



Fakultät für Chemie

Fachgebiet Proteinchemie

**Biochemische und strukturelle
Charakterisierung der Phosphocholintransferase
AnkX aus *Legionella pneumophila***

Stefan Ernst

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. Johannes Buchner

Prüfer der Dissertation:

1. Prof. Dr. Aymelt Itzen
2. Prof. Dr. Matthias Feige

Die Dissertation wurde am 13.06.2019 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 27.06.2019 angenommen.

Im Juni 2019 vorgelegt von
Stefan Ernst
aus Gräfelfing
geboren am 21.05.1990

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum vom Januar 2016 bis Juni 2019 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:

Ochtrop, P., Ernst, S. and Itzen, A., Hedberg, C. Exploring the substrate scope of the phosphocholine transferase AnkX for versatile protein functionalisation. ChemBioChem. doi: 10.1002/cbic.201900200

Folgendes Manuskript ist in Vorbereitung:

Ernst, S., Ecker, F., Kaspers, M., Ochtrop, P. and Hedberg, C., Groll, M., Itzen, A. Legionella effector AnkX mediates Rab1b phosphocholination by local protein unfolding.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	I
Tabellenverzeichnis	III
Abkürzungsverzeichnis	V
Abstract	1
Zusammenfassung.....	2
1. Einleitung.....	3
1.1 Das intrazelluläre Pathogen <i>Legionella pneumophila</i>.....	3
1.2 Das vesikuläre Transportprotein Rab1.....	4
1.2.1 Rab-Proteine als molekulare Schalter der Zelle.....	4
1.2.2 Strukturelle Grundlagen von Rab-Proteinen	5
1.2.3 Posttranslationale Modifikationen von Rab1	7
1.3 Die Phosphocholintransferase AnkX	8
1.4 Markierung von Proteinen.....	10
1.5 Bioorthogonale Proteinmarkierung.....	12
1.5.1 Carbonyl-basierte Proteinmarkierung	13
1.5.2 Azid-basierte Proteinmarkierung	14
1.5.3 Tetrazin-basierte Proteinmarkierung.....	16
1.6 Biosynthetische Proteinmarkierung.....	18
1.7 Enzymatische Proteinmarkierung	21
1.8 AnkX als Werkzeug für die enzymatische Proteinmarkierung.....	24
2. Zielsetzung	26
3. Ergebnisse.....	27
3.1 Biochemische Charakterisierung von AnkX.....	27
3.1.1 Optimierung der Expression und Reinigung von AnkX	27
3.1.2 AnkX-katalysierte Phosphocholinierung von Modellproteinen.....	30
3.1.3 Kinetische Parameter der AnkX-vermittelten Hydrolyse von CDP-Cholin	32
3.2 Synthese und Evaluierung von CDP-Cholin-Derivaten.....	33
3.2.1 Synthese bioorthogonaler CDP-Cholin-Derivate.....	34

3.2.2 Evaluierung von CDP-Cholin-Derivaten für die Proteinmarkierung.....	38
3.3 AnkX/Lem3-basierte Zweifach-Markierung von Zielproteinen.....	41
3.4 Anwendung der AnkX-basierten Markierungsmethode <i>in vivo</i>.....	46
3.5 Untersuchung der Interaktion zwischen AnkX und Rab1b.....	57
3.5.1 Bildung eines kovalenten Komplexes zwischen AnkX und Rab1b.....	57
3.5.2 Strukturelle und biochemische Analyse der AnkX-Rab1b-Interaktion	67
3.5.3 Strukturelle Einblicke in die AnkX-vermittelte Phosphocholinierung	72
4. Diskussion.....	77
4.1 Die Interaktion zwischen den AnkX-Ankyrin-Repeats und Rab1b	77
4.2 Die Interaktion zwischen der AnkX-FIC-Domäne und Rab1b	79
4.3 CDP-Cholin-Derivate für die AnkX-vermittelte Proteinmarkierung	82
4.4 Anwendung der AnkX-vermittelten Proteinmarkierung.....	83
4.5 Vergleich der AnkX-vermittelten Proteinmarkierung mit anderen enzymatischen Markierungsmethoden.....	86
5. Ausblick.....	90
6. Material und Methoden	92
6.1 Material.....	92
6.1.1 Chemikalien	92
6.1.2 Verbrauchsmaterialien	94
6.1.3 Geräte.....	94
6.1.4 Chromatographiezubehör.....	96
6.1.5 Kits.....	96
6.1.6 Antibiotika	96
6.1.7 Größenstandards	96
6.1.8 Enzyme.....	97
6.1.9 Antikörper.....	97
6.1.10 Bakterienstämme	97
6.1.11 Zelllinien.....	97
6.1.12 Lösungen	98

