe elektronenreicher Seitenketten von beispielsweise aromatischen oder sauren Aminosäuren koordiniert, sodass eine Binding der aminenthaltenden Derivate (**1**, **2** und **4**) realisierbar ist. Ebenso ist zu vermuten, dass das mit PEG₄-Fluorescein oder PEG₆-Fluorescein konjugierte Phosphocholin so in die aktive Tasche von Lem3 bindet, dass die Sonde aus dieser herausragen kann und somit nicht mit dieser kollidiert.

Abschließend kann also festgehalten werden, dass die effiziente reversible Markierung eines Proteins durch AnkX/Lem3, die Ausstattung des CDP-Cholin mit einem primären, tertiären oder quartären Amin sowie einem PEG-Linker, der mehr als zwei PEG-Einheiten enthält, erfordert.

4.5 *In vivo* Markierung

Die Anwendung der AnkX/Lem3-basierten Markierungsmethode für die Modifizierung von Proteinen *in vivo*, ergab zum Einen, dass AnkX unter Zellkulturbedingungen aktiv und das Nukleotid stabil ist, sodass davon ausgegangen werden kann, dass sich weder in dem Kulturmedium störende Faktoren befinden, noch die Zellen einen negativen Einfluss auf die Reaktion nehmen. Auch die Stabilität von phosphocholinisiertem Rab1b und die erfolgreiche Phosphocholinierung von Rab1b durch AnkX₁₋₈₀₀ in HEK293T-Lysat demonstrieren, dass die Zellen wahrscheinlich keine Bestandteile, wie zelluläre Phosphatasen, die die Phosphocholingruppe unspezifisch abspalten oder Proteasen, die zur Degradation von AnkX führen, aufweisen, die die Reaktion behindern oder die Modifikation degradieren würden. Somit wurden die Voraussetzungen für eine erfolgreiche AnkX-abhängige Proteinmodifizierung *in vivo* erfüllt. Die Markierung des membranlokalisierten hY₂R in Abhängigkeit von AnkX zur Demonstration der generellen Anwendbarkeit der Markierungsmethode *in vivo*, konnte hingegen nicht eindeutig gezeigt werden. Dies lag zum Einen daran, dass das Membranprotein mittels Western Blot Analyse gegen HA aufgrund der fehlenden Bande bei der entsprechenden Größe (72 kDa) nicht eindeutig nachgewiesen werden konnte (s. Abbildung 52A). Die verschmierten Banden im Bereich des Sammelgels, die nur in Lysaten, in denen ein HA-fusionierter hY₂R exprimiert wurde, zu erkennen waren, könnten möglicherweise dem Membranprotein zugeordnet werden, obwohl die mangelnde elektrophoretische Mobilität der detektierten Proteine nicht auf ein Protein von 72 kDa hinweist. Allerdings könnte es sich dabei um Aggregate des Rezeptors handeln, die beispielsweise bei der Lyse der Zellen gebildet wurden oder um Rezeptormembran Komplexe, die durch das Lysereagenz nicht getrennt werden konnten. Was dafür spricht, ist, dass in den Lysaten der Zellen, die nicht mit dem Rezeptor transfiziert wurden („untransfiziert“), derartige Banden nicht auftauchen. D.h. die verschmierten Banden im Bereich des Sammelgels müssen im Zusammenhang mit dem hY₂R-Protein stehen.

Aus den gleichen Gründen konnte auch die Phosphocholinierung des Modellproteins nicht eindeutig nachgewiesen werden. Denn der Western Blot gegen Phosphocholin (s. Abbildung 52B) zeigte zwar nur in Lysaten von Zellen, die sowohl mit AnkX als auch mit CDP-Cholin (im Gegensatz zu Zellen die nur mit CDP-Cholin oder ohne Zusatz) inkubiert wurden, verschmierte Banden, die den im Anti-HA-Blot vermutlich detektierten hY₂R-Banden entsprechen könnten. Allerdings konnten diese Banden auch in Zelllysaten nachgewiesen werden, die entweder untransfiziert oder mit einem nicht-modifizierbaren Rezeptorkonstrukt (HA-hY₂R-mCherry) transfiziert waren. Somit kann ausgeschlossen werden, dass es sich bei diesen verschmierten Banden um den phosphocholiniierten Rezeptor handelt. Sie können auch nicht von AnkX oder CDP-Cholin stammen, da in der entsprechenden Kontrollbahn keine derartigen Banden auftauchen. Die einzige verbleibende Möglichkeit ist, dass die Banden von Bestandteilen der HEK293T-Zellen stammen, die unspezifisch von AnkX phosphocholiniiert werden oder die unspezifisch mit CDP-Cholin interagieren. Ähnliche Erkenntnisse konnten aus den fluoreszenzmikroskopischen Beobachtungen gezogen werden. Denn auch hierbei wurde eine Markierung der Zellen detektiert, die nicht von AnkX abhängig ist, was den Schluss zulässt, dass Bestandteile der Zellen unspezifisch mit dem Nukleotid interagieren oder dass dieses möglicherweise auf der Oberfläche der Zellen adsorbiert wird oder dort präzipitiert.

Um die Markierung des hY₂R-Proteins eindeutig nachweisen zu können, muss also zum Einen die Bildung von Aggregaten verhindert und/oder die Trennung von möglichen Rezeptor-membrankomplexen bei der Zelllyse verbessert werden. Hierfür könnte ein anderer Lysepuffer oder eine andere Lysemethode als die chemische getestet werden. Eine weitere Erhöhung der SDS-Konzentration und eine längere Ultraschallbehandlung im Anschluss an die Lyse der Zellen könnte ebenfalls ein Herauslösen des Proteins aus Membranteilen fördern. Die vermutete unspezifische Interaktion des Nukleotids mit Bestandteilen der Zellen könnte weiter untersucht werden, indem lediglich einzelne Bestandteile des Nukleotids, wie z.B. Phosphocholin-N-PEG₄-N'-Fluorescein, hinsichtlich ihres Verhaltens getestet werden. Auf diese Weise könnte die unspezifische Interaktion genauer spezifiziert und einem Bestandteil des Nukleotids zugeordnet werden, der dann diesbezüglich optimiert werden könnte.

4.6 Bewertung der neuen Markierungsmethode und Vergleich mit anderen Methoden

In der vorliegenden Arbeit konnte demonstriert werden, dass eine prinzipielle Anwendung der Legionellenenzyme AnkX und Lem3 in Kombination mit CDP-Cholin-Derivaten zur Markierung von verschiedenen Proteinen möglich ist. Es konnte gezeigt werden, dass Zielproteine dabei lediglich rekombinant mit einer Peptidsequenz, die mindestens aus fünf Aminosäuren (TSSYY) besteht, ausgestattet werden müssen, um in AnkX-Substrate umgewandelt zu werden. Damit gehört diese Markierungsmethode zu denjenigen enzymatischen Markie-

rungstechniken, die sehr kurze Erkennungssequenzen erfordern und bei denen das zu modifizierende Protein somit sequenziell und strukturell minimal manipuliert werden muss. Ähnlich kurze Erkennungssequenzen weisen lediglich die Sortase (LPxTG) sowie die Farnesyltransferase (CaaX) auf (Kruger, Otvos et al. 2004, Dursina, Reents et al. 2005). Außerdem wird das Reportermolekül lediglich zusammen mit einer sehr kleinen Gruppe (Phosphocholin) auf das Zielprotein übertragen, sodass auch hier nur eine minimale Manipulation des Proteins stattfindet, von der ein geringes Risiko der sterischen Beeinträchtigung der Proteinfunktion ausgeht. Die meisten etablierten enzymatischen Markierungsmethoden übertragen das Reportermolekül hingegen in Kombination mit einer größeren Gruppe, wie z.B. Ppant, Biotin oder Farnesylpyrophosphat (Yin, Liu et al. 2004, Howarth, Takao et al. 2005, Duckworth, Zhang et al. 2007). Allerdings ist an dieser Stelle zu erwähnen, dass die Sonde im Fall der AnkX-abhängigen Markierung über einen vier- möglicherweise auch nur dreigliedrigen PEG-Linker mit dem Phosphocholin verknüpft werden muss, um eine Kollision der Sonde mit dem aktiven Zentrum von AnkX zu vermeiden, sodass die finale Modifikation am Zielprotein ebenfalls über den Umfang des Phosphocholins hinausgeht (vgl. 3.4.2). Aber auch bei anderen Modifizierungsstrategien müssen zusätzliche Gruppen in Kauf genommen werden. So wird Ppant häufig über maleimidfunktionalisierte Sonden derivatisiert, sodass das Maleimid zusätzlich zum Volumen des übertragenen Moleküls beiträgt (La Clair, Foley et al. 2004).

Eine weitere herausragende Eigenschaft, die in dieser Arbeit eingehend charakterisiert wurde und die die AnkX/Lem3-basierte Markierungsmethode von den meisten anderen enzymatischen Markierungsmethoden, aber auch von chemischen oder proteinbasierten Modifizierungen unterscheidet, ist die spurlose Reversibilität der Markierung. Von den beschriebenen Methoden können lediglich die FIAsH-Tag-Technologie, bei der hohe Konzentrationen an vicinalen Dithiolen das Arsensondenkonjugat vom Zielprotein verdrängen, sowie die Ppant-Strategie, bei der eine ACP-Hydrolase derivatisiertes Ppant vom Zielprotein abspaltet, eine reversible Markierung von Proteinen bewerkstelligen (s. 1.3.1 und 1.5.1) (Adams, Campbell et al. 2002) (Kosa 2014). Die Reversibilität der Markierungsreaktion hat die großen Vorteile, dass wertvolle Proteinproben nach dem Markierungsexperiment wieder zurückgewonnen oder verschiedene Marker aufeinander folgend an ein und derselben Proteinprobe angebracht werden können. Zum Beispiel können somit verschiedene Fluoreszenzmarker für eine bestimmte Anwendung ohne Verschwendung von Proteinproben zunächst ausgetestet werden oder verschiedene Funktionalisierungen für die Immobilisierung von Proteinen könnten erprobt werden. Andererseits ist die Phosphocholinierung in ihrer Eigenschaft als kovalente Modifizierung stabil und unterliegt keinem unspezifischen Abbau, wie durch die Stabilität von phosphocholinisiertem Rab1b in Zelllysaten bewiesen werden konnte (s. 3.5). Zudem kann die außerordentliche Variabilität dieser Markierungsmethode im Gegensatz zu beispielsweise

rekombinanten Methoden (s. 1.1) hervorgehoben werden. Denn die Phosphocholingruppe kann prinzipiell mit jedem gewünschten Reporter-molekül verknüpft werden, was durch die erfolgreiche Markierung von Rab1b mit Fluorescein, Coumarin, Aminophenyl-NBD sowie Boc bewiesen werden konnte (vgl. 3.4) und macht somit die Anwendung in vielen verschiedenen Bereichen, von der Fluoreszenzmarkierung über affinitätsbasierte Experimente (Immobilisierung etc.) bis hin zu Glykosylierungsstudien denkbar. Die Anwendbarkeit der enzymatischen Phosphocholinierung *in vivo* muss sich erst noch erweisen und diesbezüglich müssen CDP-Cholin-Derivate entworfen werden, die zellpermeabel sind. Mit der beobachteten Aktivität von AnkX gegenüber Rab1b in Zelllysaten und unter Zellkulturbedingungen sind die ersten Voraussetzungen hierfür jedoch bereits erfüllt. In der potenziellen Anwendbarkeit *in vivo* liegt eine große Stärke dieser Markierung, denn da sie als posttranslationale Modifikation aus einem biologischen System stammt, ist sie im Gegensatz zu vielen chemischen Markierungstechniken (s. 1.2) prinzipiell kompatibel mit den zellulären Gegebenheiten und kann auf harsche Bedingungen, wie z.B. den Einsatz von Metallionenkatalysatoren (s. 1.2.1), verzichten. Dennoch büßt diese Modifizierungsstrategie gegenüber den chemischen Methoden nicht an Spezifität ein, da die Substraterkennung über einen genetisch codierten Tag bewerkstelligt wird, der im besten Fall einzigartig für die gewünschte Proteinspezies ist. In diesem Punkt besteht noch weiterer Optimierungsbedarf, da die Erkennungssequenz TITSSYYR von AnkX/Lem3 insbesondere auch in einigen zellulären Rab-Proteinen zu finden ist. Um aber eine hundertprozentige Spezifität für das Zielprotein zu erreichen, muss entweder die Sequenz abgewandelt werden oder die Enzyme müssen dahingehend optimiert werden, dass sie endogene Rabs nicht mehr als Substrate akzeptieren.

Weiterer Optimierungsbedarf besteht außerdem noch hinsichtlich der katalytischen Effizienz der AnkX-basierten Markierungsmethode. Denn mit einem k_{cat}/K_M von $140 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ bezüglich der Markierung des besten Peptid-Protein-Fusionskonstrukts mit dem effizientesten Nucleotid CDP-Cholin-N-PEG₄-N'-Fluorescein (**4**) ist die Modifizierungsreaktion vergleichsweise langsam (s. Abbildung 46). Die meisten chemischen Markierungsmethoden haben zwar noch geringere Geschwindigkeitskonstanten, aber alle proteinbasierten Methoden (außer die DHFR-basierte Methode) weisen höhere Konstanten auf (s. Tabelle 2). Unter den enzymatischen Markierungsmethoden befindet sich die AnkX-abhängige Methode ebenfalls im unteren Mittelfeld, da lediglich das Sortagging eine geringere katalytische Effizienz aufweist. Allerdings ist hierbei zu erwähnen, dass viele der hier aufgelisteten und verglichenen proteinbasierten oder enzymatischen Methoden bereits einer Optimierung durch gerichtete Evolution des beteiligten Proteins in Bezug auf ihre Reaktionsgeschwindigkeiten unterzogen wurden. Beispielsweise wurde durch Einführung mehrerer Mutationen in die Dehalogenase, die für die Halo-Tag-Methode verwendet wird, eine $4 \cdot 10^4$ -fache Erhöhung der Markierungsgeschwindigkeit erzielt (Los, Encell et al. 2008).

Tabelle 2: Vergleich der katalytischen Effizienzen bzw. Geschwindigkeitskonstanten verschiedener Markierungsmethoden. Die Konstanten stellen gerundete Werte dar.

Markierungsmethode	Katalytische Effizienz k_{cat}/K_M bzw. Geschwindigkeitskonstante k ($M^{-1} s^{-1}$)	Quelle
Staudinger-Ligation	10^{-3}	(Lang und Chin 2014)
SPAAC	$10^{-2} - 1$	(Lang und Chin 2014)
CuAAC	10 - 200	(Lang und Chin 2014)
Diels-Alder-Ligation	1 - 10^4	(Lang und Chin 2014)
FIAsH-Tag	$10^4 - 10^5$	(Adams, Campbell et al. 2002)
DHFR+TMP	10 - 100	(Hinner und Johnsson 2010)
SNAP-Tag	$3 \cdot 10^4$	(Juillerat, Gronemeyer et al.
CLIP-Tag	10^3	(Hinner und Johnsson 2010)
Halo-Tag	$3 \cdot 10^6$	(Los, Encell et al. 2008)
PPTase	$4 \cdot 10^3$	(Rashidian, Dozier et al. 2013)
Sortase	50	(Rashidian, Dozier et al. 2013)
Biotin-Ligase	$4 \cdot 10^4$	(Rashidian, Dozier et al. 2013)
AnkX	140 (TITSSYYR-SUMO)	diese Arbeit (s. Abbildung 46)

Im Hinblick auf die AnkX/Lem3-basierte Technologie besteht ebenfalls noch großes Potenzial, die Geschwindigkeit der Modifizierung weiter zu verbessern, indem die Enzyme ebenfalls dahingehend evolviert werden, dass sie sowohl Peptid-Protein-Fusionskonstrukte als auch CDP-Cholin-Derivate besser erkennen und binden und somit für eine katalytisch effizientere Übertragung der Sonde auf das Zielprotein optimiert werden.

Ein weiterer nützlicher Aspekt ist, dass die AnkX/Lem3-basierte Methode auch die Möglichkeit bietet, mit anderen Methoden kombiniert zu werden. So könnten Proteine beispielsweise mit alkinmodifiziertem Phosphocholin markiert werden, das dann in einer Azid-Alkin-Cycloaddition (s. 1.2.1) mit einer azidfunktionalisierten Sonde verknüpft werden könnte. Die daraus resultierende Modularität hätte den Vorteil, dass für die unterschiedlichsten Markierungsexperimente nur ein CDP-Cholin-Derivat synthetisiert werden müsste, das dann mit verschiedenen kommerziell erhältlichen und entsprechend funktionalisierten Sonden mittels Click-Chemie verknüpft werden könnte. Aber auch die Kombination mit einer anderen enzymatischen Markierungsmethode für die Doppelmodifizierung einer Proteinspezies wäre denkbar.

5. Ausblick

Wie im vorangegangenen Kapitel erläutert wurde, bedarf es in einigen Punkten einer weiteren Optimierung der AnkX/Lem3-basierten Markierungsmethode, um sie universell anwendbar und konkurrenzfähig gegenüber bereits etablierten Methoden zu machen. An erster Stelle steht hierbei die weitere Optimierung der Enzyme. Bezüglich AnkX wären mehr Erkenntnisse über den Modus der Proteinsubstratbindung wünschenswert, um diesbezüglich Verbesserungen durch gerichtete Evolution der entsprechenden AnkX-Domäne erzielen zu können. Eine Möglichkeit, dies zu erreichen, wäre die röntgenkristallographische Strukturaufklärung von Komplexen zwischen AnkX und seinen Substratproteinen (z.B. Rab1b). Da die Interaktion von AnkX mit Rab1b allerdings nur eine geringe Stabilität aufweist, könnte die Ausbildung eines kovalenten Komplexes Abhilfe schaffen. Um dies zu erreichen könnte in einen der beiden Bindungspartner mit Hilfe der Amber Codon-Unterdrückung (s. 1.4) eine thiolreaktive Seitenkette, wie z.B. ein Haloalkan, als unnatürliche Aminosäure eingebaut werden, die bei Komplexbildung der beiden Proteine mit einem Cystein des anderen Bindungspartners eine kovalente Thioetherbindung formieren würde (sog. *proximity-enabled protein crosslinking*) (Xiang, Lacey et al. 2014). Eine weitere Möglichkeit wäre, ein Derivat von CDP-Cholin zu entwerfen, das zu einer kovalenten Komplexbildung führt, weil das Phosphocholin, das auf das Substratprotein übertragen wird, ebenfalls kovalent mit AnkX verknüpft ist. Dieses CDP-Cholin-Derivat müsste hierfür an oder statt der Ammoniumgruppe beispielsweise eine thiolreaktive Gruppe tragen, die dann mit einem Cystein in der Nukleotidbindetasche eine kovalente Bindung eingehen könnte. Die Strukturaufklärung dieses Komplexes würde zudem Aufschlüsse über die genaue Struktur der ARHD und die Hypothese der Interaktion von Rab1b mit der vorhergesagten Haarnadelschleife geben (vgl. 4.1).

Gleichermaßen könnte die Strukturaufklärung von Lem3 nützliche Hinweise auf dessen Interaktion mit modifizierten Proteinsubstraten und den genauen Mechanismus der Phosphodiester-spaltung liefern. Auch in diesem Fall wäre die Methode des *proximity-enabled protein crosslinking* eine geeignete Möglichkeit, um eine Stabilisierung des Komplexes zu erzielen. Dabei könnte sogar auf die Amber Codon-Unterdrückung verzichtet werden, da das Protein-substrat durch AnkX mit einem thiolreaktiven Phosphocholinderivat modifiziert werden könnte, das dann mit einem Cystein in der aktiven Tasche einer Lem3-Mutante reagieren könnte. Hinsichtlich der Erkennungssequenz wäre es wünschenswert, Peptide zu identifizieren, die eine von Rab1b unterscheidbare Sequenz aufweisen. Durch gerichtete evolutive Optimierung der Enzyme AnkX und Lem3 könnte somit bewerkstelligt werden, dass in zellbasierten Studien keine endogenen Rab-Proteine und auch sonst keine endogenen Proteine, außer dem gewünschten Zielprotein markiert werden. Dazu müsste jede Aminosäure der Peptidsequenz in jede andere der 19 proteinogenen Aminosäuren mutiert und bezüglich der Phos-

phocholinierung getestet werden. Hierzu eignen sich insbesondere Hochdurchsatzverfahren, wie microarraybasierte Technologien, bei denen eine Vielzahl von Peptiden positionsgenau auf einer Oberfläche immobilisiert und dann mit AnkX und beispielsweise CDP-Cholin-Fluorophor-Konjugaten inkubiert werden können (Schutkowski, Reimer et al. 2004). Die erfolgreiche Markierung und somit Identifizierung eines neuen Peptidsubstrats könnte dann anhand des Fluoreszenzsignals detektiert werden. Da die Aktivität von AnkX auf derartigen Peptidmicroarrays bereits erfolgreich getestet werden konnte, sind die Voraussetzungen für einen solchen Screen erfüllt.

Bei der Evaluierung verschiedener CDP-Cholin-Derivate hat sich herausgestellt, dass AnkX und Lem3 verschiedene Sonden (Fluorescein, Coumarin, Aminophenyl-NBD und Boc) an der Ammoniumgruppe akzeptieren. Wo allerdings hinsichtlich der Größe der Sonde die Grenzen liegen, ist noch nicht klar. Daher müssten zukünftig noch größere Sonden, wie z.B. Glykanketten oder ganze Proteine als Reportermoleküle ausgetestet werden. Es wäre außerdem interessant zu untersuchen, ob ganze Oberflächen mit CDP-Cholin verknüpft werden können, um durch AnkX-katalysierte Phosphocholinierung Proteine auf diesen immobilisieren zu können. Auch ein alternativer Verknüpfungspunkt der Sonde bzw. des Linkers als das Ammonium könnte analysiert werden, um möglicherweise bessere Übertragungsraten zu erzielen. Dafür kämen die beiden C-Atome des Ethyls sowie das β -Phosphat infrage. Außerdem sollte für eine Minimierung der Linkerlänge neben PEG₂ und PEG₄ noch ein PEG₃-Linker erprobt werden. Die Anbringung der Sonde über Polyamin- an Stelle des PEG-Linkers könnte dem Nukleotid zudem eine verbesserte Zellpermeabilität verleihen, da die positiv geladenen Amine die hinderliche negative Ladung der Phosphate kompensieren könnten.

Schließlich könnte die hier vorgestellte enzymatische Markierungsmethode in verschiedenen Fragestellungen Anwendung finden. Beispielsweise könnten zelluläre Proteine, die mit der optimierten Erkennungssequenz ausgestattet wurden, durch AnkX fluoreszent markiert werden, um ihre Lokalisation in der Zelle bestimmen oder auf diese Weise ganze Kompartimente markieren zu können. In zukünftigen Experimenten könnte die Methode zudem ausgenutzt werden, um Doppelmarkierungen eines Proteins zu realisieren, die beispielsweise für Förster Resonanzenergietransfer (FRET)-basierte Faltungsstudien nützlich wären. Dazu müsste das Zielprotein an zwei möglichst weit entfernten Positionen, wie z.B. den Termini, mit den Erkennungssequenzen TITSSYYR und TITSTYYR für AnkX ausgestattet werden. Da lediglich das Serin durch Lem3 demodifiziert werden kann, läge nach einer ersten Markierung des Proteins mit AnkX und einem fluoreszenten CDP-Cholin-Derivat (z.B. CDP-Cholin-N-PEG₄-N'-Fluorescein) und der anschließenden Behandlung mit Lem3, das Protein wieder nur einfach markiert am Threonin der TITSTYYR-Sequenz vor. Die erneute Inkubation mit AnkX und einem anderen fluoreszenten Nukleotid (z.B. CDP-Cholin-N-PEG₄-N'-Coumarin) würde

dann den zweiten Fluorophor am Serin von TITSSYYR anbringen. Werden als Fluorophore FRET-Partner ausgewählt, kann die Ent- und Rückfaltung eines Proteins durch die Zu- oder Abnahme der Distanz zwischen den Fluorophoren mittels FRET verfolgt werden.

6. Material und Methoden

6.1 Material

6.1.1 Chemikalien

Tabelle 3: Auflistung aller verwendeten Chemikalien und der zugehörigen Hersteller.

Chemikalie	Hersteller
Acetonitril	VWR Prolabo Chemicals, Fontenay sous Bois, F
Acrylamid	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, D
Agarose	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, D
Ameisensäure	Fluka, Steinheim, D
Ammoniumpersulfat (APS)	Amresco, Solon, Ohio, US
β -Mercaptoethanol	VWR Prolabo Chemicals, Leuven, B
BSA steril	Sigma Aldrich, Steinheim, D
Bromphenolblau	Alfa Aesar GmbH & Co KG, Karlsruhe, D
Coomassie® Brilliant Blau R-250	AppliChem, Darmstadt, D
Cytidin-5'-Diphosphat (CDP)	Carbosynth, Berkshire, UK
Cytidin-5'-Diphosphat (CDP)-Cholin	Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY, US und Carbosynth, Berkshire, UK
Cytidin-5'-Diphosphat (CDP)-Cholin-PEG ₂ -Fluorescein	Hedberg Lab, Universität Umeå, S
Cytidin-5'-Diphosphat (CDP)-Cholin-PEG ₄ -Fluorescein	Hedberg Lab, Universität Umeå, S
Cytidin-5'-Diphosphat (CDP)-Cholin-PEG ₆ -Fluorescein	Hedberg Lab, Universität Umeå, S
Cytidin-5'-Triphosphat (CTP)	Carbosynth, Berkshire, UK
di-Natriumhydrogenphosphat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Fluka, Sigma Aldrich, Steinheim, D
1,4-Dithioerythritol (DTE)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Essigsäure	VWR Prolabo Chemicals, Leuven, B
Ethanol, biology grade	VWR Prolabo Chemicals, Leuven, B
Ethanol, technisch	VWR Prolabo Chemicals, Fontenay sous Bois, F
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	AppliChem, Darmstadt, D
Glucose	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Glycerin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Glycin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Guanidiniumchlorid	VWR Prolabo Chemicals, Leuven, B
Guanosin-5'-Diphosphat (GDP)	Carbosynth, Berkshire, UK

Guanosin-5'-Triphosphat (GTP)	Carbosynth, Berkshire, UK
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (Hepes) Natriumsalz	AppliChem, Darmstadt, D und VWR Prolabo Chemicals, Fontenay sous Bois, F
Imidazol	Alfa Aesar GmbH & Co KG, Karlsruhe, D
Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Carbosynth, Berkshire, UK
Isopropanol biology grade	VWR Prolabo Chemicals, Leuven, B
Kaliumchlorid	VWR Prolabo Chemicals, Leuven, B
LB-Medium	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Magenesiumchlorid	VWR Prolabo Chemicals, Leuven, B
Methanol	Fluka, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, US
Natriumazid	Alfa Aesar GmbH & Co KG, Karlsruhe, D
Natriumchlorid	VWR Prolabo Chemicals, Leuven, B
Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Natriumhydroxid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Nickelsulfat Hexahydrat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Amresco, Solon, Ohio, US
Roti®-Block	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Salzsäure	VWR Prolabo Chemicals, Fontenay sous Bois, F
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Amresco, Solon, Ohio, US
Trifluoressigsäure (TFA)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Tween® 20	Fluka, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, US
Xylencyanol	AppliChem, Darmstadt, D

6.1.2 Verbrauchsmaterial

Tabelle 4: Auflistung aller verwendeten Verbrauchsmaterialien und der zugehörigen Hersteller.

Material	Hersteller
Amicon Filtereinheiten	Merck Millipore, Cork, IRL
Bottle-Top-Filter	Berrytec, Grünwald, D
Dialyseschlauch (MWCO 12-14K)	Serva, Heidelberg, D
Kanülen	Braun, Melsungen, D
Konzentratoren Spin-X UF 500	Corning, Lowell, MA, USA
Küvetten (UV-Vis)	Sarstedt, Nümbrecht, D
μ -slide 4-Well ibiTreat	Ibidi, Martinsried, D
Nitrocellulosemembran	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Pasteurpipetten	Sarstedt, Nümbrecht, D
PCR-Reaktionsgefäße (0,2 mL)	Sarstedt, Nümbrecht, D

Petrischalen	Sarstedt, Nümbrecht, D
Reaktionsgefäße (1,5 mL)	Ratiolab, Dreieich, D
Reaktionsgefäße (2,0 mL)	Lab Logistics Group, Meckenheim,
Reaktionsgefäße (1,5 mL, braun)	Sarstedt, Nümbrecht, D
Reaktionsgefäße (15 mL, 50 mL)	Sarstedt, Nümbrecht, D
Serologische Pipetten (5 mL, 10 mL, 25 mL, 50 mL)	Sarstedt, Nümbrecht, D
Pipettenspitzen (1-10 µL)	StarLab, Hamburg, D
Pipettenspitzen (10-100 µL)	Sarstedt, Nümbrecht, D
Pipettenspitzen (100-1000 µL)	Brand, Wertheim, D
Spritzenvorsatzfilter	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Spritzen	Braun, Melsungen, D
Whatman-Papier	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Zellkulturflaschen	Sarstedt, Nümbrecht, D
ZipTips	Merck Millipore, Cork, IRL

6.1.3 Geräte

Tabelle 5: Auflistung aller verwendeten Geräte, ihrer Bezeichnung und ihres Herstellers.

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Analysenwaage	ACJ 120-4M	Kern, Balingen, D
Autoklav	Systemec VE-65	Systemec, Linden, D
CO ₂ -Inkubator	HERACELL 150i	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Elektronische Pipettierhilfe	Eppendorf Easypet®	Eppendorf, Hamburg, D
ESI-Massenspektrometer	MS: LCQ-Fleet HPLC: Ultimate 3000 - Pumpe, -Autosampler, - Säulenkompartment, Ulti- mate RS Variable Wave- length Detector	Thermo Scientific, Mün- chen, D Dionex (Dreieich, D)
Feinwaage	EG 2200-2NM	Kern, Balingen, D
Fluoreszenzmikroskop	DMi8	Leica, Wetzlar, D
Fluoreszenzscanner	Typhoon	GE, Freiburg, D
Fluoreszenzspektrometer	Fluoromax-3/-4	Horiba Jobin Yvon, Fukuo- ka, J
FPLC	ÄktaPrime Plus	GE, Freiburg, D
Gefrierschrank (-80°C)	U410 Freezer	New Brunswick Eppendorf, Hamburg, D
Gelelektrophoresekammer	Mini Protean™ Tetra System	BioRad, München, D
Heizblock	AccuBlock™ Digital Dry Bath	Labnet international, Inc., Edison, NJ, USA
HPLC-Anlage		Shimadzu, Tokio, J
Imager für Chemolumines- zenz	Image Quant LAS4000	GE, Freiburg, D
Inkubationsschüttler	Innova 44	New Brunswick Eppendorf, Hamburg, D

Inkubator		Binder, Tuttlingen, D
Lichtmikroskop	Leica DM IL	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, D
Mikrowelle		Bomann, Kempen, D
NanoDrop	NanoDrop2000 Spectropho- tometer	Peqlab, Erlangen, D
Orbitalschüttler	Shaker-Dos-10L	Neolab, Heidelberg, D
pH-Meter und Elektrode	pHenomenal™ und pHe- nomenal 111	VWR, Radnor, PA, USA
Pipetten	Eppendorf Research®	Eppendorf, Hamburg, D
Power Supply	PowerPac™ Basic, EPS 601	BioRad, München, D
Rührzelle	Amicon Stirred Ultrafiltration Cell 8050 und 8200	Merck Millipore, Cork, IRL
Semi-Dry-Blotter	V20-SDB	Scie-Plas, Holliston, MA,
Sterilbank	HERAsafe	Heraeus, Hanau, D
Thermo-Cycler	T100™ Thermal Cycler	BioRad, München, D
Thermomixer	Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg, D
Tischzentrifuge	5424, 5424R, 5810R	Eppendorf, Hamburg, D
Ultraschallgerät	Sonifier 250	Branson, Fürth, D
UV-Vis-Spectrophotometer	Novaspec II	Pharmacia, Uppsala, S
Vakuumpumpe	Divac 2.4L	Leybold, Köln, D
Wasseraufbereitungssystem	TKA-GenPure 08.223	Peqlab Thermo Scientific, Wilmington, USA
Zellaufschlussmaschine	Constant Cell Disruption Systems	Merck Millipore, Cork, IRL
Zellhomogenisator	Silent Crusher M	Heidolph, Schwabach, D
Zentrifuge	Avanti® J-26 XP mit Rotor JA 25.50, Sigma 8K	Beckmann Coulter, Brea, CA, USA Sigma Laborzentrifugen, Osterode am Harz, D

6.1.4 Chromatographiesäulen

Tabelle 6: Auflistung der verwendeten Chromatographiesäulen und ihrer Hersteller.

Chromatographie	Säule	Hersteller
IMAC	HiTrap	GE, Uppsala, S
Gelfiltration	Superdex 16/600 75 pg	GE, Uppsala, S
	Superdex 16/600 200 pg	GE, Uppsala, S
	Superdex 26/600 75 pg	GE, Uppsala, S
	Superdex 10/300 75 pg	GE, Uppsala, S
RP-HPLC	Aeris Widepore C4, 2.1·50 mm	Phenomenex, Torrance, CA, USA
	Aeris Widepore XB C8, 2.1·50 mm	

6.1.5 Lösungen

Tabelle 7: Auflistung aller verwendeten Lösungen und ihrer Zusammensetzungen.

Bezeichnung	Zusammensetzung
TBE-Puffer	89 mM Tris Base pH 8,0 89 mM Borsäure 2 mM EDTA in ddH ₂ O
SDS-Laufpuffer (10x)	250 mM Tris Base 35 mM SDS 1,92 M Glycin in ddH ₂ O
Trenngel-Puffer (4x)	1,5 M Tris Base pH 6,8 14 mM SDS in ddH ₂ O
Sammelgel-Puffer (4x)	500 mM Tris Base pH 8,8 14 mM SDS in ddH ₂ O
SDS-Probenpuffer	62,3 mM Tris-HCl pH 6,8 2 % (w/v) SDS 10 % (v/v) Glycerol 5 % (v/v) β-Mercaptoethanol 0,001 % (w/v) Bromphenolblau in ddH ₂ O
SDS-Gel-Färbelösung	1,82 mM Coomassie® Brilliant Blue R-250 44 % (v/v) Ethanol 44 % (v/v) ddH ₂ O 12 % (v/v) Essigsäure in ddH ₂ O
SDS-Gel-Entfärbelösung	10 % (v/v) Essigsäure in ddH ₂ O
SOC-Medium	0,5 % (w/v) Hefeextrakt 2,0 % (w/v) Trypton 10 mM NaCl 2,5 mM KCl 10 mM MgCl ₂ 10 mM MgSO ₄ 0,4 % (w/v) Glucose in ddH ₂ O
DNA-Ladepuffer	50 % (v/v) Glycerol 10 mM EDTA 0,2 % (w/v) Bromphenolblau 0,2 % (w/v) Xylencyanol in ddH ₂ O

Blotting Puffer	48 mM Tris-Base 39 mM Glycin 1,3 mM SDS 20 % Methanol in ddH ₂ O
TBS-T	50 mM Tris-Base pH 7,6 150 mM NaCl 0,1 % Tween® 20 in ddH ₂ O
PBS	2,74 M NaCl 53,7 mM KCl 202 mM Na ₂ HPO ₄ (2x H ₂ O) 35,2 mM KH ₂ PO ₄ in ddH ₂ O

6.1.6 Nährmedien

Tabelle 8: Auflistung aller verwendeten Nährmedien und ihrer Zusammensetzungen bzw. Hersteller.

Nährmedium	Zusammensetzung/ Hersteller
LB-Flüssigmedium	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
LB-Agar	10 g Trypton 5 g Hefeextrakt 10 g NaCl 15 g Agar in ddH ₂ O
SOC-Medium	5 g Hefeextrakt 20 g Trypton 2 mL NaCl 5 M 0,833 mL KCl 3 M 10 mL MgCl ₂ 10 mL MgSO ₄ 3,96 g Glucose in ddH ₂ O
DMEM	Sigma Aldrich, Steinheim, D
DMEM indikatorfrei	Sigma Aldrich, Steinheim, D
FBS	Sigma Aldrich, Steinheim, D
HBSS	Sigma Aldrich, Steinheim, D
Optimem	Gibco Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

6.1.7 Bakterien

Tabelle 9: Auflistung aller verwendeten Bakterienstämme mit Genotypen und Herstellern.

<i>E.coli</i>-Stamm	Genotyp	Hersteller
BL21 DE3	$F^- ompT hsdS_B (r_B^- m_B^-) gal dcm+ Tetr gal \lambda(DE3)$	Novagen, Merck Biosciences Ltd., Nottingham, UK
BL21 DE3 RIL	$B F^- ompT hsdS (r_B^- m_B^-) dcm+ Tetr gal \lambda(DE3) endA Hte [argU ileY leuW (Camr)]$	Stratagene, Agilent Technologies, Waldbronn, D
XL1 Blue	$recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F^+ proAB lacIqZ\Delta M15 Tn10 (Tetr)]$	Stratagene, Agilent Technologies, Waldbronn, D

6.1.8 Plasmide

Tabelle 10: Auflistung der wichtigsten verwendeten Plasmide.

Plasmid	codiertes Protein	Hersteller
M0010 pET19 AnkX ₁₅₅₋₂₉₁	AnkX ₁₅₅₋₂₉₁	K. Heller, AG Proteinchemie, TUM
M0015 pOPIN-NHis-3C-AnkX ₁₃₁₋₃₂₀	AnkX ₁₃₁₋₃₂₀	DPF
M0020 pOPIN-NHis-3C-AnkX ₆₋₃₂₀	AnkX ₆₋₃₂₀	DPF
M0033 pOPIN-NHis-3C-AnkX ₆₋₃₅₀	AnkX ₆₋₃₅₀	DPF
03278 pOPINF AnkX ₆₋₃₉₀	AnkX ₆₋₃₉₀	DPF
M0023 pOPIN-NHis-3C-AnkX ₇₁₋₃₉₀	AnkX ₇₁₋₃₉₀	DPF
M0139 pSGAT2-TEV AnkX ₁₋₄₈₄	AnkX ₁₋₄₈₄	K. Heller, AG Proteinchemie, TUM
M0225 pSGAT2-TEV AnkX ₁₋₄₈₄ H229A	AnkX ₁₋₄₈₄ H229A	K. Heller, AG Proteinchemie, TUM
M0246 pSGAT2-TEV AnkX ₁₋₅₂₉	AnkX ₁₋₅₂₉	K. Heller, AG Proteinchemie, TUM
M0247 pSGAT2-TEV AnkX ₁₋₅₈₅	AnkX ₁₋₅₈₅	K. Heller, AG Proteinchemie, TUM
M0248 pSGAT2-TEV AnkX ₁₋₆₂₀	AnkX ₁₋₆₂₀	K. Heller, AG Proteinchemie, TUM
M0249 pSGAT2-TEV AnkX ₁₋₆₈₈	AnkX ₁₋₆₈₈	K. Heller, AG Proteinchemie, TUM
M0250 pSGAT2-TEV AnkX ₁₋₇₂₁	AnkX ₁₋₇₂₁	K. Heller, AG Proteinchemie, TUM
M0251 pSGAT2-TEV AnkX ₁₋₇₆₉	AnkX ₁₋₇₆₉	K. Heller, AG Proteinchemie, TUM
M0140 pSGAT2-TEV AnkX ₁₋₈₀₀	AnkX ₁₋₈₀₀	K. Heller, AG Proteinchemie, TUM
M0412 pSGAT2-TEV AnkX ₁₋₈₀₀ H229A	AnkX ₁₋₈₀₀ H229A	K. Heller, AG Proteinchemie, TUM
03189 pET19 AnkX _{fl}	AnkX _{fl}	AG Goody, MPI Dortmund
03428 pET19-lpg0696	Lem3 _{fl}	AG Goody, MPI Dortmund
M005 pOPIN-His-MBP-Lem3 ₁₋₅₀₀	Lem3 ₁₋₅₀₀	DPF
02142 pMAL-Rab1b ₃₋₁₇₄	Rab1b ₃₋₁₇₄	AG Goody, MPI Dortmund

02991 pMAL-Rab35 CVIL	Rab35	AG Goody, MPI Dortmund
M0147 pET28-TITSSYYR-SUMO	TITSSYYR-SUMO	K. Heller, AG Proteinchemie, TUM
M0717 pET19-AATSSYYA-SUMO	AATSSYYA-SUMO	K. Heller, AG Proteinchemie, TUM
M0718 pET19-TSSYYA-SUMO	TSSYYA-SUMO	K. Heller, AG Proteinchemie, TUM
M0148 pET28- SUMO-TITSSYYR	SUMO-TITSSYYR	K. Heller, AG Proteinchemie, TUM
M0820 pET19-SUMO-AATSSYYA	SUMO-AATSSYYA	K. Heller, AG Proteinchemie, TUM
M0821 pET19-SUMO-AATSSYY	SUMO-AATSSYY	K. Heller, AG Proteinchemie, TUM
M0326 pET28-SUMO-TITSAYYR	SUMO-TITSAYYR	K. Heller, AG Proteinchemie, TUM
M0168 pMAL-TITSSYYR-MBP	TITSSYYR-MBP	F. Zauner, AG Proteinchemie, TUM
M0167 pMAL-MBP-TITSSYYR	MBP-TITSSYYR	F. Zauner, AG Proteinchemie, TUM
M0179 pET19- DrrA ₃₄₀₋₅₃₃ B	DrrA ₃₄₀₋₅₃₃ E425-TITSSYYR-S426	F. Zauner, AG Proteinchemie, TUM
M0178 pET19- DrrA ₃₄₀₋₅₃₃ A	DrrA ₃₄₀₋₅₃₃ T455-ITSSYYR-P456	F. Zauner, AG Proteinchemie, TUM
M0252 pET19- DrrA ₃₄₀₋₅₃₃ D octa	DrrA ₃₄₀₋₅₃₃ N509-TITSSYYR-D510	F. Zauner, AG Proteinchemie, TUM
M0243 pET19- DrrA ₃₄₀₋₅₃₃ D penta	DrrA ₃₄₀₋₅₃₃ N509-TSSYY-D510	F. Zauner, AG Proteinchemie, TUM
M0871 pVitro2- HA-hY ₂ R-mCherry	HA-hY ₂ R-mCherry	K. Heller, AG Proteinchemie, TUM
M0735 pVitro2- TITSSYYR-HA-hY ₂ R-mCherry	TITSSYYR-HA-hY ₂ R-mCherry	K. Heller, AG Proteinchemie, TUM
M0736 pVitro2- AATSSYY-HA-hY ₂ R-mCherry	AATSSYY-HA-hY ₂ R-mCherry	K. Heller, AG Proteinchemie, TUM
M0737 pVitro2- TSSYY-HA-hY ₂ R-mCherry	TSSYY-HA-hY ₂ R-mCherry	K. Heller, AG Proteinchemie, TUM
M0872 pVitro2- TITSAYYR-HA-hY ₂ R-mCherry	TITSAYYR-HA-hY ₂ R-mCherry	K. Heller, AG Proteinchemie, TUM

6.1.9 Antibiotika

Tabelle 11: Auflistung der verwendeten Antibiotika.

Antibiotikum	Endkonzentration in Medien	Hersteller
Ampicillin	125 µg/mL	AppliChem (Darmstadt, D)
Chloramphenicol	34 µg/mL	AppliChem (Darmstadt, D)
Kanamycin	50 µg/mL	AppliChem (Darmstadt, D)
Hygromycin	50 µg/mL	AppliChem (Darmstadt, D)

6.1.10 Oligonukleotide

Oligonukleotide wurden von IDT (Integrated DNA Technologies, Leuven, B) bezogen.

Tabelle 12: Auflistung der wichtigsten verwendeten Oligonukleotide.

Bezeichnung	Sequenz
AnkX_6-291_for	AAAAAACATATGGGGCCAAATCTACCTGGATTA-
AnkX_6-291_rev	AAAAAACTCGAGTTATTTACTTTGTTCAATAATTTTC
AnkX_155-390_for	AAAAAACATATGCTGAATCCAGAACAAATACCTGATC
AnkX_155-390_rev	AAAAAACTCGAGTTAATAAATAGGCGGTGCTCCTTG
AnkX_1-484_fw	AAAAAACCCGGGTTGGTAAAATTATGCCAAATC
AnkX_1-484_rv	AAAAAACTCGAGTTACAAGGCTGATATTAATTCGG
AnkX_1-800_rv	AAAAAACTCGAGTTATATATTGGTATGGGCACC
TITSSYYR_Ndel/EcoRI_for	TATG ACC ATT ACC AGC TCC TAT TAT CGT AAT G
TITSSYYR_Ndel/EcoRI_rev	AATTC ATT ACG ATA ATA GGA GCT GGT AAT GGT CA
TITSSYYR_BamHI/XhoI_for	GATCC ACC ATT ACC AGC TCC TAT TAT CGT AAT C
TITSSYYR_BamHI/XhoI_rev	TCGAG ATT ACG ATA ATA GGA GCT GGT AAT GGT G
TITSSYYR-SUMO_for	TATGACCATTACCAGCTCCTATTATCGTCA
TITSSYYR-SUMO_rev	TATGACGATAATAGGAGCTGGTAATGGTCA
SUMO-TITSAYYR-Stopp_for	GATCCACCATTACCAGCGCCTATTATCGTTAAC
SUMO-TITSAYYR-Stopp_rev	TCGAGTTAACGATAATAGGCGCTGGTAATGGTG
MBP-TITSSYYR_for	TATGACCATTACCAGCTCCTATTATCGTTAAG
MBP-TITSSYYR_rev	AATTCTTAACGATAATAGGAGCTGGTAATGGTCA
TITSSYYR-MBP_for	CTAGTACCATTACCAGCTCCTATTATCGTA
TITSSYYR-MBP_rev	CTAGTACGATAATAGGAGCTGGTAATGGTA
DrrA_340-533_for	AAAAAACATATGGTCAACAAGGATTGAAAATCTG- GAAAATGC
DrrA_340-533_rev	AAAAAAGGATCCTTATTTATAAGAAAGATATTCGGA- TAAATTTTCACCTTTAGAGC
Drra_TITSSYYR_loop1_for	ACCATTACCAGCTCCTATTATCGTCCTGATCCAGAT- TTTAAGGTTGGGAAATC
DrrA_TITSSYYR-loop1_rev	ACGATAATAGGAGCTGGTAATGGTT- GCTCGCTCATTTGGACTTAATTTAC
Drra_TITSSYYR_loop2_for	ACCATTACCAGCTCCTATTATCGTTCAACGG- TAGAGCCTGGTTTAGTATC
DrrA_TITSSYYR-loop2_rev	ACGATAATAGGAGCTGGTAATGGTTTCTGTGAGAG- TTGCAGCCG
Drra_TITSSYYR_loop3_for	ACCATTACCAGCTCCTATTATCGTTCTCCAAAAGGA- TATGCTATTTTACAATCTTTATGG
DrrA_TITSSYYR-loop3_rev	ACGATAATAGGAGCTGGTTATTGTTTTATCAC- TCAACTCTGGCCT
AnkX_1-529_rev	AAAAAACTCGAGTTAAAGCTCATCACTGATATCAG- CACC
AnkX_1-585_rev	AAAAAACTCGAGTTATAAGGGTATATCAA- TATCGACCCCGG
AnkX_1-620_rev	AAAAAACTCGAGTTAGGTATCGGTTAAACGTG-

AnkX_1-688_rev	TATTAGCTCC AAAAAACTCGAGTTATTCGAAATCGACCCTTGCCC
AnkX_1-721_rev	AAAAAACTCGAGTTATTTATGAAGTAAGGTGC- TATCTTTCTTGAC
AnkX_1-769_rev	AAAAAACTCGAG- TTAATCTTTTTTATTTAAATCGACTCCTTCTTTTAAAAGT AAATCAC
TITSSYYRGG-HA-hY2R_for	GCGTATCGATATGACCATTACCAGCTCC- TATTATCGTGGCGGCTACCCCTACGACGTCCC
HA-hY2R-linker_rev	CACGACCGGTGGATCCGCGAC
linker-mCherry_for	AAAGCGGATCCACCGGTCGTGCTGGTGAG- CAAGGGCGAGG
mCherry_rev	CTAGTCTTGTACAGCTCGTCC
TSSYYGG-HA-hY2R_for	GCGTATCGATATGACCAGCTCCTATTATGGCGGC- TACCCCTACGACGTCCCCGAC
AATSSYYGG-HA-hY2R	GCGTATCGATATGGCAGCAACCAGCTCC- TATTATGGCGGCTACCCCTACGACGTCCCCGA

6.1.11 Kits

Tabelle 13: Auflistung aller verwendeten Kits.