6.1.13 Pufferlösungen für die Reinigung von Proteinen.....	99
6.1.14 Nährmedien.....	99
6.1.15 Plasmide	100
6.1.16 CDP-Cholin-Derivate.....	102
6.1.17 Fluoreszente Farbstoffe.....	102
6.1.18 Peptide.....	102
6.2 Molekularbiologische Methoden.....	103
6.2.1 Polymerasekettenreaktion	103
6.2.2 Agarose-Gelelektrophorese und DNA-Reinigung	104
6.2.3 T4-SLIC-Klonierung.....	104
6.2.4 Ortsspezifische Mutagenese	105
6.2.5 Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i> Zellen	105
6.2.6 Amplifikation und Reinigung von Plasmid-DNA	106
6.3 Proteinchemische Methoden	106
6.3.1 Proteinüberexpression.....	106
6.3.2 Proteinreinigung	106
6.3.3 Herstellung von <i>E. coli</i> Zelllysaten mit xTractor-Puffer.....	107
6.3.4 Proteinreinigung über magnetische Kügelchen	107
6.3.5 Präparative Phosphocholinierung von Rab1b.....	108
6.3.6 Präparative Herstellung des AnkX _{G108C} :PC:Rab1b:GDP-Komplexes	108
6.3.7 AnkX/Lem3-basierte Zweifach-Markierung von Proteinen	108
6.4.6 Markierung von Proteinen mit bioorthogonalen Sonden	109
6.4 Analytische Methoden.....	109
6.4.1 SDS-PAGE.....	109
6.4.2 Coomassie-Färbung von SDS-Gelen	110
6.4.3 In-Gel-Fluoreszenz.....	110
6.4.2 Western Blot.....	110
6.4.4 Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS).....	111
6.4.5 Fluoreszenzspektrometrie	111

6.4.5 Zeitabhängiger Einbau von CDP-Cholin-Derivaten in Rab1b	111
6.4.6 Bestimmung katalytischer Effizienzen	112
6.4.7 Ionenpaar-Umkehrphasen-Chromatographie	113
6.4.8 Analytische Bildung des AnkX _{Cys} :PC:Rab1b-Komplexes	114
6.4.9 Analytische Größenausschlusschromatographie.....	115
6.4.10 Semi-quantitative Aktivitätstests.....	115
6.6 Zellbiologische Methoden.....	116
6.6.1 Kultivierung von Cos-7-Zellen	116
6.6.2 Transiente Transfektion von Cos-7-Zellen.....	116
6.6.3 AnkX-vermittelte Markierung von Cos-7-Zellen <i>in vivo</i>	116
6.6.4 Fixierung und Immunfluoreszenzfärbung von Cos-7-Zellen.....	117
6.6.5 Fluoreszenzmikroskopie.....	117
6.7 Methoden der organischen Synthese	118
6.7.1 Synthese bioorthogonaler CDP-Cholin-Derivate mit C3-Linker.....	118
6.7.2 Synthese bioorthogonaler CDP-Cholin-Derivate mit PEG ₄ -Linker	120
Literaturverzeichnis	122
Anhang	135
Danksagung	146
Eidesstattliche Erklärung	147