Kit	Hersteller
PureYield™ Plasmid Miniprep System	Promega (Mannheim, D)
PureYield™ Plasmid Midiprep System	Promega (Mannheim, D)
Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System	Promega (Mannheim, D)

6.1.12 Enzyme

Tabelle 14: Auflistung der verwendeten Enzyme.

Enzym	Hersteller
T4 Polymerase	New England Biolabs (Ipswich, USA)
Q5 Polymerase	New England Biolabs (Ipswich, USA)
QuickLigase	New England Biolabs (Ipswich, USA)
Restriktionsenzyme	New England Biolabs (Ipswich, USA)
DNase	Sigma Aldrich, Steinheim, D
TEV Protease	TU München, AG Proteinchemie
PreScission Protease	TU München, AG Proteinchemie

6.1.13 Antikörper

Tabelle 15: Auflistung der verwendeten Antikörper.

Antikörper	Epitop	Hersteller
IgA Kappa TEPC15	Phosphocholin (PC)	Sigma Aldrich, Steinheim, D
Pierce™ HA Epitope Tag Antibody	Hemagglutinin (HA)	Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA
Goat anti-mouse IgG, IgA, IgM (H+L) HRP conjugate	Maus	Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA

Goat anti-rabbit IgG HRP conjugate Kaninchen

Sigma Aldrich, Steinheim, D

6.1.14 Größenstandards

Tabelle 16: Auflistung der verwendeten Größenstandards.

Standard	Hersteller
DNA Ladder 1 kb	New England Biolabs (Ipswich, USA)
2-Log DNA Ladder	New England Biolabs (Ipswich, USA)
ColorPlus™ Prestained Protein Marker, Broad Range	New England Biolabs (Ipswich, USA)
Protein Test Mixture 6 for SDS-PAGE	Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg, D)
Gelfiltrationsstandard	Bio-Rad Laboratories GmbH (München, D)

6.2 Methoden

6.2.1 Molekularbiologische Methoden

6.2.1.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) dient der Vervielfältigung von ausgewählten DNA-Sequenzen.

In dieser Arbeit wurde die präparative PCR verwendet, um Gene zu amplifizieren, die in Expressionsvektoren ligiert werden sollten (z.B. das AnkX-Gen *lpg0695*). Hierzu wurde der folgende Reaktionsansatz pipettiert:

Tabelle 17: PCR-Pipettierschema.

Volumen	Zutat
10 µL	Q5-Reaktionspuffer
2,5 µL	DMSO
1,0 µL	dNTPs
100-200 ng	Templat-Plasmid
1,0 µL	Primer 1
1,0 µL	Primer 2
0,5 µL	Q5 Polymerase
auf 50 µL	ddH ₂ O

Das Temperaturprogramm wurde wie folgt durchgeführt:

Tabelle 18: PCR-Temperaturprogramm.

Initiale Denaturierung	95°C	5 min	
Denaturierung	95°C	30 s	} x 30
Anlagerung	50-68°C	30 s	
Elongation	72°C	30 s/kb	
Finale Elongation	72°C	5 min	
	4°C	∞	

Die Anlagerungstemperatur wurde individuell entsprechend der errechneten Schmelztemperatur der Primer gewählt und wurde jeweils 5°C unter dieser eingestellt. Die Elongationszeit bezieht sich auf die Länge des zu amplifizierenden Gens.

Im Gegensatz zur präparativen PCR wurden analytische PCRs ausschließlich für Kolonie-PCRs eingesetzt. Diese diente dazu, transformierte Zellklone zu identifizieren, die die gewünschte Ziel-DNA enthalten. Dabei wurden an Stelle des Templat-Plasmids transformierte Zellen als Templat verwendet.

Tabelle 19: Pipettierschema für analytische Kolonie-PCR.

Volumen	Zutat
2,0 µL	Q5-Reaktionspuffer
0,5 µL	DMSO
0,1 µL	dNTPs
1,0 µL	Zellkultur
0,1 µL	Primer 1
0,1 µL	Primer 2
0,1 µL	Q5 Polymerase
auf 10 µL	ddH ₂ O

Das Temperaturprogramm für Kolonie-PCRs unterschied sich nicht von demjenigen für die präparative PCR.

6.2.1.2 Agarose-Gelelektrophorese

Die analytische Agarose-Gelelektrophorese wird eingesetzt, um DNA aufzutrennen und ihre Größe zu bestimmen. Die präparative Agarose-Gelelektrophorese dient zusätzlich der Reinigung getrennter DNA-Moleküle.

Für beide Methoden wurde zunächst ein 1%iges Agarosegel aus 0,5 g Agarose und 50 mL TAE-Puffer mit 6-12 Taschen gegossen. Die zu analysierenden DNA-Proben wurden mit 10x DNA-Ladepuffer versetzt und in die Taschen des Gels gefüllt. Gleichmaßen wurden 10 µL eines Größenstandards (1 kb Ladder, NEB) aufgetragen. Anschließend wurde eine Spannung von 100 V für 30-45 min angelegt, wodurch die DNA durch das Gel zur Anode wandern konnte. Die DNA-Banden wurden nach Beendigung der Elektrophorese mittels ultraviolettem Licht sichtbar gemacht und mit den Banden des Größenstandards verglichen. Bei präparativen Agarose-Gelen wurden die Banden im Anschluss ausgeschnitten und die DNA mit Hilfe des Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) isoliert und gereinigt.

6.2.1.3 Restriktionsverdau

Der Verdau von DNA mit Restriktionsenzymen dient der Spaltung von DNA an spezifischen Positionen. Für den Restriktionsverdau wurde folgender Reaktionsansatz pipettiert:

Tabelle 20: Pipettierschema für Restriktionsverdau.

DNA	PCR-Produkt oder 5 µg Plasmid-DNA
Puffer CutSmart 10x	5 µL
Enzym 1	0,5 µL
Enzym 2	0,5 µL
ddH ₂ O	aufgefüllt auf 50 µL

Dieser Ansatz wurde für ca. 3 h bei 37°C inkubiert und anschließend mittels Agarose-Gelelektrophorese (s. 6.2.1.2) gereinigt.

6.2.1.4 Klonierung/ Ligation

Die Klonierung ist eine Methode zur positionsgerichteten Einbringung von Gensequenzen in Plasmide.

6.2.1.4.a Klassische Klonierung

Die klassische Klonierung beruht auf dem Verdau von Zielplasmid und Zielgen mit den gleichen Restriktionsenzymen, sodass sich genau zueinander passende Schnittenden ergeben. Mit Hilfe einer Ligase können die zusammengelagerten Enden von Gen und Plasmid verknüpft werden. Dazu wurden 100 ng des geschnittenen und gereinigten Plasmids mit einem 2-5fachen molaren Überschuss des Geninserts vermischt, mit sterilem ddH₂O auf 10 µL aufgefüllt und mit 10 µL QuickLigase-Puffer versetzt. Die Ligation wurde durch Zugabe von 0,5 µL QuickLigase gestartet. Nach 5-minütiger Inkubation bei RT wurden chemisch kompetente XL1-*E.coli*-Zellen mit dem Ligationsansatz transformiert (Transformation s. 6.2.1.6).

6.2.1.4.b T4-SLIC-Klonierung

Bei der T4-SLIC-Klonierung wird die 5'-Exonuclease-Aktivität der T4-Polymerase ausgenutzt. Diese generiert sowohl am Insert als auch am linearisierten Plasmid 3'-Überhänge, die, wenn das Insert mit entsprechenden Primern amplifiziert wurde, komplementär zueinander sind. Dadurch können sich die komplementären Enden aneinander anlagern, sodass das Zielgen in das Plasmid inseriert wird.

Für die T4-SLIC-Klonierung wurden 100 ng des geschnittenen und gereinigten Plasmids mit einem 2-5fachen molaren Überschuss an Insert-DNA, 1 µL NEB2-Puffer und 1 µL BSA (1 mg/mL) vereinigt und auf 10 µL mit ddH₂O aufgefüllt. Zuletzt wurde die T4-Polymerase zugefügt (0,5 µL), woraufhin der Reaktionsansatz für 2,5 min bei RT inkubiert wurde. Danach wurde der Ansatz für 10 min auf Eis inkubiert und schließlich wurden XL1-*E.coli*-Zellen mit diesem transformiert.

6.2.1.4.c Ligation von Primern

Bei der Einfügung von sehr kurzen DNA-Sequenzen in einen Vektor kann das Insert anstatt durch PCR direkt aus einem Primer-Paar hergestellt werden. Wenn die Primer derart gestaltet sind, dass sie am 3'- und 5'-Ende jeweils die gewünschten Restriktionsschnittstellen besitzen, dann kann das Primerinsert direkt in den entsprechend geschnittenen Vektor ligiert werden. Diese Methode wurde in dieser Arbeit verwendet, um Modellproteine (z.B. SUMO) rekombinant mit der Erkennungssequenz von AnkX (TITSSYYR) oder Abwandlungen dieser auszustatten. Zunächst wurden die jeweils komplementären Primer zu einem doppelsträngigen Insert aneinander gelagert. Dazu wurden je 0,5 µL jedes Primers mit Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 0,1 mg/mL BSA) vermischt und auf 50 µL mit H₂O aufgefüllt. Dieser Ansatz wurde dann in einem beheizbaren Aluminiumblock für 5 min bei 80°C inku-

biert. Anschließend wurde der Aluminiumblock samt Probe aus der Heizvorrichtung entnommen, sodass dieser langsam auf RT abkühlen konnte. Sobald die Probe RT erreicht hatte, wurde die Ligation in den zuvor geschnittenen Vektor wie in 6.2.1.4.a beschrieben durchgeführt.

6.2.1.5 Ortsspezifische Mutagenese (QuickChange®)

Die ortsspezifische Mutagenese ist eine Methode, mit der einzelne oder auch mehrere Punktmutationen in ein Gen eingeführt werden können, was zur Folge hat, dass das Genprodukt (Protein) an einer oder an mehreren Positionen eine Aminosäuresubstitution trägt.

Für die ortsspezifische Mutagenese wurde zunächst ein Primer mit dem QuickChange® Primer Design Programm (<http://www.genomics.agilent.com/primerDesignProgram>) von Agilent Technologies entworfen, der komplementär zur Gensequenz ist, aber an der gewünschten Stelle ein anderes Codon trägt. Mit diesem Primer wurde dann eine PCR auf dem entsprechenden Templat-Plasmid mit dem folgenden Pipettierschema und Temperaturprogramm durchgeführt.

Tabelle 21: Pipettierschema für Mutagenese-PCR.

Volumen	Zutat
10 µL	Q5-Reaktionspuffer
2,5 µL	DMSO
2,0 µL	dNTPs
100-200 ng	Templat-Plasmid
1,0 µL	Primer 1
0,5 µL	Q5 Polymerase
auf 50 µL	ddH ₂ O

Tabelle 22: Temperaturprogramm für Mutagenese-PCR.

Initiale Denaturierung	95°C	5 min	
Denaturierung	95°C	30 s	} x 30
Anlagerung	50-68°C	30 s	
Elongation	72°C	30 s/kb	
Finale Elongation	72°C	5 min	
	4°C	∞	

Die Anlagerungstemperatur wurde individuell entsprechend der errechneten Schmelztemperatur der Primer gewählt und wurde jeweils 5°C unter dieser eingestellt. Die Elongationszeit wurde so eingestellt, dass nicht nur das Gen, sondern das gesamte Plasmid amplifiziert werden konnte und somit als Produkt der PCR das linearisierte Plasmid mit dem mutierten Codon entstand. Im Anschluss an die PCR wurde die Templat-DNA durch das Restriktionsenzym *DpnI* verdaut, sodass lediglich die amplifizierte DNA mit der Mutation zurück blieb. Dazu wurde das PCR-Produkt mit 5 µL CutSmart-Puffer (Mihai Gazdag, Streller et al.) und

0,5 µL des Enzyms versetzt, über Nacht bei 37°C inkubiert und das Enzym anschließend für 20 min bei 80°C inaktiviert. Mit dem gesamten Reaktionsansatz wurden danach chemisch kompetente XL1-*E.coli*-Zellen wie in 6.2.1.6 beschrieben transformiert.

6.2.1.6 Hitzeschock-Transformation

Bei der Transformation nehmen kompetente Zellen (z.B. *E.coli*) Plasmide über ihre Membran auf. Ziel ist es dabei entweder, die eingebrachten Plasmide durch *E.coli* zu amplifizieren oder aber *E.coli* mit dem Gencode für ein bestimmtes Protein auszustatten, der in der Folge exprimiert werden soll.

Zunächst wurden bei der Transformation 100 µL chemisch kompetenter Zellen (für Plasmidamplifikation: XL1 Blue; für Genexpression: BL21 DE3 RIL) mit ca. 100 ng Plasmid-DNA für 30 min auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte anschließend bei 42°C für 1 min. Danach wurden die Zellen 3 min auf Eis inkubiert und daraufhin mit 900 µL SOC-Medium versetzt, worauf eine 45 minütige Inkubation bei 37°C unter Schütteln (800 rpm) folgte. Diese Zellsuspension wurde dann für 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert, der Überstand abgeschüttet, das Zellpellet in dem verbliebenen Medium resuspendiert und auf einer LB-Agar-Platte mit einem entsprechenden Antibiotikum als Selektionsmarker ausgestrichen.

6.2.1.7 Vervielfältigung, Isolierung und Reinigung von Plasmid-DNA

Die Vervielfältigung von Plasmiden erfolgt in speziellen *E.coli*-Stämmen, wie z.B. XL1, wobei deren Replikationsmaschinerie ausgenutzt wird. Um ein Plasmid zu amplifizieren wurden zunächst chemisch kompetente XL1-*E.coli*-Zellen mit ca. 100 ng des gereinigten Zielplasmids mittels Hitzeschock transformiert (s. 6.2.1.6). Mit den über Nacht auf dem Selektionsmedium gewachsenen Kolonien wurden dann 4 mL-Kulturen angeimpft und üN bei 37°C und 270 rpm inkubiert. Danach wurden die Zellen durch Zentrifugation (5 min bei 13000 rpm) geerntet und daraus die Plasmide unter Verwendung des PureYield™ Plasmid Miniprep Systems (Promega) nach Anleitung isoliert und gereinigt.

6.2.2 Analytische Methoden

6.2.2.1 SDS-PAGE

Die Natrium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wird zur analytischen Trennung von Proteingemischen sowie zur Abschätzung von Proteingröße und -reinheit genutzt.

In dieser Arbeit wurden Gele verwendet, die aus einem 15 oder 20%igen Trenngel und einem 5%igen Sammelgel bestehen (Zusammensetzung s. 6.1.5). Die zu analysierenden Proteinproben wurden mit SDS-Probenpuffer denaturiert und in die Taschen des Gels gefüllt. Ein Proteinstandard (Serva) wurde ebenfalls auf das Gel geladen, um die Größenabschätzung zu ermöglichen. Die Elektrophorese wurde bei einer Stromstärke von 60 mA für ca. eine Stunde durchgeführt. Anschließend wurden Proteine im Gel mittels Coomassie Brilliant

Blau sichtbar gemacht. Dazu wurde das Gel in der Färbelösung aufgekocht und mit 10%iger Essigsäure durch Aufkochen entfärbt bis nur noch die angefärbten Proteinbanden sichtbar waren.

6.2.2.2 Western Blot

Das Western Blotting wird zur Identifizierung von Proteinen oder Proteinmodifikationen genutzt.

Hier wurde diese Methode angewendet, um die Phosphocholinierung von Proteinen durch das Enzym AnkX und das Cosubstrat CDP-Cholin zu detektieren und den zeitlichen Verlauf dieser Reaktion zu analysieren. Dazu wurden Proteine, die rekombinant mit der AnkX-Erkennungssequenz ausgestattet waren (z.B. TITSSYYR-MBP) mit 0,5 μM (im Fall von Rab1b₃₋₁₇₄, TITSSYYR-SUMO und TITSSYYR-MBP) oder 5 μM (in den übrigen Fällen) AnkX₁₋₈₀₀ und 1 mM CDP-Cholin bei RT inkubiert. Außerdem wurde der Reaktionslösung präparativ phosphocholinisiertes His₆-MBP-Rab1b₃₋₁₇₄ (2 μM) zugesetzt, welches als Beladungskontrolle diente. Vor und in bestimmten Zeitabständen nach der Zugabe des Enzyms wurden Proben genommen, in SDS-Probenpuffer aufgekocht, um die Reaktion abzustoppen und anschließend auf ein SDS-PA-Gel geladen. Als Proteinstandard wurde der ColorPlus™ Prestained Protein Marker, Broad Range 7-175 kDa von NEB verwendet. Die Gelelektrophorese wurde wie in 6.2.2.1 beschrieben durchgeführt. Im Anschluss wurden die aufgetrennten Proteine mit Hilfe eines Semi-Dry-Blotters (V20-SDP, SCIE-PLAS, LTD) und unter Verwendung von in Blotting Puffer (s. 6.1.5) getränktem Whatman-Papier auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Dabei wurde ein Strom von 0,7 mA/cm² für 2 h angelegt. Danach wurde die Membran für 0,5 h in TBS-T mit 1xRotiblock geblockt und anschließend mit dem primären Anti-Phosphocholin-Antikörper (Verdünnung 1:1000) μN bei 4°C oder für 2 h bei RT inkubiert. Darauf folgten drei zehninütige Waschschriffe mit Waschpuffer und die Inkubation mit dem sekundären Anti-Maus-Antikörper-HRP-Konjugat für 45 min bei RT. Nach drei weiteren Waschschriffen (je 10 min) wurde der Western Blot mit dem Western Bright™ ECL-Spray (advansta) entwickelt. Die Chemolumineszenz, die von der HRP-katalysierten Reaktion herrührt und die Anwesenheit des Zielproteins anzeigt, wurde mit dem ImageQuant LAS4000 (GE) detektiert.

Die Detektion von HA-markierten Proteinen wurde analog zur Detektion von PC-Proteinen durchgeführt. Als primärer Antikörper wurde allerdings der Anti-HA-Antikörper (Pierce™ HA Epitope Tag Antibody) in einer Verdünnung von 1:5000 eingesetzt. Als sekundärer Antikörper wurde ebenfalls der Anti-Maus-Antikörper verwendet.

Die densitometrische Auswertung von Western Blots erfolgte mit der Software ImageJ ((Schneider, 2012 #330). Um die Kinetik der Phosphocholinierungsreaktion bezüglich der verschiedenen Substratproteine zu bestimmen, wurden die Banden des jeweiligen Zielproteins zunächst jeweils auf die entsprechende Kontrollbande (PC-His₆-MBP-Rab1b) normiert.

Der Anteil an phosphocholinisiertem Protein wurde bestimmt, indem die relativen Bandenintensitäten mit der Bande des präparativ phosphocholinisierten Proteins (entspricht 100%) in Relation gesetzt wurde. Die hieraus erhaltenen Prozentzahlen wurden anschließend mit Hilfe der Gleichung aus der jeweiligen Eichkurve angepasst. Die durch Auftragung der Prozentzahlen gegen die Zeit erhaltenen Kurve wurden mit Hilfe der Software OriginPro 8.6 (Origin-Lab Corporation) an eine einfach exponentielle Gleichung (Gleichung (1)) angepasst.

Gleichung (1)
$$I(t) = I_0 + I_A \times e^{-k_{obs}/t}$$

$I(t)$: zeitabhängige Intensität der Banden,

I_0 : minimale Banden-Intensität,

I_A : Intensitätsamplitude ($I_A = I_{max} - I_0$, mit I_{max} : maximale Intensität),

k_{obs} : beobachtete Geschwindigkeitskonstante.

Aus der ermittelten Geschwindigkeitskonstante k_{obs} wurde dann durch Division mit der eingesetzten Enzymkonzentration die katalytische Effizienz k_{cat}/K_M bestimmt. Die katalytische Effizienz ist das Verhältnis der zwei Protein-beschreibenden Parameter k_{cat} (Wechselzahl) und K_M (Michaelis-Menten-Konstante) und spiegelt das Verhältnis zwischen der Zahl umgesetzter Substratmoleküle pro Sekunde und der Affinität des Enzyms wider. Dieses Verhältnis ist ein Maß für die Aktivität des Enzyms und kann insbesondere zum Vergleich mit anderen Proteinen herangezogen werden.

6.2.2.3 In-Gel-Fluoreszenz

Die In-Gel-Fluoreszenz wurde eingesetzt, um die Übertragung von fluoreszenten Phosphocholin-Derivaten auf Proteine zu detektieren. Hierbei wurden die mit der AnkX-Erkennungssequenz ausgestatteten Proteine (z.B. TITSSYYR-SUMO) (50 μ M) mit 1 μ M AnkX₁₋₈₀₀ und 100-200 μ M eines CDP-Cholin-Derivats inkubiert. Zu festgelegten Zeitpunkten nach dem Starten der Reaktion mit AnkX wurden Proben genommen und durch Zugabe von SDS-Probenpuffer denaturiert, sodass die Reaktion gestoppt wurde. Die Proben wurden im Anschluss auf ein 20%iges SDS-PA-Gel geladen und die Gelelektrophorese wurde wie in 6.2.2.1 beschrieben durchgeführt. Danach wurden die fluoreszenten Proteinbanden mit Hilfe eines Fluoreszenzscanners (Typhoon 9200 Variable Mode Imager, molecular dynamics, Amersham Pharmacia Biotech) sichtbar gemacht, wobei die Filter für Fluorescein (λ_{em} : 485, λ_{ex} : 515 nm) eingestellt waren. Im Anschluss erfolgte die Färbung des Gels mit Coomassie® Brilliant Blau wie in 6.2.2.1 dargestellt.

Die quantitative Auswertung der Gele erfolgte mit ImageJ (Schneider, Rasband et al. 2012). Hierbei wurde die Veränderung der elektrophoretischen Mobilität, die durch die Anbringung der fluoreszenten Phosphocholin-Derivate an ein Protein verursacht wurde, ausgenutzt. Die zeitabhängige Abnahme der Proteinbande, die dem unmodifizierten Protein entsprach und

die Zunahme derer, die dem markierten Protein zugeordnet werden konnte, konnten jeweils densitometrisch ausgewertet werden. Durch Auftragung der daraus resultierenden Werte gegen die Zeit, konnte ein Zeitverlauf ermittelt werden. Durch einfach exponentielle Anpassung der resultierenden Reaktionskurve nach Gleichung (1) mit Hilfe der Software OriginPro 8.6 (OriginLab Corporation) konnte eine Geschwindigkeitskonstante k_{obs} ermittelt werden.