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Regulation von Rab Proteinen und vesikulärer Transport.	5
Abbildung 2 Strukturelle Grundlagen von Rab-Proteinen am Beispiel von Rab1a.	6
Abbildung 3 Strukturelle Grundlagen von AnkX.	9
Abbildung 4 Markierung von Proteinen durch bioorthogonale Reaktionen.	12
Abbildung 5 Carbonyl-basierte bioorthogonale Reaktionen zur Markierung von Proteinen.	13
Abbildung 6 Azid-basierte bioorthogonale Reaktionen zur Markierung von Proteinen.	16
Abbildung 7 Tetrazin-basierte bioorthogonale Reaktionen zur Markierung von Proteinen.	17
Abbildung 8 Erweiterung des genetischen Codes.	19
Abbildung 9 Bioorthogonale unnatürliche Aminosäuren (UAAs) für die Erweiterung des genetischen Codes.	20
Abbildung 10 Enzymatische Markierung von Proteinen.	23
Abbildung 11 Strategie der AnkX-vermittelten Proteinmarkierung.	25
Abbildung 12 Optimierung der Expression und Reinigung von AnkX.	29
Abbildung 13 Phosphocholinierung von TITSSYYR-SUMO mit AnkX ₁₋₈₀₀ und AnkX ₁₋₄₈₄	31
Abbildung 14 Michaelis-Menten-Kinetik der AnkX-vermittelten Hydrolyse von CDP-Cholin.	33
Abbildung 15 Synthetische CDP-Cholin-Derivate für die AnkX-basierte Proteinmarkierung.	35
Abbildung 16 Schema und Ausbeute der Synthese bioorthogonaler CDP-Cholin-Derivate.	37
Abbildung 17 Bestimmung der k_{cat}/K_M -Werte unterschiedlicher CDP-Cholin-Analoga für die AnkX-katalysierte Phosphocholinierung von Rab1b.	39
Abbildung 18 Vergleich der k_{cat}/K_M -Werte unterschiedlicher CDP-Cholin-Analoga für die AnkX-katalysierte Phosphocholinierung von Rab1b.	41
Abbildung 19 AnkX/Lem3-basierte Zweifach-Markierung eines MBP-Rab1b-Fusionskonstrukts.	44
Abbildung 20 Strategie der AnkX-vermittelten Markierung von HA-TITSSYYR-hY2R-eYFP.	46
Abbildung 21 Extrazelluläre Zugänglichkeit des HA-Epitops von HA-TITSSYYR-hY2R-eYFP.	48
Abbildung 22 Modifizierung von HA-TITSSYYR-hY2R mit CDP-Cholin-PEG ₄ -Sulfo-Cy5.	49
Abbildung 23 Modifizierung von HA-TITSSYYR-hY2R mit CDP-Cholin.	50
Abbildung 24 Unspezifische Anlagerung von AnkX ₁₋₈₀₀ an die Plasmamembran von Cos-7-Zellen.	51
Abbildung 25 Einsatz von AnkX ₁₋₄₈₄ für die Modifizierung von HA-TITSSYYR-hY2R.	53
Abbildung 26 Modifizierung von HA-TITSSYYR-hY2R-eYFP mit CDP-Cholin-PEG ₄ -Sulfo-Cy5 und CDP-Cholin unter optimierten Reaktionsbedingungen.	54
Abbildung 27 Phosphocholinierung von Rab1b in Zellkulturüberstand von Cos-7-Zellen.	56
Abbildung 28 Strategie zur Herstellung eines kovalent verknüpften AnkX _{Cys} :PC:Rab1b-Komplexes.	58
Abbildung 29 Eignung thiolreaktiver CDP-Cholin Derivate als Cosubstrate für die AnkX-vermittelte Phosphocholinierung und ihre Kompatibilität mit unterschiedlichen Reduktionsmitteln.	59
Abbildung 30 Auswahl an Aminosäuren von AnkX für die Mutagenese zu Cystein.	60
Abbildung 31 Analytische Bildung des AnkX _{Cys} :PC:Rab1b-Komplexes im direkten Ansatz.	61