6.2.2.4 Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS)

Die ESI-MS ist eine schonende Methode zur Bestimmung von Molekülmassen und wurde in dieser Arbeit hauptsächlich zur Massenbestimmung von Proteinen eingesetzt. Dafür wurde eine 50 μM Lösung des zu untersuchenden Proteins hergestellt, die zunächst über 10 μL -C4-ZipTip® Pipette Tips (Millipore) entsalzt werden musste. Dabei wurde das C4-Säulenmaterial der Pipettenspitze zuerst mit 50% Acetonitril (ACN)/0,1% Ameisensäure äquilibriert und anschließend zweimal mit 0,1%iger Ameisensäure gewaschen. Dann wurde das Protein auf das Säulenmaterial geladen, indem 10 μL der Proteinlösung fünf- bis zehnmal in die Spitze gezogen wurde. Das an der Säule gebundene Protein wurde dann zweimal mit 0,1%iger Ameisensäure gewaschen und schließlich mit 10 μL 50% ACN/0,1% Ameisensäure eluiert. Das entsalzte Protein wurde dann mit dem Massenspektrometer (LCQ Fleet) analysiert. Das erhaltene Spektrum wurde mit Hilfe des Programms Xcalibur® (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) und MagTran („The Magic Transformer“, Zhang und Marshall, 1998) dekonvolviert.

6.2.2.5 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Bestimmung von Proteinkonzentrationen erfolgte mit Hilfe des NanoDrop2000 (PeqLab/Thermo Scientific) unter Verwendung des Molekulargewichts und des molaren Extinktionskoeffizienten ϵ des jeweiligen Proteins. Diese beiden Größen wurden aus der Aminosäuresequenz mit Hilfe des Programms ExPASy Protparam (<http://web.expasy.org/protparam/>) errechnet.

6.2.2.6 Analytische Umkehrphasenhochleistungsflüssigkeitschromatographie

Die Umkehrphasenhochleistungsflüssigkeitschromatographie (*Reversed Phase*-(RP)-HPLC) ist eine Methode, mit der die Zusammensetzung eines Stoffgemisches analysiert werden kann. Hierbei wird die unterschiedliche Wechselwirkung verschiedener Moleküle mit der festen Phase ausgenutzt, die auf Grund dessen unterschiedliche Retentionszeiten aufweisen und getrennt voneinander eluiert und detektiert werden können. In der vorliegenden Arbeit wurde diese Methode verwendet, um phosphocholinierte von nicht phosphocholinierten Peptiden zu trennen.

Die Trennung von modifizierten und unmodifizierten Peptiden mittels HPLC erlaubte die Bestimmung der Kinetik der Phosphocholinierung (bzw. Dephosphocholinierung) von Peptiden. Für die Phosphocholinierungsreaktion wurden das Octapeptid TITSSYYR und verschiedene

Alanin-Mutanten hinsichtlich ihrer Phosphocholinierungseigenschaften untersucht. Über mehrere Stunden wurden dazu 200 μM Peptid mit 2 μM AnkX₁₋₈₀₀ und 5 mM CDP-Cholin inkubiert. Vor und zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Zugabe des Enzyms wurden Proben genommen und 1:1 mit 100% ACN/0,01% TFA verdünnt, um die Reaktion abzustoppen. Die Proben wurden anschließend mit einer C4-Säule (Aeris WIDEPOR, 3.6 μm , 250-4.60 mm, phenomenex) an einem Shimadzu HPLC System analysiert. Ein binärer Gradient von 100% Acetonitril mit 0.01% TFA (Lösungsmittel A) und ddH₂O mit 0.01% TFA (Lösungsmittel B) wurde als mobile Phase verwendet. Der zeitliche Verlauf des Acetonitril-Wasser-Gradienten ist in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Tabelle 23: ACN-Wasser-Gradient zur Trennung von Peptiden.

Zeit [min]	A [%]	B [%]
0	5	95
12	25	75
13	80	20
18	80	20
19	5	95
22	5	95

Die Elution der Peptide wurde über die UV-Absorption der Tyrosine bei einer Wellenlänge von 274 nm detektiert.

Bei der Untersuchung der Dephosphocholinierung von Peptiden durch Lem3 wurden 13 Aminosäuren lange Peptide verwendet (ERFRTITSS*YYRG und dessen Alanin-Mutanten), die an ihrem N-Terminus zusätzlich mit einer fluoreszenten Gruppe (Dansyl) ausgestattet waren. Außerdem trugen die Peptide an der neunten Position ein synthetisch phosphocholinisiertes Serin (Albers and Hedberg 2013). Die Peptide wurden in einer Konzentration von 50 μM mit 500 nM Lem3 inkubiert und wie bei der Phosphocholinierungsreaktion (s. oben) wurden zeitabhängig Proben genommen, welche im Anschluss mit dem folgenden Gradienten aus 100% ACN/0,01% TFA (Lösungsmittel A) und ddH₂O/0,01%TFA (Lösungsmittel B) aufgetrennt wurden.

Tabelle 24: ACN-Wasser-Gradient zur Trennung von dansylierten Peptiden.

Zeit [min]	A [%]	B [%]
0	5	95
17	40	60
18	80	20
23	80	20
25	5	95
27	5	95

Dabei wurde die gleiche Säule und HPLC-Anlage benutzt wie bei der Phosphocholinierung. Die Detektion von eluierten Peptiden erfolgte hier allerdings über die Fluoreszenz der Dan-

sylgruppe bei einer Anregungswellenlänge von 350 nm und einer Emissionswellenlänge von 530 nm mit Hilfe des RF-20A Fluoreszenzdetektors von Shimadzu.

In beiden Fällen erfolgte die Analyse der Elutionspeaks der Peptide mit der LabSolutions Software von Shimadzu. Um das Ausmaß der Phosphocholinierung zu berechnen wurden die Peakflächen bestimmt und ihr jeweiliger Anteil an der Gesamtpeakfläche errechnet. Die prozentuale Phosphocholinierung wurden gegen die Zeit aufgetragen und die erhaltenen Kurven an eine einfach exponentielle Gleichung (2) angepasst.

Gleichung (2)
$$P(t) = P_0 + P_A \times e^{-k_{obs}/t}$$

P(t): zeitabhängige Phosphocholinierung

P₀: minimale Phosphocholinierung

I_A: Amplitude der Phosphocholinierung (P_A = P_{max}-P₀, mit P_{max}: maximale Phosphocholinierung),

k_{obs}: beobachtete Geschwindigkeitskonstante.

Aus der den erhaltenen Geschwindigkeitskonstanten wurden k_{cat}/K_M-Werte berechnet, die wiederum relativ zum Wildtyppeptid TITSSYYR ausgedrückt wurden.

6.2.2.7 Analytische Größenausschlusschromatographie

Die analytische Größenausschlusschromatographie wird eingesetzt, um Komplexe zwischen Proteinen nachzuweisen. In dieser Arbeit sollte mit dieser Methode untersucht werden, ob AnkX und Rab1b bzw. Lem3 und PC-Rab1b, PC-Rab35 oder PC-Rab1b S76T einen stabilen Komplex miteinander eingehen. Dazu wurden die beiden potentiellen Interaktionspartner in einem molaren Verhältnis von 1:1,5 für 1-4 h bei RT inkubiert. Hierbei wurde eine Konzentration des Enzyms (AnkX bzw. Lem3) von 100 µM gewählt und das Proteinsubstrat (Rab1b bzw. PC-Rab1b) im 1,5fachen molaren Überschuss eingesetzt. Nach der Inkubationszeit wurden ca. 90 µL dieses Ansatzes mit Hilfe einer HPLC-Anlage auf einer Superdex 75 oder 200 10/300-Säule (GE), die zuvor mit Puffer (Rab1b-GeFi-Puffer, s. Tabelle 25) äquilibriert worden war, analysiert. Gleichermaßen wurden 100 mikromolare Proben der einzelnen Proteine untersucht, um nicht komplexierte Proteine von denen unterscheiden zu können, die einen Komplex bildeten. Die Flussrate betrug in allen Fällen 0,5 mL/min und die Messung wurde bei RT durchgeführt. Mit Hilfe eines UV-Detektors konnte die Elution der Proteine bzw. des Komplexes verfolgt werden.

6.2.3 Biochemische Methoden

6.2.3.1 Genexpression

Bei der Genexpression werden Zellen, die zuvor mit der entsprechenden Geninformation ausgestattet wurden (s. Transformation 6.2.1.6), zur Herstellung des codierten Proteins angeregt. Da die Gene so in die Expressionsvektoren kloniert sind, dass sie unter der Kontrolle

eines *lac*-Operons stehen, kann dies durch Zugabe des Induktors Isopropylthiogalactopyranosid (IPTG) erfolgen. Alle in dieser Arbeit verwendeten Proteine wurden in *E.coli* BL21 DE3 oder *E.coli* BL21 DE3 RIL produziert. Zu diesem Zweck wurden chemisch kompetente Zellen des jeweiligen Expressionsstamms mit dem Plasmid, das die Geninformation für das Zielprotein trägt, transformiert (s. 6.2.1.6) und üN auf Selektionsmedium inkubiert. Die gewachsenen Zellkolonien wurden daraufhin mit 5 mL LB-Medium von der Agar-Platte gewaschen, homogenisiert und in 2 oder 5 L LB-Medium, das mit dem entsprechenden Selektionsmarker versetzt wurde, überführt. Je 1,5 L dieses angeimpften Mediums wurden in 5 L-Erlenmeyerkolben gefüllt und bei 37°C und 180 rpm bis zu einer optischen Dichte (OD_{600}) von 0,5-0,8 inokuliert. Die OD_{600} wurde von 1 mL Zellkultur in einer Küvette (Sarstedt) bei einer Wellenlänge von 600 nm im Photometer (Novaspec II, Ultrospec 2100 pro, Pharmacia) gemessen. Bei Erreichen der gewünschten OD_{600} wurden die Kulturen für 30 min bei 4°C inkubiert und anschließend wurde die Genexpression mit 0,5 mM IPTG induziert. Die Expression wurde dann bei 20°C und 180 rpm üN durchgeführt. Danach wurden die Zellen durch Zentrifugation (Sigma 8K Zentrifuge, Sigma Laborzentrifugen) für 45 min bei 5100 rpm und 20°C geerntet. Der Überstand wurde abgeschüttet und das Pellet in ca. 10-50 mL Phosphat gepufferter Salzlösung (*phosphate buffered saline*, PBS) resuspendiert und gewaschen. Dann wurde die Zellsuspension wieder zentrifugiert (Zentrifuge 5810R, Eppendorf), der Überstand verworfen, das Pellet in Flüssigstickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

6.2.3.2 Proteinreinigung

Die Proteinreinigung dient der Isolierung der Zielproteine aus den Zellen, in denen sie hergestellt wurden. Dazu müssen die Zellen zunächst aufgeschlossen werden. Hierfür wurde das Zellpellet (s. 6.2.3.1) zunächst aufgetaut und in 5-10 mL Puffer A (s. Tabelle 25) mit Hilfe eines Zellhomogenisators (Silent Crusher M, Heidolph) resuspendiert. Die Zellen wurden dann mit einer French Press (Constant Cell disruption systems, Millipore) bei 2,0 kbar aufgeschlossen, woraufhin das Lysat mit dem Proteaseinhibitor Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF, 1 mM) versetzt wurde und für 45 min bei 20000 rpm und ca. 8°C zentrifugiert wurde (Zentrifuge: Beckmann Coulter Avanti J-26 XP), um lösliches Protein von den Zelltrümmern zu trennen. Dem geklärten Lysat wurde dann eine Spatelspitze DNase zugefügt, um die Viskosität aufgrund von DNA zu verringern. Darauf folgte die erste Affinitätschromatographische Reinigung.

6.2.3.3 Metallchelate-Affinitätschromatographie

Für die Metallchelate-Affinitätschromatographie wurde zunächst eine 5 mL HiTrap™-Säule (GE) mit $NiSO_4$ beladen, an eine FPLC (Äkta Prime, GE) angeschlossen, mit Puffer B gewaschen und schließlich in Puffer A äquilibriert. Mit einer Flussrate von 5 mL/min wurde dann das Lysat auf die Säule gepumpt, wobei der Durchfluss aufgefangen wurde. Dann wurde die

Säule mit Puffer A und anschließend mit 5% Puffer B gewaschen. Dann wurde ein Gradient aus Puffer A und B mit einer Länge von 100 mL und 100% Puffer B als Ziel gestartet und 5 mL-Fractionen wurden gesammelt. Proteine eluierten bei 15-25% Puffer B. Proteinenthaltende Fraktionen wurden im Anschluss mittels SDS-PAGE (s. 6.2.2.1) identifiziert, ihre Reinheit abgeschätzt und vereinigt. Die Proteine wurden schließlich einer Dialyse mit gleichzeitigem Protease-Verdau ausgesetzt.

Tabelle 25: Auflistung der für die Reinigung verschiedener Proteine und deren Varianten verwendeten Pufferlösungen.

Proteine	Puffer
Rab1b	<ul style="list-style-type: none"> - Puffer A: 50 mM Hepes pH 7,5, 500 mM LiCl, 2 mM MgCl₂, 2 mM β-Mercaptoethanol, 10 μM GDP - Puffer B: Puffer A + 500 mM Imidazol - Dialysepuffer: 20 mM Hepes pH 7,5, 100 mM LiCl, 2 mM β-Mercaptoethanol, 10 μM GDP - Gelfiltrationspuffer: 20 mM Hepes pH 7,5, 50 mM LiCl, 2 mM MgCl₂, 2 mM DTE, 10 μM GDP
AnkX-Konstrukte	<ul style="list-style-type: none"> - Puffer A: 50 mM Tris pH = pI ± 1, 500 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 5% Glycerol, 2 mM β-Mercaptoethanol - Puffer B: Puffer A + 500 mM Imidazol - Dialysepuffer: 20 mM Tris pH 8,0, 100 mM NaCl, 5% Glycerol, 2 mM β-Mercaptoethanol - Gelfiltrationspuffer: 20 mM Tris pH = pI ± 1, 50 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 5% Glycerol, 2 mM DTE
Lem3-Konstrukte	<ul style="list-style-type: none"> - Puffer A: 50 mM Tris pH 8,5, 500 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 5% Glycerol, 2 mM β-Mercaptoethanol - Puffer B: Puffer A + 500 mM Imidazol - Dialysepuffer: 20 mM Tris pH 8,0, 100 mM NaCl, 5% Glycerol, 2 mM β-Mercaptoethanol - Gelfiltrationspuffer: 20 mM Tris pH 8,5, 50 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 5% Glycerol, 2 mM DTE
SUMO-Konstrukte und MBP-Konstrukte	<ul style="list-style-type: none"> - Puffer A: 50 mM Hepes pH = pI ± 1, 500 mM NaCl - Puffer B: Puffer A + 500 mM Imidazol - Dialysepuffer: 20 mM Hepes pH = pI ± 1, 100 mM NaCl
DrrA-Konstrukte A-D	<ul style="list-style-type: none"> - Puffer A: 50 mM Hepes pH = pI ± 1, 500 mM LiCl, 2 mM β-Mercaptoethanol - Puffer B: Puffer A + 500 mM Imidazol - Dialyse- und Gelfiltrationspuffer: 20 mM Hepes pH = pI ± 1, 100 mM LiCl, 2 mM DTE
DrrA-TSSYY	<ul style="list-style-type: none"> - Puffer A: 50 mM Hepes pH = pI ± 1, 500 mM LiCl, 2 mM β-Mercaptoethanol, 5% Glycerol - Puffer B: Puffer A + 500 mM Imidazol - Dialyse- und Gelfiltrationspuffer: 20 mM Hepes pH = pI ± 1, 100 mM LiCl, 2 mM DTE, 5% Glycerol

6.2.3.4 Dialyse und TEV-Verdau

Die Proteine wurden in einem Dialyseschlauch (10-12 MWCO, Serva) üN bei 4°C gegen 5 L Dialyse-Puffer dialysiert, um das Imidazol aus der Affinitätschromatographie aus der Lösung zu entfernen. Gleichzeitig wurde der Proteinlösung die Tobacco Etch Virus (TEV) Protease zugesetzt, die den Hexahistidinanker am N-Terminus des Proteins abspaltete. Dies war möglich, da die Proteine zwischen Hexahistidinanker und Proteinsequenz rekombinant mit einer TEV-Erkennungssequenz ausgestattet waren. Zur Trennung des abgespaltenen Hexahistidins und der TEV-Protease vom Protein wurde eine weitere Metallchelataffinitätschromatographie durchgeführt. Hierbei wurde die Proteinlösung wieder mit einer Fließgeschwindigkeit von 5 mL/min auf die 5 mL HiTrap™-Säule geladen, wobei das Protein im Durchfluss aufgefangen wurde und die TEV-Protease aufgrund ihres Hexahistidinankers zusammen mit dem abgespaltenen His₆-Tag an der Säule immobilisiert wurde. Darauf folgte ein Waschschrift mit 5% Puffer B und eine Schlagelution des Hexahistidinankers und der Protease mit 100% Puffer B. Der Durchfluss sowie die Wasch- und Elutionsfraktion wurden mittels SDS-PAGE (s. 6.2.2.1) auf Proteininhalt und -reinheit untersucht. Die Durchflussfraktion wurde im Anschluss einkonzentriert und bei Bedarf mittels Größenausschlusschromatographie (s. 6.2.3.6) weiter gereinigt.

6.2.3.5 Konzentration von Proteinen

Für bestimmte Analysenmethoden von Proteinen ist es notwendig, dass die Proteinlösungen hoch konzentriert sind. Daher wurden die in dieser Arbeit hergestellten Proteine während und nach der Reinigung einkonzentriert. Dies geschah entweder mit Amicon Rührzellen (Millipore), wenn das Ausgangsvolumen größer als 20 mL war oder mit Amicon Ultra-15 Zentrifugen Einheiten in der Eppendorf Zentrifuge 5810 R wenn es kleiner als 20 mL war. Bei sehr kleinen Volumina unter 1 mL wurden die Proteine mit Corning Spin-X UF-Konzentratoren in der Eppendorf Tischzentrifuge 5424 R einkonzentriert. Das Einkonzentrieren der Proteine fand in jedem Fall bei 4°C statt.

6.2.3.6 Präparative Größenausschlusschromatographie

Die präparative Größenausschlusschromatographie dient der Trennung des Zielproteins von Proteinverunreinigungen. In dieser Arbeit wurde diese Methode angewendet, wenn das Zielprotein nach der Affinitätschromatographie noch mit anderen Proteinen verunreinigt war. Aber auch bei der präparativen Phosphocholinierung (s. 6.2.3.7) wurde sie eingesetzt, um das Enzym (AnkX) und das überschüssige Cosubstrat (CDP-Cholin oder Derivate davon) zu entfernen. Die Proteinlösung wurde für die Größenausschlusschromatographie zunächst auf ein Volumen von 1-3 mL einkonzentriert und Präzipitat durch 1-minütige Zentrifugation bei 13000 rpm und 4°C abgetrennt. Die Säule (Superdex 16/600 75 µg, GE) wurde an eine FPLC-Anlage (Äkta Prime, GE) angeschlossen und mit 120 mL Gelfiltrationspuffer (s. Tabel-

le 25) äquilibriert, woraufhin das Protein über eine Ladeschleife auf die Säule geladen wurde. Dann wurden 120 mL Puffer mit einer Flussrate von 1,5 mL/min durch die Säule gepumpt. Eluate wurden in Fraktionen von 2 mL gesammelt und schließlich mittels SDS-PAGE (6.2.2.1) auf Proteininhalt und -reinheit untersucht. Proteinenthaltende Fraktionen wurden vereinigt und einkonzentriert.

6.2.3.7 Präparative Phosphocholinierung

Die präparative Phosphocholinierung hat die vollständige Modifizierung von Proteinen mit Phosphocholin zum Ziel. Dafür wurden 2-5 mg des Zielproteins (z.B. Rab1b) mit 100fachem molarem Überschuss AnkX₁₋₈₀₀ und mindestens 10fachem molarem Überschuss CDP-Cholin versetzt und üN bei RT inkubiert. Die Modifizierung wurde dann mittels ESI-MS (s. 6.2.2.4) auf Vollständigkeit überprüft. Anschließend wurde das modifizierte Protein über Größenausschlusschromatographie (6.2.3.6) von AnkX und überschüssigem CDP-Cholin getrennt und dann einkonzentriert.

6.2.4 Biophysikalische Methoden

6.2.4.1 Fluoreszenzspektrometrie

Die kinetische Untersuchung der enzymatischen Aktivitäten von AnkX und Lem3 gegenüber Rab1b bzw. PC-Rab1b wurden mittels intrinsischer Tryptophan-Fluoreszenz des Rab-Proteins gemessen. Diese Methode beruht darauf, dass sich die Fluoreszenzintensität der beiden Tryptophane W62 und W102 von Rab1b durch Anbringung bzw. Abspaltung von Phosphocholin (katalysiert durch AnkX bzw. Lem3) aufgrund von dadurch beeinflussten intramolekularen Wechselwirkungen ändert. Die Phosphocholinierung durch AnkX führt dabei zu einer Erhöhung der Trp-Fluoreszenz-Intensität, wohingegen die hydrolytische Abspaltung der Modifikation durch Lem3 ein Absinken der Intensität zur Folge hat (s. Goody, 2012 #6).

Für die Fluoreszenz-Messungen wurde das Fluoreszenz-Spektrometer Fluoromax-3 bzw. -4 (Horiba Jobin Yvon) verwendet, wobei die folgenden Parameter eingestellt wurden: λ_{ex} : 297 nm, λ_{em} : 340 nm, Weite des Anregungsschlitz: 1 nm, Weite des Emissionsschlitz: 5 nm, Temperatur: 25°C). Die Messungen wurden in Puffer mit 20 mM Hepes pH 7,5, 50 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 10 μ M GDP und 1 mM DTE durchgeführt. Bei den Messungen der Aktivitäten der verschiedenen AnkX-Verkürzungsstrukturen wurde 10 μ M Rab1b₃₋₁₇₄ in der mit 1 mL Puffer gefüllten Quartzküvette (Hellma) vorgelegt und dann 1 mM CDP-Cholin zugefügt. Sobald sich die Messkurve stabilisiert hatte, wurde mit 100 nM AnkX die Phosphocholinierungsreaktion gestartet und für ca. 1000 s verfolgt. Nachdem die Reaktion ihr Gleichgewicht erreicht hatte, wurde die gleiche Menge AnkX nochmals zugegeben, um den Verdünnungseffekt bzw. den Effekt der Tryptophane von AnkX auf das Fluoreszenzsignal abschätzen zu können. Für Messungen, bei denen beide Nukleotid-Beladungszustände von Rab1b bezüglich der Phosphocholinierung analysiert werden sollten, wurde der gleiche Puffer ohne

GDP gewählt. Außerdem wurde nach der Zugabe von Rab1b in die Küvette zunächst *in situ* ein Nukleotidaustausch durch Zugabe von 100 μM GDP bzw. GTP und anschließender Addition von 200 nM DrrA₃₄₀₋₅₃₃ (DrrA-GEF-Domäne) durchgeführt und erst nach dessen Gleichgewichtseinstellung die Phosphocholinierung mit CDP-Cholin und AnkX gestartet.