Abbildung 32 Analytische Bildung des AnkX _{Cys} :PC:Rab1b-Komplexes im indirekten Ansatz.....	62
Abbildung 33 Optimierung der binären Adduktbildung im direkten Ansatz.....	63
Abbildung 34 Optimierung der ternären Komplexbildung im direkten Ansatz.....	64
Abbildung 35 Optimierung der ternären Komplexbildung im indirekten Ansatz.....	65
Abbildung 36 Analytische Größenausschlusschromatographie des präparativ hergestellten AnkX _{G108C} :PC:Rab1b-Komplexes.....	67
Abbildung 37 Kristallstruktur des AnkX _{G108C} :PC:Rab1b:GDP-Komplexes.....	69
Abbildung 38 Biochemische Validierung der Interaktionsflächen zwischen AnkX und Rab1b....	71
Abbildung 39 Der AnkX-Dorn bindet in eine konservierte hydrophobe Tasche von Rab1b.....	73
Abbildung 40 AnkX vermittelt die Phosphocholinierung von Rab1b durch eine lokale Entfaltung der <i>Switch II</i> -Region.....	75
Abbildung 41 Western-Blot-basierte Bestimmung der katalytischen Aktivität von C-terminalen AnkX-Verkürzungsstrukturen.....	135
Abbildung 42 Modifizierung und Demodifizierung von Rab1b mit unterschiedlichen CDP-Cholin-Derivaten.....	137
Abbildung 43 Autophosphocholinierung von AnkX _{S521A_T620A}	138
Abbildung 44 Anlagerung von CDP-Cholin-PEG ₄ -Sulfo-Cy5 an Cos-7-Zellen.....	139
Abbildung 45 Anlagerung von AnkX-PC an Cos-7-Zellen.....	140
Abbildung 46 SDS-PAGE-Analyse von Kristallen des kovalenten AnkX _{G108C} :PC:Rab1b:GDP-Komplexes.....	142
Abbildung 47 Massenspektrometrische Einschätzung der katalytischen Effizienz der Rab1b-Alaninvariante Y77A.....	142
Abbildung 48 Katalytische Aktivität unterschiedlicher F143 _{AnkX} -Varianten.....	144
Abbildung 49 Bedeutung des AnkX-Dorns für die lokale Entfaltung von Rab1b bei der AnkX-vermittelten Phosphocholinierung.....	145