Bei der Phosphocholin-Hydrolyse wurde der gleiche Puffer wie bei der Phosphocholinierung eingesetzt. 10 μM präparativ phosphocholinisiertes Rab1b₃₋₁₇₄ (s. 6.2.3.7) wurde in der Küvette vorgelegt und durch Zugabe von 500 nM Lem3 wurde die Reaktion gestartet. Sobald sich ein konstantes Reaktionsgleichgewicht eingestellt hatte, wurde die gleiche Menge Lem3 nochmals zugegeben, um den Verdünnungseffekt und die durch endogene Tryptophane verursachte Fluoreszenzänderung von der reaktionsbedingten Änderung unterscheiden zu können.

6.2.4.2 Bestimmung katalytischer Effizienzen

Zur Bestimmung der katalytischen Effizienzen ($k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$) der durch Fluoreszenzspektrometrie gemessenen Reaktionen, wurden die erhaltenen Messkurven einfach exponentiell nach Gleichung (3) mit Hilfe der Software OriginPro 8.6 (OriginLab Corporation) angepasst.

Gleichung (3)
$$F(t) = F_0 + F_A \times e^{-k_{\text{obs}}/t}$$

$F(t)$: zeitabhängige Fluoreszenzintensität,

F_0 : minimale Fluoreszenzintensität,

F_A : totale Fluoreszenzamplitude ($F_A = F_{\text{max}} - F_0$, mit F_{max} : maximale Fluoreszenzintensität),

k_{obs} : beobachtete Geschwindigkeitskonstante.

Die so erhaltene Geschwindigkeitskonstante k_{obs} wurde dann durch die eingesetzte Enzymkonzentration geteilt, um $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ zu bestimmen.

6.2.4.3 GEF-Assay

Der GEF-Assay wurde zur Bestimmung der Nukleotidaustauschaktivitäten verschiedener DrrA-Konstrukte gegenüber Rab1b eingesetzt. Dabei wird die Änderung der Fluoreszenzintensität intrinsischer Tryptophane des Rab-Proteins, ausgelöst durch den Austausch von GDP zu GTP, ausgenutzt. Die Messungen wurden an einem Fluoreszenzspektrometer (Fluoromax-4, Horiba Jobin Yvon) durchgeführt, wobei die folgenden Parameter eingestellt wurden: λ_{ex} : 297 nm, λ_{em} : 340 nm, Weite des Anregungsschlitz: 3 nm, Weite des Emissionsschlitz: 5 nm, Temperatur: 25°C). Die Messungen wurden in filtriertem und entgastem Puffer (20 mM Hepes pH 7,5, 50 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 10 μM GDP und 1 mM DTE) in einer Quartzküvette (Hellma) durchgeführt. Nach der Zugabe von 1 μM Rab1b₃₋₁₇₄ und 1 mM GTP wurde die Reaktion durch Zufügen der jeweiligen DrrA-Variante (50 nM DrrA wt, 400 nM DrrA-Mutanten) gestartet. Die erhaltenen Reaktionskurven wurden einfach exponentiell nach Gleichung 3 angepasst.

6.2.5 Zellbiologische Methoden

Die im Folgenden beschriebenen Experimente wurden an einer Sterilbank (HERAsafe, Heraeus) mit sterilen Materialien, Medien und Reagenzien durchgeführt.

6.2.5.1 Passagieren von eukaryotischen Zellkulturen

Das Passagieren von Zellkulturen dient der Verringerung der Zelldichte und der Bereitstellung frischen Nährmediums, sodass die Zellen vital bleiben. Die in dieser Arbeit verwendeten HEK293T-Zellen sind semi-adhären und können durch leichtes Schütteln der Kulturflasche abgelöst werden. Zum Passagieren wurde das Nährmedium (DMEM mit 10% FBS) aus der Zellkulturflasche abgeschüttet und 1 mL DPBS auf der nicht bewachsenen Seite in die Flasche gefüllt. Mit DPBS wurde der Zellrasen dann vorsichtig gewaschen. Anschließend wurde das DPBS gegen 0,5 μ L frisches DPBS ausgetauscht, mit welchem die Zellen durch leichtes Klopfen gegen die Gefäßwand abgelöst wurden. Die Zellen wurden anschließend in 4,5 mL DMEM/10% FBS aufgenommen, wovon 0,5 mL in einer neuen Kulturflasche mit 4,5 mL DMEM/10% FBS ausgesät wurden. Die Zellkultur wurde dann für 2-3 Tage bei 5% CO₂ und 37°C inkubiert.

6.2.5.2 Transiente Transfektion eukaryotischer Zellen

Bei der transienten Transfektion von Zellen handelt es sich um eine Methode, mit der eukaryotische Zellen zeitweise mit dem Gen für ein bestimmtes Protein ausgestattet werden können.

In dieser Arbeit wurden HEK293T-Zellen mit dem Transfektionsreagenz Torpedo^{DNA} (ibidi) transfiziert. Dazu wurden 40 μ L Optimem-Medium mit 2 μ L Torpedo^{DNA} in einem Reaktionsgefäß gemischt und 40 μ L Optimem-Medium mit ca. 0,5 μ g Plasmid-DNA (pVito2_hY2R-mCherry-Konstrukte) in einem zweiten Reaktionsgefäß, woraufhin beide Mischungen vereint und für 15-20 min bei RT inkubiert wurden. Anschließend wurde der Transfektionsansatz zu einer HEK293T-Kultur mit einem Volumen von 500 μ L im MTP- oder chamber slide-Well tropfenweise hinzugefügt. Die Zellen wurden im Anschluss für ca. 24 h bei 5% CO₂ und 37°C inkubiert.

6.2.5.3 Markierung eukaryotischer Zellen mit PC-Fluorescein

Die Markierung der Zellmembran von HEK293T Zellen mit Phosphocholin bzw. mit Phosphocholin-N-PEG₄-N'-Fluorescein wurde 24 h nach der Transfektion entweder im 24-Well MTP Format oder im 4-chamber slide durchgeführt. Dazu wurde der Überstand der Zellkultur mit 5% BSA in DMEM ausgetauscht und für 5 min bei 5% CO₂ und 37°C inkubiert. Dann wurde der Zellüberstand abgenommen und 1% BSA in DMEM auf die Zellen gegeben. Dazu wurden 2 μ M AnkX₁₋₈₀₀ und 1 mM CDP-Cholin oder 100 μ M CDP-Cholin-N-PEG₄-N'-Fluorescein zugefügt und für 3 h inkubiert. Für die Kontrollen wurden Zellen ohne Zusatz von Enzym und Nukleotid bzw. nur mit dem jeweiligen Nukleotid inkubiert. Im Anschluss wurde

der Zellüberstand abgenommen und die Zellen dreimal mit 0,5-1 mL DPBS vorsichtig gewaschen. Zuletzt wurde Indikator-freies DMEM zu den Zellen pipettiert.

6.2.5.4 Fluoreszenzmikroskopie

Die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Fluoreszenzmarkierung der HEK293T-Zellmembran wurde mit lebenden Zellen durchgeführt, die in Indikator-freiem DMEM in einem Chamber slide (ibidi) kultiviert wurden und zuvor wie in 6.2.5.2 beschrieben mit verschiedenen HA-hY₂R-Varianten transfiziert und wie in 6.2.5.3 beschrieben einer AnkX-abhängigen Markierungsreaktion mit CDP-Cholin-N-PEG₄-N'-Fluorescein unterzogen worden sind. Es wurde das Fluoreszenzmikroskop DMi8 von Leica mit einem 63fachen Vergrößerungsobjektiv und Fluoreszenzfilterkuben für TexasRed (entspricht mCherry) und GFP (entspricht Fluorescein) sowie der Differential Interference Contrast (DIC) Modus verwendet. Die Darstellung der fluoreszierenden Zellen wurde mit Hilfe der LAS-Software (Leica) realisiert.

6.2.5.5 Lyse eukaryotischer Zellen

Die Lyse von eukaryotischen Zellen diente in dieser Arbeit der Untersuchung des Transfektionsproduktes TITSSYYR-HA-hY₂R-mCherry (bzw. dessen Varianten) und dessen Modifizierung mit Phosphocholin mittels Western Blotting. Hierfür wurden die Zellen (HEK293T) mit Hilfe von 1 mL DPBS aus der Mikrotiterplattenkavität oder dem Chamber slide abgelöst und resuspendiert. Dann wurde die Zellsuspension für 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert, um die Zellen zu pelletieren. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet in 50 µL RIPA-Lysepuffer (Thermo Scientific) resuspendiert, für 20 min bei RT inkubiert und schließlich für 30 s Ultraschallpulsen ausgesetzt. Dann wurden 50 µL SDS-Probenpuffer hinzugefügt und die Probe für 10 min bei 95°C inkubiert. Die Probe konnte dann mittels SDS-PAGE (6.2.2.1) und anschließendem Western Blot (6.2.2.2) unter Verwendung des Anti-HA- oder des Anti-PC-Antikörpers auf Anwesenheit des HA-markierten hY₂-Rezeptors oder dessen Phosphocholinierung getestet werden.

7. Literaturverzeichnis

Adams, S. R., R. E. Campbell, L. A. Gross, B. R. Martin, G. K. Walkup, Y. Yao, J. Llopis and R. Y. Tsien (2002). "New biarsenical ligands and tetracysteine motifs for protein labeling in vitro and in vivo: synthesis and biological applications." J Am Chem Soc **124**(21): 6063-6076.

Agard, N. J., J. A. Prescher and C. R. Bertozzi (2004). "A strain-promoted [3 + 2] azide-alkyne cycloaddition for covalent modification of biomolecules in living systems." J Am Chem Soc **126**(46): 15046-15047.

Al-Khodor, S., C. T. Price, A. Kalia and Y. Abu Kwaik (2010). "Functional diversity of ankyrin repeats in microbial proteins." Trends Microbiol **18**(3): 132-139.

Albers, M. F. and C. Hedberg (2013). "Amino acid building blocks for Fmoc solid-phase synthesis of peptides phosphocholinated at serine, threonine, and tyrosine." J Org Chem **78**(6): 2715-2719.

Algar, W. R., D. E. Prasuhn, M. H. Stewart, T. L. Jennings, J. B. Blanco-Canosa, P. E. Dawson and I. L. Medintz (2011). "The controlled display of biomolecules on nanoparticles: a challenge suited to bioorthogonal chemistry." Bioconjug Chem **22**(5): 825-858.

Anthony-Cahill, S. J., M. C. Griffith, C. J. Noren, D. J. Suich and P. G. Schultz (1989). "Site-specific mutagenesis with unnatural amino acids." Trends Biochem Sci **14**(10): 400-403.

Baccanari, D., A. Phillips, S. Smith, D. Sinski and J. Burchall (1975). "Purification and properties of Escherichia coli dihydrofolate reductase." Biochemistry **14**(24): 5267-5273.

Baneyx, F. (1999). "Recombinant protein expression in Escherichia coli." Curr Opin Biotechnol **10**(5): 411-421.

Baskin, J. M., J. A. Prescher, S. T. Laughlin, N. J. Agard, P. V. Chang, I. A. Miller, A. Lo, J. A. Codelli and C. R. Bertozzi (2007). "Copper-free click chemistry for dynamic in vivo imaging." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(43): 16793-16797.

Beckett, D., E. Kovaleva and P. J. Schatz (1999). "A minimal peptide substrate in biotin holoenzyme synthetase-catalyzed biotinylation." Protein Sci **8**(4): 921-929.

Bhunia, A. K. and S. C. Miller (2007). "Labeling tetracysteine-tagged proteins with a SplAsH of color: a modular approach to bis-arsenical fluorophores." ChemBiochem **8**(14): 1642-1645.

Blackman, M. L., M. Royzen and J. M. Fox (2008). "Tetrazine ligation: fast bioconjugation based on inverse-electron-demand Diels-Alder reactivity." J Am Chem Soc **130**(41): 13518-13519.

Burstein, D., T. Zusman, E. Degtyar, R. Viner, G. Segal and T. Pupko (2009). "Genome-scale identification of Legionella pneumophila effectors using a machine learning approach." PLoS Pathog **5**(7): e1000508.

Calloway, N. T., M. Choob, A. Sanz, M. P. Sheetz, L. W. Miller and V. W. Cornish (2007). "Optimized fluorescent trimethoprim derivatives for in vivo protein labeling." ChemBiochem **8**(7): 767-774.

Campanacci, V., S. Mukherjee, C. R. Roy and J. Cherfils (2013). "Structure of the Legionella effector AnkX reveals the mechanism of phosphocholine transfer by the FIC domain." EMBO J **32**(10): 1469-1477.

Carrico, I. S. (2008). "Chemoselective modification of proteins: hitting the target." Chem Soc Rev **37**(7): 1423-1431.

Chalfie, M., Y. Tu, G. Euskirchen, W. W. Ward and D. C. Prasher (1994). "Green fluorescent protein as a marker for gene expression." Science **263**(5148): 802-805.

Chan, L., H. F. Cross, J. K. She, G. Cavalli, H. F. Martins and C. Neylon (2007). "Covalent attachment of proteins to solid supports and surfaces via Sortase-mediated ligation." PLoS One **2**(11): e1164.

Chen, I., M. Howarth, W. Lin and A. Y. Ting (2005). "Site-specific labeling of cell surface proteins with biophysical probes using biotin ligase." Nat Methods **2**(2): 99-104.

Chen, W., D. Wang, C. Dai, D. Hamelberg and B. Wang (2012). "Clicking 1,2,4,5-tetrazine and cyclooctynes with tunable reaction rates." Chem Commun (Camb) **48**(12): 1736-1738.

Chen, Z., C. Jing, S. S. Gallagher, M. P. Sheetz and V. W. Cornish (2012). "Second-generation covalent TMP-tag for live cell imaging." J Am Chem Soc **134**(33): 13692-13699.

Cheng, W., K. Yin, D. Lu, B. Li, D. Zhu, Y. Chen, H. Zhang, S. Xu, J. Chai and L. Gu (2012). "Structural insights into a unique Legionella pneumophila effector LidA recognizing both GDP and GTP bound Rab1 in their active state." PLoS Pathog **8**(3): e1002528.

Chien, M., I. Morozova, S. Shi, H. Sheng, J. Chen, S. M. Gomez, G. Asamani, K. Hill, J. Nuara, M. Feder, J. Rineer, J. J. Greenberg, V. Steshenko, S. H. Park, B. Zhao, E. Teplitskaya, J. R. Edwards, S. Pampou, A. Georgiou, I. C. Chou, W. Iannuccilli, M. E. Ulz, D. H. Kim, A. Geringer-Sameth, C. Goldsberry, P. Morozov, S. G. Fischer, G. Segal, X. Qu, A. Rzhetsky, P. Zhang, E. Cayanis, P. J. De Jong, J. Ju, S. Kalachikov, H. A. Shuman and J. J. Russo (2004). "The genomic sequence of the accidental pathogen Legionella pneumophila." Science **305**(5692): 1966-1968.

Chin, J. W., T. A. Cropp, S. Chu, E. Meggers and P. G. Schultz (2003). "Progress toward an expanded eukaryotic genetic code." Chem Biol **10**(6): 511-519.

Clancy, K. W., J. A. Melvin and D. G. McCafferty (2010). "Sortase transpeptidases: insights into mechanism, substrate specificity, and inhibition." Biopolymers **94**(4): 385-396.

Clark, P. M., J. F. Dweck, D. E. Mason, C. R. Hart, S. B. Buck, E. C. Peters, B. J. Agnew and L. C. Hsieh-Wilson (2008). "Direct in-gel fluorescence detection and cellular imaging of O-GlcNAc-modified proteins." J Am Chem Soc **130**(35): 11576-11577.

Clarke, K. M., A. C. Mercer, J. J. La Clair and M. D. Burkart (2005). "In vivo reporter labeling of proteins via metabolic delivery of coenzyme A analogues." J Am Chem Soc **127**(32): 11234-11235.

Codelli, J. A., J. M. Baskin, N. J. Agard and C. R. Bertozzi (2008). "Second-generation difluorinated cyclooctynes for copper-free click chemistry." J Am Chem Soc **130**(34): 11486-11493.

Cropp, T. A. and P. G. Schultz (2004). "An expanding genetic code." Trends Genet **20**(12): 625-630.

- Crowe, J., H. Dobeli, R. Gentz, E. Hochuli, D. Stuber and K. Henco (1994). "6xHis-Ni-NTA chromatography as a superior technique in recombinant protein expression/purification." Methods Mol Biol **31**: 371-387.
- Cubitt, A. B., R. Heim, S. R. Adams, A. E. Boyd, L. A. Gross and R. Y. Tsien (1995). "Understanding, improving and using green fluorescent proteins." Trends Biochem Sci **20**(11): 448-455.
- Damoiseaux, R., A. Keppler and K. Johnsson (2001). "Synthesis and applications of chemical probes for human O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase." Chembiochem **2**(4): 285-287.
- Damoiseaux, R., P. G. Schultz and K. Johnsson (2002). "Towards the generation of artificial O6-alkylguanine-DNA alkyltransferases: in vitro selection of antibodies with reactive cysteine residues." Chembiochem **3**(6): 573-575.
- Daniels, D. S., C. D. Mol, A. S. Arvai, S. Kanugula, A. E. Pegg and J. A. Tainer (2000). "Active and alkylated human AGT structures: a novel zinc site, inhibitor and extrahelical base binding." EMBO J **19**(7): 1719-1730.
- de Graaf, A. J., M. Kooijman, W. E. Hennink and E. Mastrobattista (2009). "Nonnatural amino acids for site-specific protein conjugation." Bioconjug Chem **20**(7): 1281-1295.
- Derre, I. and R. R. Isberg (2004). "Legionella pneumophila replication vacuole formation involves rapid recruitment of proteins of the early secretory system." Infect Immun **72**(5): 3048-3053.
- Devaraj, N. K., R. Weissleder and S. A. Hilderbrand (2008). "Tetrazine-based cycloadditions: application to pretargeted live cell imaging." Bioconjug Chem **19**(12): 2297-2299.
- Diels, O., Alder, K and Liebig, J. (1928). "Synthesen in der hydroaromatischen Reihe." Justus Liebig's Annalen der Chemie **460**:98-122.
- di Guan, C., P. Li, P. D. Riggs and H. Inouye (1988). "Vectors that facilitate the expression and purification of foreign peptides in Escherichia coli by fusion to maltose-binding protein." Gene **67**(1): 21-30.
- Duckworth, B. P., Z. Zhang, A. Hosokawa and M. D. Distefano (2007). "Selective labeling of proteins by using protein farnesyltransferase." Chembiochem **8**(1): 98-105.
- Dursina, B. E., R. Reents, A. Niculae, A. Veligodsky, R. Breitling, K. Pyatkov, H. Waldmann, R. S. Goody and K. Alexandrov (2005). "A genetically encodable microtag for chemoenzymatic derivatization and purification of recombinant proteins." Protein Expr Purif **39**(1): 71-81.
- Esposito, D. and D. K. Chatterjee (2006). "Enhancement of soluble protein expression through the use of fusion tags." Curr Opin Biotechnol **17**(4): 353-358.
- Fagone, P. and S. Jackowski (2013). "Phosphatidylcholine and the CDP-choline cycle." Biochim Biophys Acta **1831**(3): 523-532.
- Fouda, A. E. and M. K. Pflum (2015). "A Cell-Permeable ATP Analogue for Kinase-Catalyzed Biotinylation." Angew Chem Int Ed Engl **54**(33): 9618-9621.
- Fringuelli, F., M. Matteucci, O. Piermatti, F. Pizzo and M. C. Burla (2001). "[4 + 2] cycloadditions of nitroalkenes in water. Highly asymmetric synthesis of functionalized nitronates." J Org Chem **66**(13): 4661-4666.

Gaietta, G. M., T. J. Deerinck and M. H. Ellisman (2011). "Labeling tetracysteine-tagged proteins with biarsenical dyes for live cell imaging." Cold Spring Harb Protoc **2011**(1): pdb prot5547.

Gallagher, S. S., J. E. Sable, M. P. Sheetz and V. W. Cornish (2009). "An in vivo covalent TMP-tag based on proximity-induced reactivity." ACS Chem Biol **4**(7): 547-556.

Gamblin, D. P., E. M. Scanlan and B. G. Davis (2009). "Glycoprotein synthesis: an update." Chem Rev **109**(1): 131-163.

Garcia-Pino, A., N. Zenkin and R. Loris (2014). "The many faces of Fic: structural and functional aspects of Fic enzymes." Trends Biochem Sci **39**(3): 121-129.

Gautier, A., A. Juillerat, C. Heinis, I. R. Correa, Jr., M. Kindermann, F. Beauflis and K. Johnsson (2008). "An engineered protein tag for multiprotein labeling in living cells." Chem Biol **15**(2): 128-136.

Gautier, A., E. Nakata, G. Lukinavicius, K. T. Tan and K. Johnsson (2009). "Selective cross-linking of interacting proteins using self-labeling tags." J Am Chem Soc **131**(49): 17954-17962.

Ge, J. and F. Shao (2011). "Manipulation of host vesicular trafficking and innate immune defence by Legionella Dot/Icm effectors." Cell Microbiol **13**(12): 1870-1880.

Geoghegan, K. F. and J. G. Stroh (1992). "Site-directed conjugation of nonpeptide groups to peptides and proteins via periodate oxidation of a 2-amino alcohol. Application to modification at N-terminal serine." Bioconjug Chem **3**(2): 138-146.

George, N., H. Pick, H. Vogel, N. Johnsson and K. Johnsson (2004). "Specific labeling of cell surface proteins with chemically diverse compounds." J Am Chem Soc **126**(29): 8896-8897.

Goody, P. R., K. Heller, L. K. Oesterlin, M. P. Muller, A. Itzen and R. S. Goody (2012). "Reversible phosphocholination of Rab proteins by Legionella pneumophila effector proteins." EMBO J **31**(7): 1774-1784.

Goody, R. S., A. Rak and K. Alexandrov (2005). "The structural and mechanistic basis for recycling of Rab proteins between membrane compartments." Cell Mol Life Sci **62**(15): 1657-1670.

Griesbeck, O., G. S. Baird, R. E. Campbell, D. A. Zacharias and R. Y. Tsien (2001). "Reducing the environmental sensitivity of yellow fluorescent protein. Mechanism and applications." J Biol Chem **276**(31): 29188-29194.

Griffin, B. A., S. R. Adams and R. Y. Tsien (1998). "Specific covalent labeling of recombinant protein molecules inside live cells." Science **281**(5374): 269-272.

Gronemeyer, T., C. Chidley, A. Juillerat, C. Heinis and K. Johnsson (2006). "Directed evolution of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase for applications in protein labeling." Protein Eng Des Sel **19**(7): 309-316.

Gronemeyer, T., G. Godin and K. Johnsson (2005). "Adding value to fusion proteins through covalent labelling." Curr Opin Biotechnol **16**(4): 453-458.

Hackenberger, C. P. and D. Schwarzer (2008). "Chemoselective ligation and modification strategies for peptides and proteins." Angew Chem Int Ed Engl **47**(52): 10030-10074.

- Hardiman, C. A. and C. R. Roy (2014). "AMPylation is critical for Rab1 localization to vacuoles containing Legionella pneumophila." MBio **5**(1): e01035-01013.
- Heidtman, M., E. J. Chen, M. Y. Moy and R. R. Isberg (2009). "Large-scale identification of Legionella pneumophila Dot/Icm substrates that modulate host cell vesicle trafficking pathways." Cell Microbiol **11**(2): 230-248.
- Heim, R., A. B. Cubitt and R. Y. Tsien (1995). "Improved green fluorescence." Nature **373**(6516): 663-664.
- Heinis, C., S. Schmitt, M. Kindermann, G. Godin and K. Johnsson (2006). "Evolving the substrate specificity of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase through loop insertion for applications in molecular imaging." ACS Chem Biol **1**(9): 575-584.
- Heller, K., P. Ochtrop, M. F. Albers, F. B. Zauner, A. Itzen and C. Hedberg (2015). "Covalent Protein Labeling by Enzymatic Phosphocholination." Angew Chem Int Ed Engl **54**(35): 10327-10330.
- Hill, K. W., J. Taunton-Rigby, J. D. Carter, E. Kropp, K. Vagle, W. Pieken, D. P. McGee, G. M. Husar, M. Leuck, D. J. Anziano and D. P. Sebesta (2001). "Diels-Alder bioconjugation of diene-modified oligonucleotides." J Org Chem **66**(16): 5352-5358.
- Hinner, M. J. and K. Johnsson (2010). "How to obtain labeled proteins and what to do with them." Curr Opin Biotechnol **21**(6): 766-776.
- Hoffmann, C., G. Gaietta, A. Zurn, S. R. Adams, S. Terrillon, M. H. Ellisman, R. Y. Tsien and M. J. Lohse (2010). "Fluorescent labeling of tetracysteine-tagged proteins in intact cells." Nat Protoc **5**(10): 1666-1677.
- Horwitz, M. A. (1983). "The Legionnaires' disease bacterium (Legionella pneumophila) inhibits phagosome-lysosome fusion in human monocytes." J Exp Med **158**(6): 2108-2126.
- Houseman, B. T., J. H. Huh, S. J. Kron and M. Mrksich (2002). "Peptide chips for the quantitative evaluation of protein kinase activity." Nat Biotechnol **20**(3): 270-274.
- Howarth, M., K. Takao, Y. Hayashi and A. Y. Ting (2005). "Targeting quantum dots to surface proteins in living cells with biotin ligase." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(21): 7583-7588.
- Huang, C. J., H. Lin and X. Yang (2012). "Industrial production of recombinant therapeutics in Escherichia coli and its recent advancements." J Ind Microbiol Biotechnol **39**(3): 383-399.
- Huisgen, R., Szeimies, G. and Möbius, L. (1967). "Kinetik der Additionen organischer Azide an CC-Mehrfachbindungen." Chem. Ber. **100**:2494-2507.
- Husar, G. M., D. J. Anziano, M. Leuck and D. P. Sebesta (2001). "Covalent modification and surface immobilization of nucleic acids via the Diels-Alder bioconjugation method." Nucleos Nucleot Nucl **20**(4-7): 559-566.
- Hutagalung, A. H. and P. J. Novick (2011). "Role of Rab GTPases in membrane traffic and cell physiology." Physiol Rev **91**(1): 119-149.
- Ingmundson, A., A. Delprato, D. G. Lambright and C. R. Roy (2007). "Legionella pneumophila proteins that regulate Rab1 membrane cycling." Nature **450**(7168): 365-369.
- Janssen, D. B. (2004). "Evolving haloalkane dehalogenases." Curr Opin Chem Biol **8**(2): 150-159.

Jing, C. and V. W. Cornish (2011). "Chemical tags for labeling proteins inside living cells." Acc Chem Res **44**(9): 784-792.

Jing, C. and V. W. Cornish (2013). "Design, synthesis, and application of the trimethoprim-based chemical tag for live-cell imaging." Curr Protoc Chem Biol **5**(2): 131-155.

Johansson, M., M. Lehto, K. Tanhuanpaa, T. L. Cover and V. M. Olkkonen (2005). "The oxysterol-binding protein homologue ORP1L interacts with Rab7 and alters functional properties of late endocytic compartments." Mol Biol Cell **16**(12): 5480-5492.

Johnsson, N. and K. Johnsson (2003). "A fusion of disciplines: chemical approaches to exploit fusion proteins for functional genomics." Chembiochem **4**(9): 803-810.

Juillerat, A., T. Gronemeyer, A. Keppler, S. Gendreizig, H. Pick, H. Vogel and K. Johnsson (2003). "Directed evolution of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase for efficient labeling of fusion proteins with small molecules in vivo." Chem Biol **10**(4): 313-317.

Kagan, J. C., M. P. Stein, M. Pypaert and C. R. Roy (2004). "Legionella subvert the functions of Rab1 and Sec22b to create a replicative organelle." J Exp Med **199**(9): 1201-1211.

Kapust, R. B., J. Tozser, J. D. Fox, D. E. Anderson, S. Cherry, T. D. Copeland and D. S. Waugh (2001). "Tobacco etch virus protease: mechanism of autolysis and rational design of stable mutants with wild-type catalytic proficiency." Protein Eng **14**(12): 993-1000.

Kapust, R. B. and D. S. Waugh (1999). "Escherichia coli maltose-binding protein is uncommonly effective at promoting the solubility of polypeptides to which it is fused." Protein Sci **8**(8): 1668-1674.

Kapust, R. B. and D. S. Waugh (2000). "Controlled intracellular processing of fusion proteins by TEV protease." Protein Expr Purif **19**(2): 312-318.

Keppler, A., M. Kindermann, S. Gendreizig, H. Pick, H. Vogel and K. Johnsson (2004). "Labeling of fusion proteins of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase with small molecules in vivo and in vitro." Methods **32**(4): 437-444.

Kinch, L. N., M. L. Yarbrough, K. Orth and N. V. Grishin (2009). "Fido, a novel AMPylation domain common to fic, doc, and AvrB." PLoS One **4**(6): e5818.

Knowles, J. R. (1989). "The mechanism of biotin-dependent enzymes." Annu Rev Biochem **58**: 195-221.

Kohn, M. and R. Breinbauer (2004). "The Staudinger ligation-a gift to chemical biology." Angew Chem Int Ed Engl **43**(24): 3106-3116.

Kosa, N. M., R. W. Haushalter, A. R. Smith and M. D. Burkart (2012). "Reversible labeling of native and fusion-protein motifs." Nat Methods **9**(10): 981-984.

Kruger, R. G., B. Otvos, B. A. Frankel, M. Bentley, P. Dostal and D. G. McCafferty (2004). "Analysis of the substrate specificity of the Staphylococcus aureus sortase transpeptidase SrtA." Biochemistry **43**(6): 1541-1551.

La Clair, J. J., T. L. Foley, T. R. Schegg, C. M. Regan and M. D. Burkart (2004). "Manipulation of carrier proteins in antibiotic biosynthesis." Chem Biol **11**(2): 195-201.

Lambalot, R. H., A. M. Gehring, R. S. Flugel, P. Zuber, M. LaCelle, M. A. Marahiel, R. Reid, C. Khosla and C. T. Walsh (1996). "A new enzyme superfamily - the phosphopantetheinyl transferases." Chem Biol **3**(11): 923-936.

- Lane, M. D., K. L. Rominger, D. L. Young and F. Lynen (1964). "The Enzymatic Synthesis of Holotranscarboxylase from Apotranscarboxylase and (+)-Biotin. II. Investigation of the Reaction Mechanism." J Biol Chem **239**: 2865-2871.
- Lane, M. D., D. L. Young and F. Lynen (1964). "The Enzymatic Synthesis of Holotranscarboxylase from Apotranscarboxylase and (+)-Biotin. I. Purification of the Apoenzyme and Synthetase; Characteristics of the Reaction." J Biol Chem **239**: 2858-2864.
- Lang, K. and J. W. Chin (2014). "Bioorthogonal reactions for labeling proteins." ACS Chem Biol **9**(1): 16-20.
- Lindstrom, U. M. (2002). "Stereoselective organic reactions in water." Chem Rev **102**(8): 2751-2772.
- Lisenbee, C. S., S. K. Karnik and R. N. Trelease (2003). "Overexpression and mislocalization of a tail-anchored GFP redefines the identity of peroxisomal ER." Traffic **4**(7): 491-501.
- Liu, D. R., T. J. Magliery, M. Pastrnak and P. G. Schultz (1997). "Engineering a tRNA and aminoacyl-tRNA synthetase for the site-specific incorporation of unnatural amino acids into proteins in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(19): 10092-10097.
- Los, G. V., L. P. Encell, M. G. McDougall, D. D. Hartzell, N. Karassina, C. Zimprich, M. G. Wood, R. Learish, R. F. Ohana, M. Urh, D. Simpson, J. Mendez, K. Zimmerman, P. Otto, G. Vidugiris, J. Zhu, A. Darzins, D. H. Klaubert, R. F. Bulleit and K. V. Wood (2008). "HaloTag: a novel protein labeling technology for cell imaging and protein analysis." ACS Chem Biol **3**(6): 373-382.
- Los, G. V. and K. Wood (2007). "The HaloTag: a novel technology for cell imaging and protein analysis." Methods Mol Biol **356**: 195-208.
- Luong, P., L. N. Kinch, C. A. Brautigam, N. V. Grishin, D. R. Tomchick and K. Orth (2010). "Kinetic and structural insights into the mechanism of AMPylation by VopS Fic domain." J Biol Chem **285**(26): 20155-20163.
- Malhotra, A. (2009). "Tagging for protein expression." Methods Enzymol **463**: 239-258.
- Mao, H., S. A. Hart, A. Schink and B. A. Pollok (2004). "Sortase-mediated protein ligation: a new method for protein engineering." J Am Chem Soc **126**(9): 2670-2671.
- Martin, B. R., B. N. Giepmans, S. R. Adams and R. Y. Tsien (2005). "Mammalian cell-based optimization of the biarsenical-binding tetracysteine motif for improved fluorescence and affinity." Nat Biotechnol **23**(10): 1308-1314.
- Mazmanian, S. K., H. Ton-That and O. Schneewind (2001). "Sortase-catalysed anchoring of surface proteins to the cell wall of *Staphylococcus aureus*." Mol Microbiol **40**(5): 1049-1057.
- Michaely, P., D. R. Tomchick, M. Machius and R. G. Anderson (2002). "Crystal structure of a 12 ANK repeat stack from human ankyrinR." EMBO J **21**(23): 6387-6396.
- Michard, C. and P. Doublet (2015). "Post-translational modifications are key players of the *Legionella pneumophila* infection strategy." Front Microbiol **6**: 87.
- Mihai Gazdag, E., A. Streller, I. Haneburger, H. Hilbi, I. R. Vetter, R. S. Goody and A. Itzen (2013). "Mechanism of Rab1b deactivation by the *Legionella pneumophila* GAP LepB." EMBO Rep **14**(2): 199-205.

Miller, L. W., Y. Cai, M. P. Sheetz and V. W. Cornish (2005). "In vivo protein labeling with trimethoprim conjugates: a flexible chemical tag." Nat Methods **2**(4): 255-257.

Miller, L. W. and V. W. Cornish (2005). "Selective chemical labeling of proteins in living cells." Curr Opin Chem Biol **9**(1): 56-61.

Miller, L. W., J. Sable, P. Goelet, M. P. Sheetz and V. W. Cornish (2004). "Methotrexate conjugates: a molecular in vivo protein tag." Angew Chem Int Ed Engl **43**(13): 1672-1675.

Mishin, A. S., V. V. Belousov, K. M. Solntsev and K. A. Lukyanov (2015). "Novel uses of fluorescent proteins." Curr Opin Chem Biol **27**: 1-9.

Mosavi, L. K., T. J. Cammett, D. C. Desrosiers and Z. Y. Peng (2004). "The ankyrin repeat as molecular architecture for protein recognition." Protein Sci **13**(6): 1435-1448.

Mossessova, E. and C. D. Lima (2000). "Ulp1-SUMO crystal structure and genetic analysis reveal conserved interactions and a regulatory element essential for cell growth in yeast." Mol Cell **5**(5): 865-876.

Mukherjee, S., X. Liu, K. Arasaki, J. McDonough, J. E. Galan and C. R. Roy (2011). "Modulation of Rab GTPase function by a protein phosphocholine transferase." Nature **477**(7362): 103-106.

Muller, M. P., H. Peters, J. Blumer, W. Blankenfeldt, R. S. Goody and A. Itzen (2010). "The Legionella effector protein DrrA AMPylates the membrane traffic regulator Rab1b." Science **329**(5994): 946-949.

Murata, T., A. Delprato, A. Ingmundson, D. K. Toomre, D. G. Lambright and C. R. Roy (2006). "The Legionella pneumophila effector protein DrrA is a Rab1 guanine nucleotide-exchange factor." Nat Cell Biol **8**(9): 971-977.

Murray, K. (1965). "The Basic Proteins of Cell Nuclei." Annu Rev Biochem **34**: 209-246.

Nallamsetty, S. and D. S. Waugh (2006). "Solubility-enhancing proteins MBP and NusA play a passive role in the folding of their fusion partners." Protein Expr Purif **45**(1): 175-182.

Nilsson, B. L., L. L. Kiessling and R. T. Raines (2000). "Staudinger ligation: a peptide from a thioester and azide." Org Lett **2**(13): 1939-1941.

Ning, X., J. Guo, M. A. Wolfert and G. J. Boons (2008). "Visualizing metabolically labeled glycoconjugates of living cells by copper-free and fast Huisgen cycloadditions." Angew Chem Int Ed Engl **47**(12): 2253-2255.

Ninio, S. and C. R. Roy (2007). "Effector proteins translocated by Legionella pneumophila: strength in numbers." Trends Microbiol **15**(8): 372-380.

Noren, C. J., S. J. Anthony-Cahill, M. C. Griffith and P. G. Schultz (1989). "A general method for site-specific incorporation of unnatural amino acids into proteins." Science **244**(4901): 182-188.

Normanly, J., L. G. Kleina, J. M. Masson, J. Abelson and J. H. Miller (1990). "Construction of Escherichia coli amber suppressor tRNA genes. III. Determination of tRNA specificity." J Mol Biol **213**(4): 719-726.

O'Hare, H. M., K. Johnsson and A. Gautier (2007). "Chemical probes shed light on protein function." Curr Opin Struct Biol **17**(4): 488-494.

- Oesterlin, L. K., R. S. Goody and A. Itzen (2012). "Posttranslational modifications of Rab proteins cause effective displacement of GDP dissociation inhibitor." Proc Natl Acad Sci U S A **109**(15): 5621-5626.
- Olmsted, J. B. and G. G. Borisy (1973). "Microtubules." Annu Rev Biochem **42**: 507-540.
- Ormo, M., A. B. Cubitt, K. Kallio, L. A. Gross, R. Y. Tsien and S. J. Remington (1996). "Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein." Science **273**(5280): 1392-1395.
- Overmeyer, J. H., A. L. Wilson, R. A. Erdman and W. A. Maltese (1998). "The putative "switch 2" domain of the Ras-related GTPase, Rab1B, plays an essential role in the interaction with Rab escort protein." Mol Biol Cell **9**(1): 223-235.
- Pan, X., A. Luhrmann, A. Satoh, M. A. Laskowski-Arce and C. R. Roy (2008). "Ankyrin repeat proteins comprise a diverse family of bacterial type IV effectors." Science **320**(5883): 1651-1654.
- Paris, C., O. Brun, E. Pedroso and A. Grandas (2015). "Exploiting protected maleimides to modify oligonucleotides, peptides and peptide nucleic acids." Molecules **20**(4): 6389-6408.
- Pegg, A. E., M. E. Dolan and R. C. Moschel (1995). "Structure, function, and inhibition of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase." Prog Nucleic Acid Res Mol Biol **51**: 167-223.
- Popp, M. W., J. M. Antos, G. M. Grotenbreg, E. Spooner and H. L. Ploegh (2007). "Sortagging: a versatile method for protein labeling." Nat Chem Biol **3**(11): 707-708.
- Popp, M. W. and H. L. Ploegh (2011). "Making and breaking peptide bonds: protein engineering using sortase." Angew Chem Int Ed Engl **50**(22): 5024-5032.
- Pozsgay, V., N. E. Vieira and A. Yergey (2002). "A method for bioconjugation of carbohydrates using Diels-Alder cycloaddition." Org Lett **4**(19): 3191-3194.
- Prescher, J. A., D. H. Dube and C. R. Bertozzi (2004). "Chemical remodelling of cell surfaces in living animals." Nature **430**(7002): 873-877.
- Pries, F., J. Kingma, G. H. Krooshof, C. M. Jeronimus-Stratingh, A. P. Bruins and D. B. Janssen (1995). "Histidine 289 is essential for hydrolysis of the alkyl-enzyme intermediate of haloalkane dehalogenase." J Biol Chem **270**(18): 10405-10411.
- Pylypenko, O., A. Rak, T. Durek, S. Kushnir, B. E. Dursina, N. H. Thomae, A. T. Constantinescu, L. Brunsveld, A. Watzke, H. Waldmann, R. S. Goody and K. Alexandrov (2006). "Structure of doubly prenylated Ypt1:GDI complex and the mechanism of GDI-mediated Rab recycling." EMBO J **25**(1): 13-23.
- Quiocho, F. A., J. C. Spurlino and L. E. Rodseth (1997). "Extensive features of tight oligosaccharide binding revealed in high-resolution structures of the maltodextrin transport/chemosensory receptor." Structure **5**(8): 997-1015.
- Rashidian, M., J. K. Dozier and M. D. Distefano (2013). "Enzymatic labeling of proteins: techniques and approaches." Bioconjug Chem **24**(8): 1277-1294.
- Reinhardt, U., J. Lotze, S. Zernia, K. Morl, A. G. Beck-Sickinger and O. Seitz (2014). "Peptide-templated acyl transfer: a chemical method for the labeling of membrane proteins on live cells." Angew Chem Int Ed Engl **53**(38): 10237-10241.

Rostovtsev, V. V., L. G. Green, V. V. Fokin and K. B. Sharpless (2002). "A stepwise Huisgen cycloaddition process: copper(I)-catalyzed regioselective "ligation" of azides and terminal alkynes." Angew Chem Int Ed Engl **41**(14): 2596-2599.

Rothmann, M., N. M. Kosa and M. D. Burkart (2014). "Resin supported acyl carrier protein labeling strategies." RSC Adv **4**(18): 9092-9097.

Roy, C. R. and J. Cherfils (2015). "Structure and function of Fic proteins." Nat Rev Microbiol **13**(10): 631-640.

Roy, C. R. and S. Mukherjee (2009). "Bacterial FIC Proteins AMP Up Infection." Sci Signal **2**(62): pe14.

Sakamoto, T., S. Sawamoto, T. Tanaka, H. Fukuda and A. Kondo (2010). "Enzyme-mediated site-specific antibody-protein modification using a ZZ domain as a linker." Bioconjug Chem **21**(12): 2227-2233.

Saxon, E., J. I. Armstrong and C. R. Bertozzi (2000). "A "traceless" Staudinger ligation for the chemoselective synthesis of amide bonds." Org Lett **2**(14): 2141-2143.

Saxon, E. and C. R. Bertozzi (2000). "Cell surface engineering by a modified Staudinger reaction." Science **287**(5460): 2007-2010.

Scheck, R. A., M. T. Dedeo, A. T. Iavarone and M. B. Francis (2008). "Optimization of a biomimetic transamination reaction." J Am Chem Soc **130**(35): 11762-11770.

Schilling, C. I., N. Jung, M. Biskup, U. Schepers and S. Bräse (2011). "Bioconjugation via azide-Staudinger ligation: an overview." Chem Soc Rev **40**(9): 4840-4871.

Schmohl, L. and D. Schwarzer (2014). "Sortase-mediated ligations for the site-specific modification of proteins." Curr Opin Chem Biol **22**: 122-128.

Schneider, C. A., W. S. Rasband and K. W. Eliceiri (2012). "NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis." Nat Methods **9**(7): 671-675.

Schoebel, S., A. L. Cichy, R. S. Goody and A. Itzen (2011). "Protein LidA from Legionella is a Rab GTPase supereffector." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(44): 17945-17950.

Schoebel, S., L. K. Oesterlin, W. Blankenfeldt, R. S. Goody and A. Itzen (2009). "RabGDI displacement by DrrA from Legionella is a consequence of its guanine nucleotide exchange activity." Mol Cell **36**(6): 1060-1072.

Schutkowski, M., U. Reimer, S. Panse, L. Dong, J. M. Lizcano, D. R. Alessi and J. Schneider-Mergener (2004). "High-content peptide microarrays for deciphering kinase specificity and biology." Angew Chem Int Ed Engl **43**(20): 2671-2674.

Sedgwick, S. G. and S. J. Smerdon (1999). "The ankyrin repeat: a diversity of interactions on a common structural framework." Trends Biochem Sci **24**(8): 311-316.

Shaner, N. C., R. E. Campbell, P. A. Steinbach, B. N. Giepmans, A. E. Palmer and R. Y. Tsien (2004). "Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein." Nat Biotechnol **22**(12): 1567-1572.

Shaner, N. C., P. A. Steinbach and R. Y. Tsien (2005). "A guide to choosing fluorescent proteins." Nat Methods **2**(12): 905-909.

- Shieh, P. and C. R. Bertozzi (2014). "Design strategies for bioorthogonal smart probes." Org Biomol Chem **12**(46): 9307-9320.
- Shih, Y. P., W. M. Kung, J. C. Chen, C. H. Yeh, A. H. Wang and T. F. Wang (2002). "High-throughput screening of soluble recombinant proteins." Protein Sci **11**(7): 1714-1719.
- Shu, X., N. C. Shaner, C. A. Yarbrough, R. Y. Tsien and S. J. Remington (2006). "Novel chromophores and buried charges control color in mFruits." Biochemistry **45**(32): 9639-9647.
- Slavoff, S. A., I. Chen, Y. A. Choi and A. Y. Ting (2008). "Expanding the substrate tolerance of biotin ligase through exploration of enzymes from diverse species." J Am Chem Soc **130**(4): 1160-1162.
- Sletten, E. M. and C. R. Bertozzi (2009). "Bioorthogonal chemistry: fishing for selectivity in a sea of functionality." Angew Chem Int Ed Engl **48**(38): 6974-6998.
- Smith, D. B. and K. S. Johnson (1988). "Single-step purification of polypeptides expressed in Escherichia coli as fusions with glutathione S-transferase." Gene **67**(1): 31-40.
- Soding, J. (2005). "Protein homology detection by HMM-HMM comparison." Bioinformatics **21**(7): 951-960.
- Soding, J., A. Biegert and A. N. Lupas (2005). "The HHpred interactive server for protein homology detection and structure prediction." Nucleic Acids Res **33**(Web Server issue): W244-248.
- Sosinsky, G. E., G. M. Gaietta, G. Hand, T. J. Deerinck, A. Han, M. Mackey, S. R. Adams, J. Bouwer, R. Y. Tsien and M. H. Ellisman (2003). "Tetracysteine genetic tags complexed with biarsenical ligands as a tool for investigating gap junction structure and dynamics." Cell Commun Adhes **10**(4-6): 181-186.
- Spirig, T., E. M. Weiner and R. T. Clubb (2011). "Sortase enzymes in Gram-positive bacteria." Mol Microbiol **82**(5): 1044-1059.
- Staudinger, H. and Meyer, J. (1919). „Über neue organische Phosphorverbindungen III. Phosphinmethylderivate und Phosphinimine“. Helv. Chim. Acta **2**: 635-646.
- Stenmark, H. and V. M. Olkkonen (2001). "The Rab GTPase family." Genome Biol **2**(5): REVIEWS3007.
- Stroffekova, K., C. Proenza and K. G. Beam (2001). "The protein-labeling reagent FLASH-EDT2 binds not only to CCXXCC motifs but also non-specifically to endogenous cysteine-rich proteins." Pflugers Arch **442**(6): 859-866.
- Stroupe, C. and A. T. Brunger (2000). "Crystal structures of a Rab protein in its inactive and active conformations." J Mol Biol **304**(4): 585-598.
- Sunbul, M. and J. Yin (2009). "Site specific protein labeling by enzymatic posttranslational modification." Org Biomol Chem **7**(17): 3361-3371.
- Swanson, M. S. and R. R. Isberg (1995). "Association of Legionella pneumophila with the macrophage endoplasmic reticulum." Infect Immun **63**(9): 3609-3620.
- Tan, Y., R. J. Arnold and Z. Q. Luo (2011). "Legionella pneumophila regulates the small GTPase Rab1 activity by reversible phosphorylcholation." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(52): 21212-21217.

- Taylor, E. W. (1972). "Chemistry of muscle contraction." Annu Rev Biochem **41**(10): 577-616.
- Tiefenbrunn, T. K. and P. E. Dawson (2010). "Chemoselective ligation techniques: modern applications of time-honored chemistry." Biopolymers **94**(1): 95-106.
- Ton-That, H., G. Liu, S. K. Mazmanian, K. F. Faull and O. Schneewind (1999). "Purification and characterization of sortase, the transpeptidase that cleaves surface proteins of *Staphylococcus aureus* at the LPXTG motif." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(22): 12424-12429.
- Tornøe, C. W., C. Christensen and M. Meldal (2002). "Peptidotriazoles on solid phase: [1,2,3]-triazoles by regioselective copper(I)-catalyzed 1,3-dipolar cycloadditions of terminal alkynes to azides." J Org Chem **67**(9): 3057-3064.
- Tsien, R. Y. (1998). "The green fluorescent protein." Annu Rev Biochem **67**: 509-544.
- Tsien, R. Y. (2005). "Building and breeding molecules to spy on cells and tumors." FEBS Lett **579**(4): 927-932.
- van Berkel, S. S., M. B. van Eldijk and J. C. van Hest (2011). "Staudinger ligation as a method for bioconjugation." Angew Chem Int Ed Engl **50**(38): 8806-8827.
- Wallace, L. A. and C. Robert Matthews (2002). "Highly divergent dihydrofolate reductases conserve complex folding mechanisms." J Mol Biol **315**(2): 193-211.
- Wals, K. and H. Ovaa (2014). "Unnatural amino acid incorporation in *E. coli*: current and future applications in the design of therapeutic proteins." Front Chem **2**: 15.
- Walsh, C. T., S. Garneau-Tsodikova and G. J. Gatto, Jr. (2005). "Protein posttranslational modifications: the chemistry of proteome diversifications." Angew Chem Int Ed Engl **44**(45): 7342-7372.
- Walsh, C. T., A. M. Gehring, P. H. Weinreb, L. E. Quadri and R. S. Flugel (1997). "Post-translational modification of polyketide and nonribosomal peptide synthases." Curr Opin Chem Biol **1**(3): 309-315.
- Wang, F., H. Zhang, X. Zhang, Y. Wang, F. Ren, X. Zhang, Y. Zhai and Z. Chang (2008). "Varp interacts with Rab38 and functions as its potential effector." Biochem Biophys Res Commun **372**(1): 162-167.
- Waugh, D. S. (2005). "Making the most of affinity tags." Trends Biotechnol **23**(6): 316-320.
- Weinrich, D., P. Jonkheijm, C. M. Niemeyer and H. Waldmann (2009). "Applications of protein biochips in biomedical and biotechnological research." Angew Chem Int Ed Engl **48**(42): 7744-7751.
- Williamson, D. J., M. A. Fascione, M. E. Webb and W. B. Turnbull (2012). "Efficient N-terminal labeling of proteins by use of sortase." Angew Chem Int Ed Engl **51**(37): 9377-9380.
- Wombacher, R. and V. W. Cornish (2011). "Chemical tags: applications in live cell fluorescence imaging." J Biophotonics **4**(6): 391-402.
- Wombacher, R., M. Heidbreder, S. van de Linde, M. P. Sheetz, M. Heilemann, V. W. Cornish and M. Sauer (2010). "Live-cell super-resolution imaging with trimethoprim conjugates." Nat Methods **7**(9): 717-719.

- Wong, L. S., J. Thirlway and J. Micklefield (2008). "Direct site-selective covalent protein immobilization catalyzed by a phosphopantetheinyl transferase." J Am Chem Soc **130**(37): 12456-12464.
- Wu, Z., X. Guo and Z. Guo (2011). "Sortase A-catalyzed peptide cyclization for the synthesis of macrocyclic peptides and glycopeptides." Chem Commun (Camb) **47**(32): 9218-9220.
- Xiang, Z., V. K. Lacey, H. Ren, J. Xu, D. J. Burbank, P. A. Jennings and L. Wang (2014). "Proximity-enabled protein crosslinking through genetically encoding haloalkane unnatural amino acids." Angew Chem Int Ed Engl **53**(8): 2190-2193.
- Xiao, J., C. A. Worby, S. Mattoo, B. Sankaran and J. E. Dixon (2010). "Structural basis of Fic-mediated adenylation." Nat Struct Mol Biol **17**(8): 1004-1010.
- Yarbrough, M. L., Y. Li, L. N. Kinch, N. V. Grishin, H. L. Ball and K. Orth (2009). "AMPylation of Rho GTPases by Vibrio VopS disrupts effector binding and downstream signaling." Science **323**(5911): 269-272.
- Yin, J., F. Liu, X. Li and C. T. Walsh (2004). "Labeling proteins with small molecules by site-specific posttranslational modification." J Am Chem Soc **126**(25): 7754-7755.
- Yin, J., P. D. Straight, S. M. McLoughlin, Z. Zhou, A. J. Lin, D. E. Golan, N. L. Kelleher, R. Kolter and C. T. Walsh (2005). "Genetically encoded short peptide tag for versatile protein labeling by Sfp phosphopantetheinyl transferase." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(44): 15815-15820.
- Zhang, J. (2009). "The colorful journey of green fluorescent protein." ACS Chem Biol **4**(2): 85-88.
- Zhang, J., R. E. Campbell, A. Y. Ting and R. Y. Tsien (2002). "Creating new fluorescent probes for cell biology." Nat Rev Mol Cell Biol **3**(12): 906-918.

8. Anhang

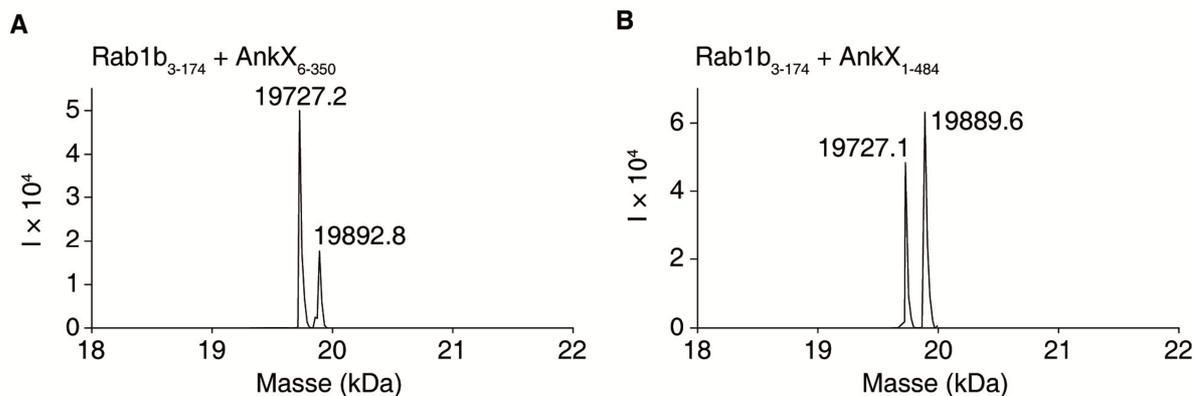


Abbildung 57: Massenspektren von Rab1b₃₋₁₇₄ nach Inkubation mit AnkX₆₋₃₅₀ (A) und AnkX₁₋₄₈₄ (B). 50 μ M Rab1b₃₋₁₇₄ wurde mit 1 μ M der jeweiligen AnkX-Variante und 1 mM CDP-Cholin \ddot{u} n inkubiert. In beiden Spektren ist zu erkennen, dass die Modifizierung nicht vollständig ist. Die Reaktion von Rab1b₃₋₁₇₄ mit den \ddot{u} brigen als inaktiv identifizierten AnkX-Konstrukten (AnkX₁₋₇₆₉ und k \ddot{u} rzter) ergaben entsprechende Massenspektren.

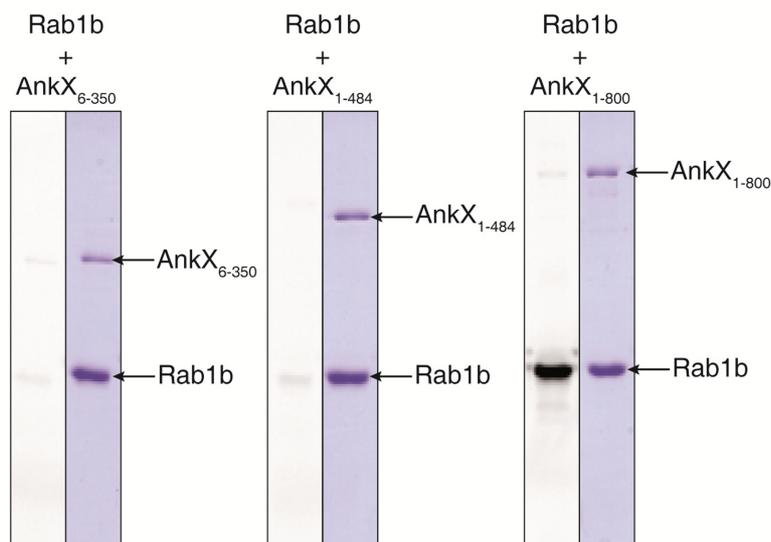


Abbildung 58: Western Blot- Analyse der Aktivität von AnkX₁₋₈₀₀, AnkX₁₋₄₈₄ und AnkX₆₋₃₅₀. 50 μ M Rab1b₃₋₁₇₄ wurde mit 500 nM des jeweiligen AnkX-Konstrukts f \ddot{u} r 1 h inkubiert und anschließend der Fortschritt der Phosphocholinierung mittels Western Blot gegen PC \ddot{u} berpr \ddot{u} ft. Nebeneinander sind immer die Bahn des Blots mit dem jeweiligen AnkX-Konstrukt und dem Rab-Protein und die Bahn des zugeh \ddot{o} rigen SDS-Gels dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass AnkX₁₋₈₀₀ unter den gewählten Bedingungen eine stärkere Phosphocholinierung des Rab-Proteins hervorruft, als die beiden k \ddot{u} rzeren Varianten.

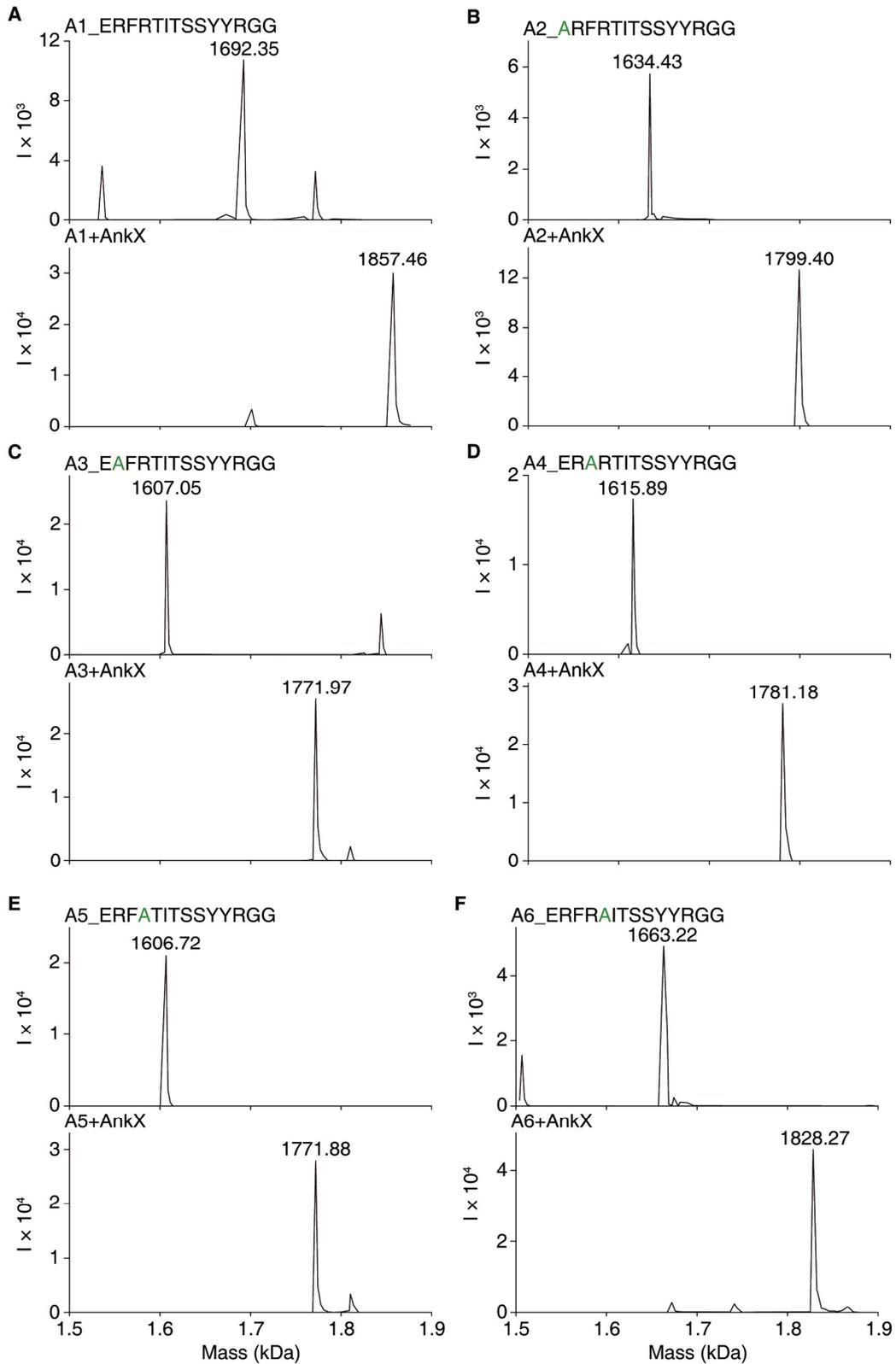


Abbildung 59: Massenspektren der Alanin-Mutantenpeptide A1-A6 von ERFRTITSSYYR vor und nach der Inkubation mit AnkX und CDP-Cholin.

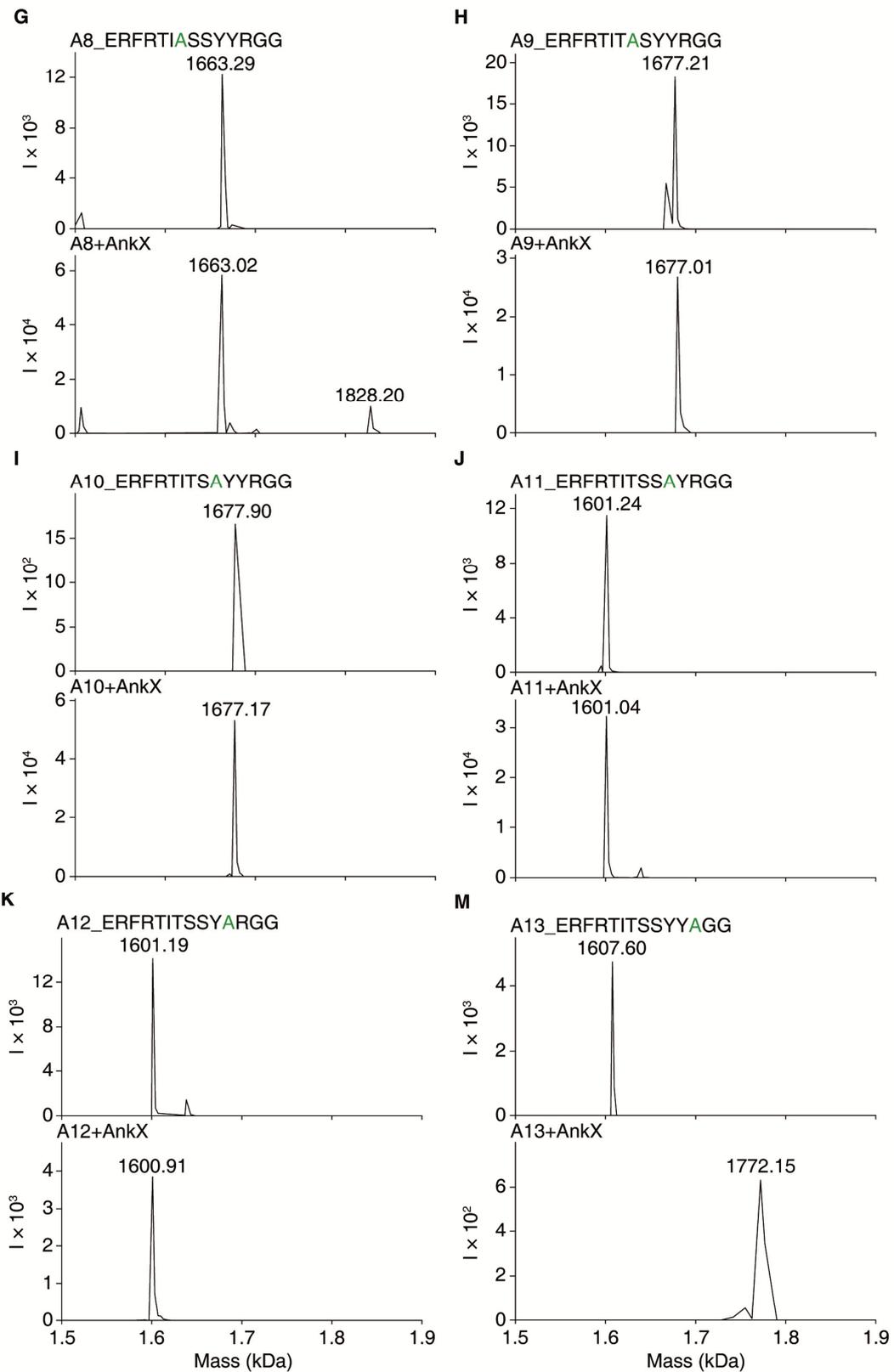


Abbildung 60: Massenspektren der Alanin-Mutantenpeptide A8-A13 von ERFRTITSSYYR vor und nach der Inkubation mit AnkX und CDP-Cholin.

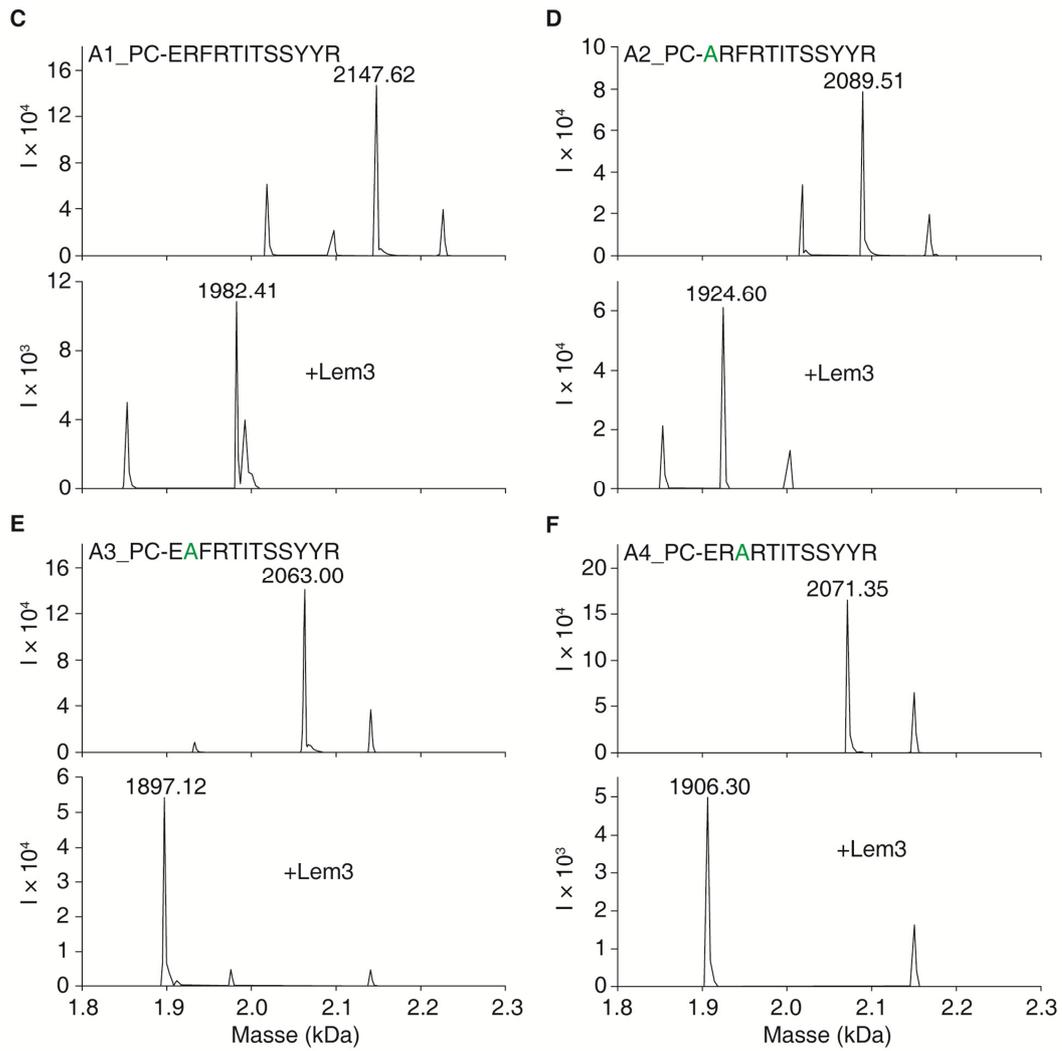


Abbildung 61: Massenspektren der dansylierten Alanin-Peptidmutanten von ERFRTITS-S(PC)-YYR. Abgebildet sind die Spektren der Peptidmutanten A1-A4 jeweils vor (oben) und nach (unten) der Inkubation mit Lem3.

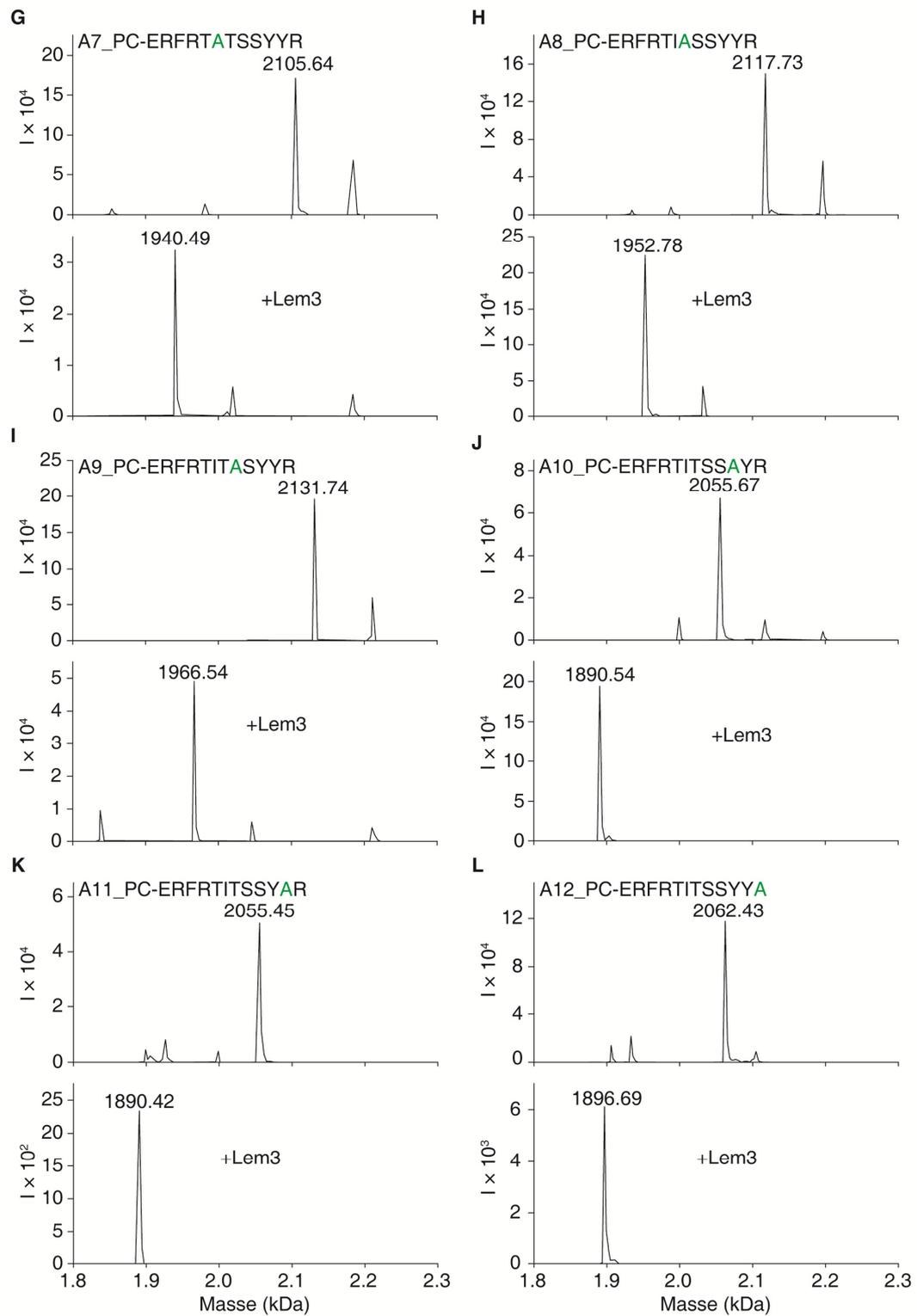


Abbildung 62: Massenspektren der dansylierten Alanin-Peptidmutanten von ERFRTITS-S(PC)-YYR. Abgebildet sind die Spektren der Peptidmutanten A7-A12 jeweils vor (oben) und nach (unten) der Inkubation mit Lem3.

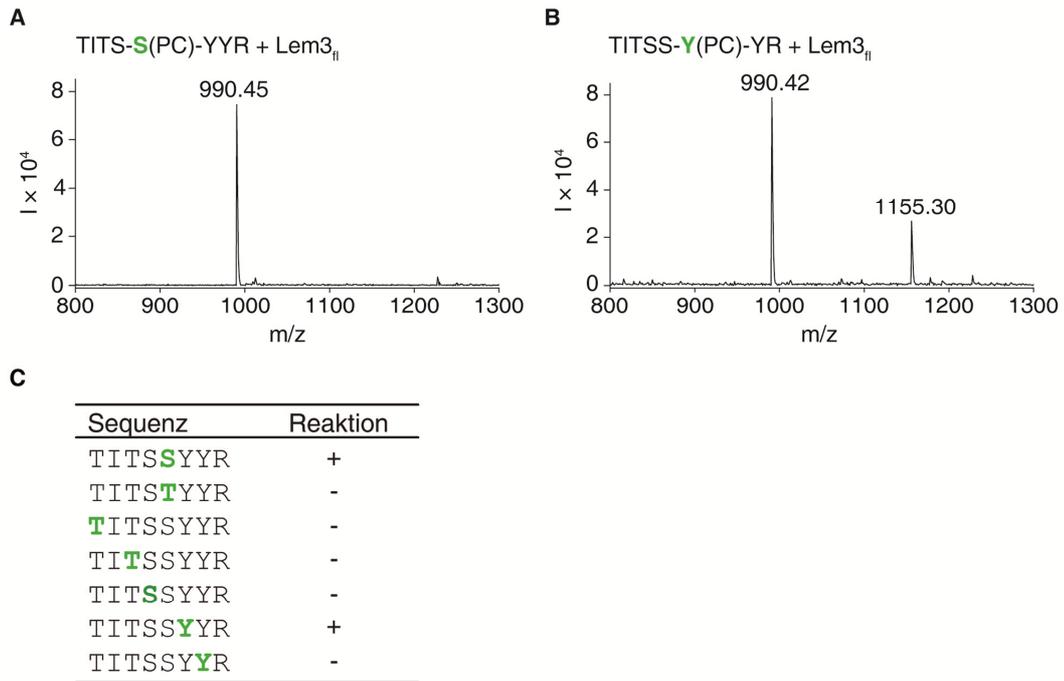


Abbildung 63: Demodifizierung von synthetischen Octapeptiden, die an unterschiedlichen Seitenketten phosphocholiniert sind. Exemplarisch sind die Massenspektren von TITS-S(PC)-YYR (A) und TITSS-Y(PC)-YR (B) nach der Reaktion mit Lem3 dargestellt. In C) ist eine Zusammenfassung aller untersuchten Peptide gezeigt. Lediglich der Wildtyp und TITSS-Y(PC)-YR können demnach dephosphocholiniert werden.

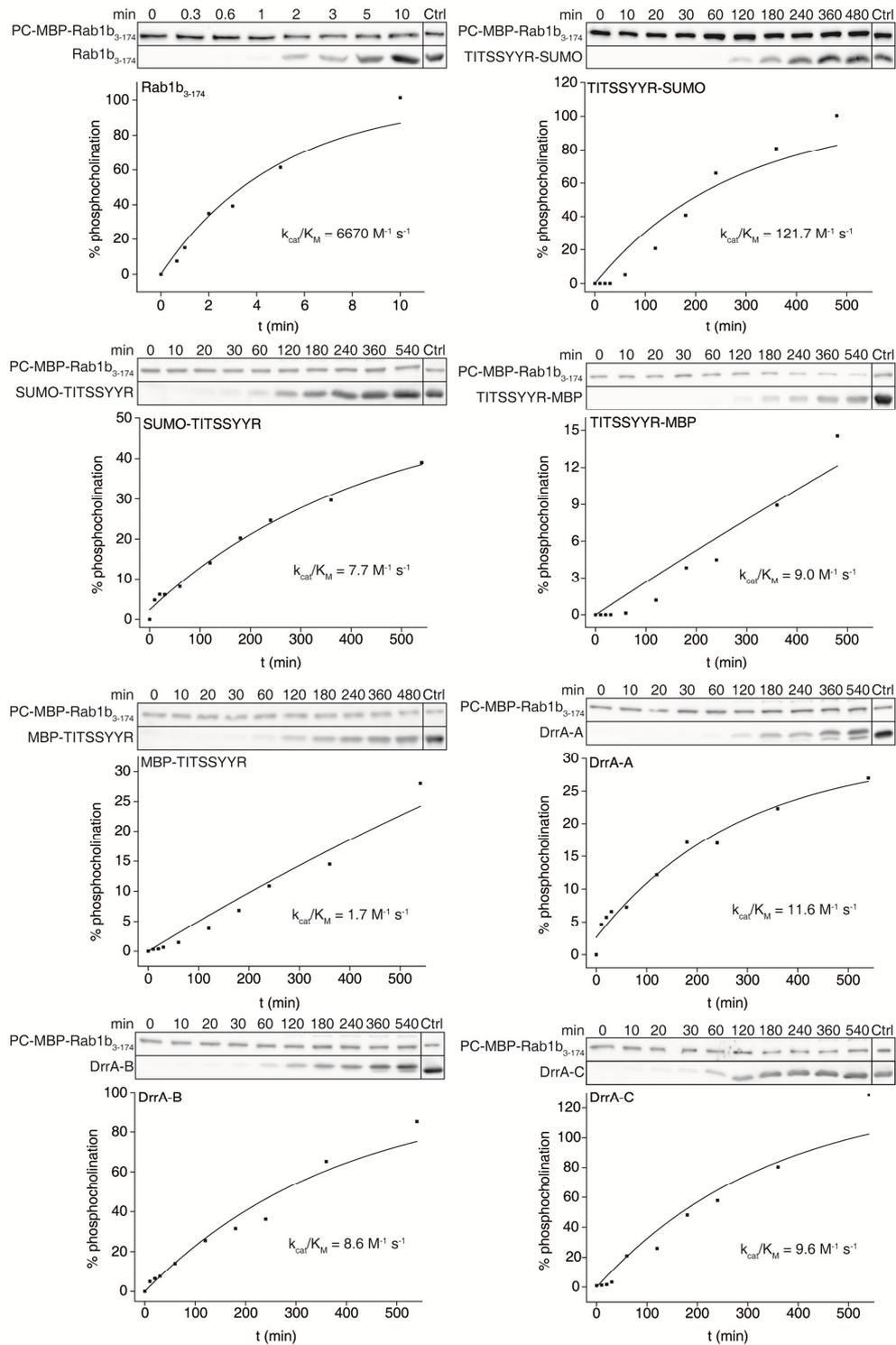


Abbildung 64: Zeitaufgelöste Phosphocholinierung der Modellproteine durch AnkX₁₋₈₀₀. Die verschiedenen Modellproteine wurden in einer Konzentration von 50 μM mit 0,5 μM oder 5 μM AnkX₁₋₈₀₀ und 1 mM CDP-Cholin inkubiert. Außerdem wurden die Ansätze mit 2 μM PC-His₆-MBP-Rab1b₃₋₁₇₄ versetzt. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach dem Start der Reaktion durch Zugabe von AnkX wurden Proben genommen und mit SDS-Probenpuffer denaturiert. Die Proben wurden dann mittels Western Blot auf den Gehalt an phosphocholinieren Proteinen untersucht.

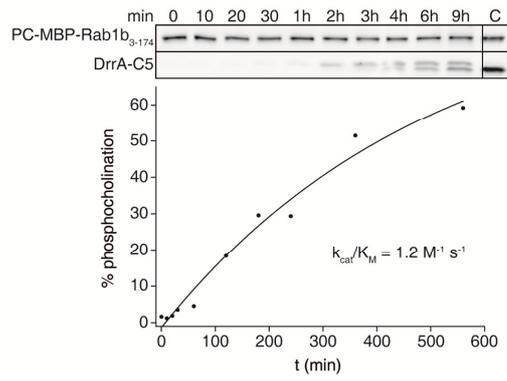


Abbildung 65: Zeitaufgelöste Phosphocholinerung von DrrA-C5 (DrrA N509-TSSYY) wie in Abb. 63.

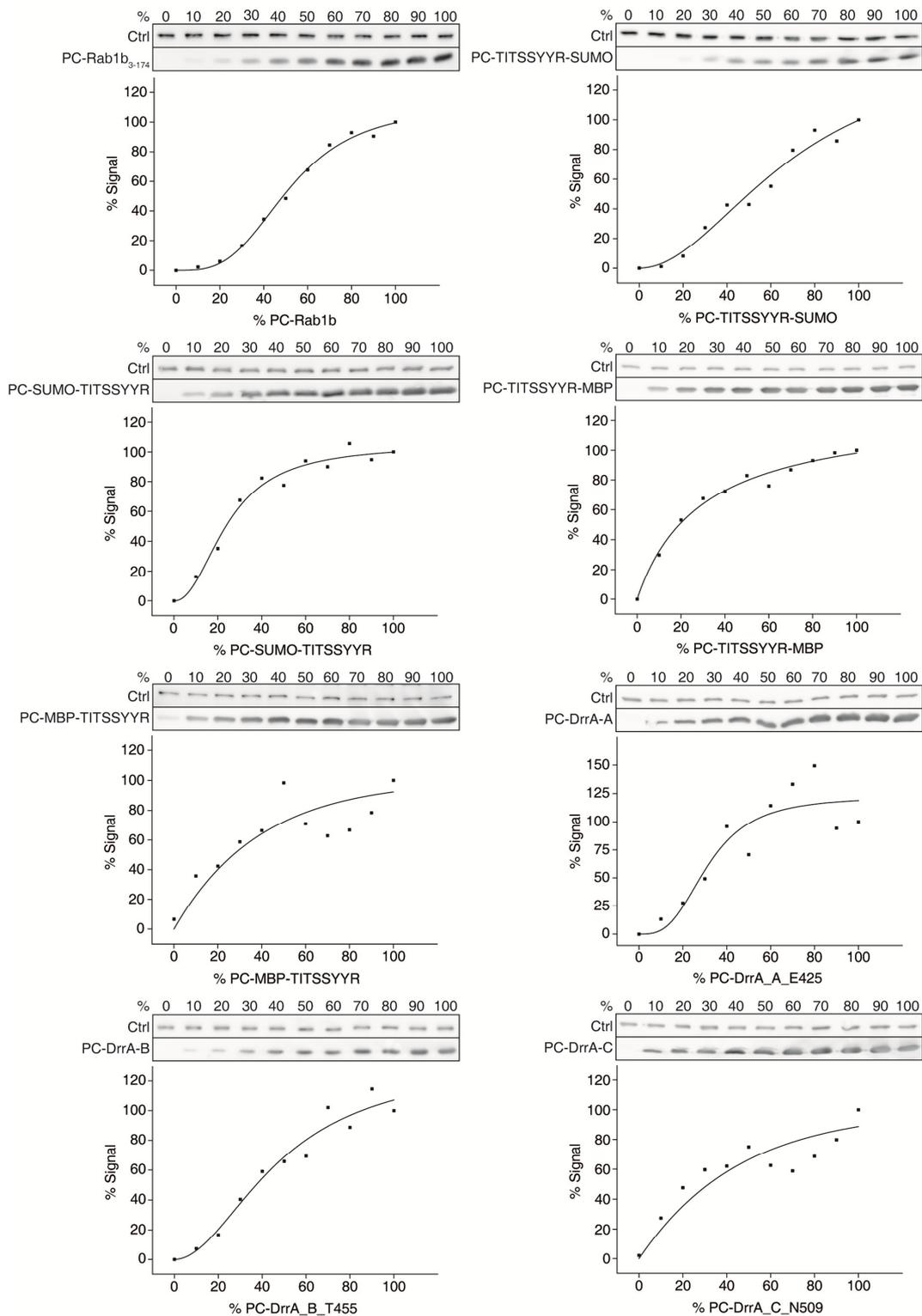


Abbildung 66: Eichkurven von PC-Rab1b und phosphocholinierten Modellproteinen. Die Modellproteine wurden präparativ phosphocholiniert, in verschiedenen Verhältnissen mit unmodifiziertem Protein vermischt und versetzt mit PC-His₆-MBP-Rab1b₃₋₁₇₄ mittels Western Blot analysiert. Die densitometrische Auswertung der Proteinbanden und die anschließende Auftragung der erhaltenen Werte gegen die Prozentzahl an phosphocholiniertem Protein, ergaben, dass bei keinem der geprüften Proteine ein linearer Zusammenhang zwischen dem Anteil an aufgetragenem phosphocholiniertem Protein und Signalstärke besteht.

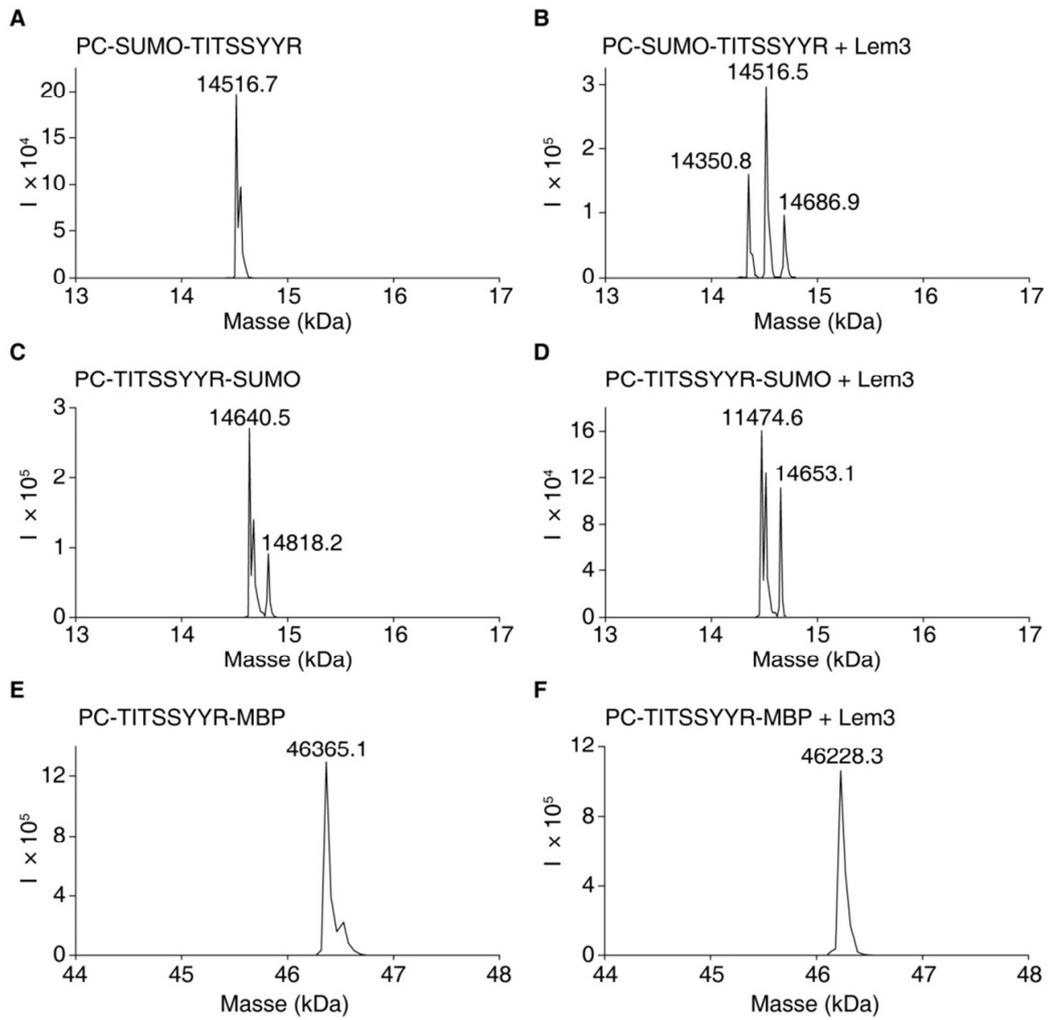


Abbildung 67: Massenspektren von präparativ phosphocholinierten Modellproteinen (TITSSYYR-SUMO, SUMO-TITSSYYR und TITSSYYR-MBP) vor (links) und nach (rechts) der Inkubation mit Lem3. In diesen drei Fällen konnte eine (partielle) Demodifizierung durch Lem3 detektiert werden.

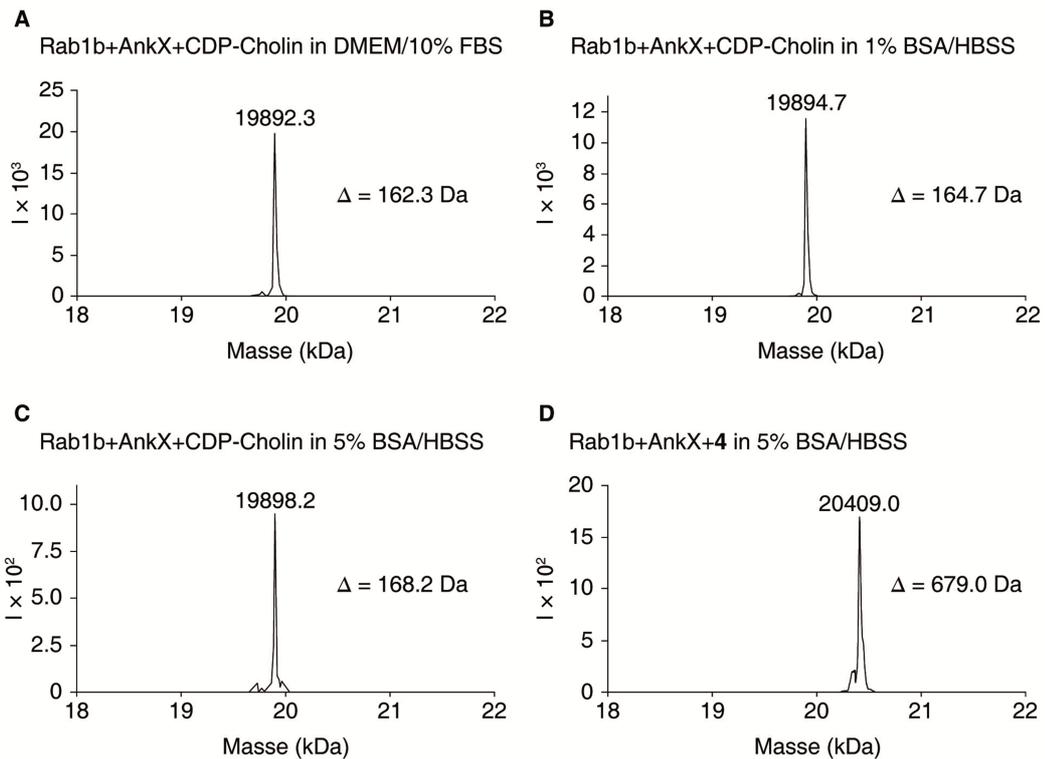


Abbildung 68: Massenspektren von Rab1b₃₋₁₇₄ nach Inkubation mit AnkX₁₋₈₀₀ und CDP-Cholin bzw. CDP-Cholin-N-PEG4-N'-Fluorescein in Zellkulturüberständen.

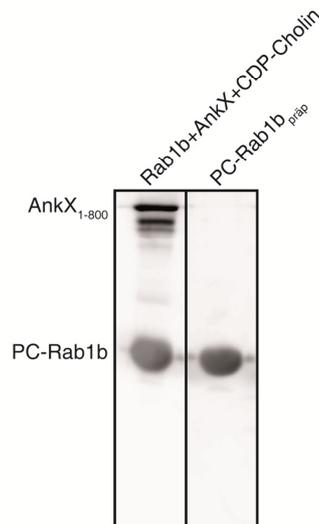


Abbildung 69: Western Blot-Analyse der Phosphocholinierung von Rab1b₃₋₁₇₄ durch AnkX₁₋₈₀₀ mit CDP-Cholin in Gegenwart von HEK293T-Zelllysate (links) und der Stabilität von präparativ phosphocholinierem Rab1b₃₋₁₇₄ in HEK293T-Zelllysate (rechts).

Danksagung

Bei den folgenden Personen möchte ich mich bedanken:

Prof. Dr. Aymelt Itzen für die Möglichkeit ein interessantes Projekt bearbeiten zu können und für die geduldige und hilfsbereite Betreuung während der gesamten Doktorarbeit.

Prof. Dr. Matthias Feige für die Übernahme des zweiten Gutachtens und für die Bereitstellung seines Zellkulturlabors.

Der gesamten AG Proteinchemie für eine angenehme und kollegiale Arbeitsatmosphäre sowie für hilfreiche Diskussionen und Anregungen im Laboralltag.

Florian B. Zauner und Benjamin Heim für die gewissenhafte Durchführung von Experimenten während ihrer Master- bzw. Bachelorarbeit.

Prof. Dr. Christian Hedberg, Philipp Ochtrup und Michael Albers für eine erfolgreiche Kooperation.

Prof. Dr. Johannes Buchner und Prof. Dr. Michael Groll für die Bereitstellung diverser Geräte.

Meinen Freunden aus Bochum und München für ihre Ermutigungen und Motivationsimpulse.

Meinen Eltern und meiner Schwester für ihre Hilfe und liebevolle Unterstützung.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle wörtlichen oder inhaltlichen Zitate sind als solche gekennzeichnet und im Literaturverzeichnis aufgeführt.

Diese Arbeit wurde noch keiner Prüfungskommission zur Begutachtung vorgelegt.

München, Dezember 2015

(Katharina Heller)