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Quellen und Hersteller der verwendeten Materialien.	92
Tabelle 2 Verwendete Chemikalien.	92
Tabelle 3 Verwendete Materialien.	94
Tabelle 4 Verwendete Geräte.	94
Tabelle 5 Verwendetes Zubehör für die Chromatographie.	96
Tabelle 6 Verwendete Kits.	96
Tabelle 7 Verwendete Antibiotika.	96
Tabelle 8 Verwendete Größenstandards.	96
Tabelle 9 Verwendete Enzyme.	97
Tabelle 10 Verwendete Antikörper	97
Tabelle 11 Verwendete Bakterienstämme.	97
Tabelle 12 Verwendete Zelllinien.	97
Tabelle 13 Häufig verwendete Lösungen.	98
Tabelle 14 Pufferlösungen für die Reinigung von Proteinen.	99
Tabelle 15 Verwendete Nährmedien.	99
Tabelle 16 Verwendete Plasmide.	100
Tabelle 17 Verwendete CDP-Cholin-Derivate.	102
Tabelle 18 Verwendete Fluoreszenzfarbstoffe.	102
Tabelle 19 Verwendete Peptide.	102
Tabelle 20 Typischer Ansatz einer PCR.	103
Tabelle 21 Typisches Temperaturprogramm einer PCR.	104
Tabelle 22 Typischer Ansatz einer T4-SLIC-Klonierung.	105
Tabelle 23 Typischer Ansatz einer KLD-Reaktion.	105
Tabelle 24 Bandpass (BP)-Filter für die Fluoreszenzmikroskopie.	118
Tabelle 25 Densitometrische Ermittlung der Menge an phosphocholinisiertem Rab1b (Rab1b-PC) für die Western-Blot-basierte Bestimmung der Aktivität der AnkX-Verkürzungsstrukture aus Abbildung 12a.	135
Tabelle 26 Einfluss der unterschiedlichen Löslichkeitsfaktoren aus Abbildung 12b-e auf die katalytische Effizienz (k_{cat}/K_M) und die Ausbeute der Proteinreinigung von AnkX.	136
Tabelle 27 Hydrolysegeschwindigkeiten (v) und beobachtete Geschwindigkeitskonstanten (k_{obs}) der HPLC-basierten Michaelis-Menten-Kinetik für die AnkX-vermittelte Hydrolyse von CDP-Cholin aus Abbildung 14.	136
Tabelle 28 Absolute und relative k_{cat}/K_M-Werte der CDP-Cholin-Derivate aus Abbildung 18. ...	138
Tabelle 29 Densitometrische Bestimmung der Ausbeute (in %) an AnkX_{D265C}:PC:Rab1b-Komplex bei der Optimierung der binären Adduktbildung im direkten Ansatz aus Abbildung 33.	141
Tabelle 30 Densitometrische Bestimmung der Ausbeute (in %) an AnkX_{D265C}:PC:Rab1b-Komplex bei der Optimierung der ternären Komplexbildung im direkten Ansatz aus Abbildung 34.	141
Tabelle 31 Densitometrische Bestimmung der Ausbeute (in %) an AnkX_{G108C}:PC:Rab1b-Komplex bei der Optimierung der ternären Komplexbildung im indirekten Ansatz aus Abbildung 35.	141

Tabelle 32 Massenspektrometrische Analyse der Phosphocholinierung der Rab1b-Alaninvarianten aus Abbildung 38a.	142
Tabelle 33 Tryptophanfluoreszenz-basierte Bestimmung der k_{cat}/K_M-Werte der Rab1b-Alaninvarianten aus Abbildung 38b.	144

Abkürzungsverzeichnis

AaRS	Aminoacyl-tRNA-Synthetase
Ac ₄ ManNAz	N-Azidoacetylmannosamin
AnkX _{Cys}	AnkX-Cysteinvariante mit strategisch platziertem Cystein
AR	Ankyrin- <i>Repeat</i>
AS	Aminosäure
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
β-Me	β-Mercaptoethanol
bzw.	beziehungsweise
cAMP	zyklisches AMP (engl. <i>cyclic AMP</i>)
CbZ	Carboxybenzyl
CDP	Cytidindiphosphat
CMP	Cytidinmonophosphat
CoA	Coenzym A
CuAAC	Kupfer-katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DBCO	Dibenzocyclooctin
DIK	Differential-Interferenz-Kontrast
dNTPs	Deoxyribonukleotide
DTT	1,3-Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESI-MS	Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie
eYFP	gelb fluoreszierendes Protein (engl. <i>enhanced yellow fluorescent protein</i>)
FIC	Filamentation induziert durch cAMP (engl. <i>filamentation induced by cAMP</i>)
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
GAP	GTPase-aktivierendes Protein
GDI	GDP-Dissoziationsinhibitor
G-Domäne	Guaninnukleotid-Bindedomäne
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	Guaninnukleotid-Austauschfaktor (engl. <i>guanine nucleotide exchange factor</i>)
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor (engl. <i>G protein-coupled receptor</i>)
GppNHp	Guanosin-(β,γ)-imidotriphosphat

GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
Halo	Domäne der Haloalkan-Dehalogenase
HA	Hemagglutinin
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl. <i>high performance liquid chromatography</i>)
HRP	Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase (engl. <i>horseradish peroxidase</i>)
hY2R	humaner Neuropeptid Y2 Rezeptor
i. d. R.	in der Regel
IPTG	Isopropylthiogalactopyranosid
k	Geschwindigkeitskonstante
k_{cat}	katalytische Konstante
k_{cat}/K_M	katalytische Effizienz
k_{obs}	beobachtete Geschwindigkeitskonstante
LCV	Legionellen-enhaltende Vakuole (engl. <i>Legionella-containing vacuole</i>)
LpIA	Liponsäure-Ligase
<i>L. pneumophila</i>	<i>Legionella pneumophila</i>
NHS	N-Hydroxysuccinimid
MBP	Maltose-bindendes Protein
mRNA	Boten-RNA (engl. <i>messenger RNA</i>)
n. b.	nicht bestimmt
norm.	normalisiert
NRPS	nicht-ribosomale Peptid-Synthetase
PC	Phosphocholin
PCR	Polymerasenkettenreaktion (engl. <i>polymerase chain reaction</i>)
PCV	Pathogen-enhaltende Vakuole (engl. <i>pathogen-containing vacuole</i>)
PEG	Polyethylenglykol
PI(3)P	Phosphatidylinositol-3-phosphat
PI(4)P	Phosphatidylinositol-4-phosphat
Ppant	Phosphopantethein
PPTase	Phosphopantetheinyl-Transferase
PTM	Posttranslationale Modifikation
PyIRS	Pyrrolysyl-tRNA-Synthetase
rel.	relativ
RT	Raumtemperatur
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (engl. <i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>)

SLIC	sequenz- und ligationsunabhängige Klonierung (engl. <i>sequence and ligation independent cloning</i>)
Sfp	Surfactin-PPTase
SPAAC	ringspannungsinduzierte Azid-Alkin-Cycloaddition (engl. <i>strain-promoted azide-alkyne cycloaddition</i>)
SrtA	Sortase A
SUMO	kleiner Ubiquitin-verwandter Modifikator (engl. <i>small ubiquitin-related modifier</i>)
TBABr	Tetrabutylammoniumbromid
TCEP	Tris-(2-carboxyethyl)-phosphin
TCO	Trans-Cycloocten
THPTA	Tris(3-hydroxypropyltriazolylmethyl)amin
tRNA	Transfer-RNA
T4SS	Typ-IV Sekretionssystem
UAA	unnatürliche Aminosäure (engl. <i>unnatural amino acid</i>)
ü. N.	über Nacht
vgl.	vergleiche
v	Geschwindigkeit
Varp	<i>VPS9-ankyrin-repeat protein</i>
WT	Wildtyp
ZKÜ	Zellkulturüberstand

Proteinogene Aminosäuren (AS) sind entsprechend den Empfehlungen der *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) und der *International Union of Molecular Biology* (IUB) mit Drei- oder Einbuchstabencode abgekürzt.

Abstract

Upon infection, the intracellular pathogen *Legionella pneumophila* secretes more than 300 effector proteins into the host cytoplasm, thereby manipulating cellular transport. Among those effector proteins is the phosphocholine transferase AnkX, that utilizes cytidine diphosphate (CDP)-choline in order to site-specifically transfer a phosphocholine (PC)-moiety to the regulatory *switch II* region of Rab1 family members, a group of small GTPases regulating cellular transport. AnkX belongs to the family of FIC proteins, whose members utilize nucleotides in order to post-translationally modify their targets. Despite the large number of FIC proteins, only little is known about how these enzymes recognize and bind their protein substrates at the molecular level.

By using thiol-reactive CDP-choline derivatives the enzyme:protein complex between an AnkX cysteine variant and Rab1b was covalently stabilized. The crystal structure of the complex together with mutation-function analysis revealed that AnkX contacts Rab1b in a C-terminal region of its guanine nucleotide-binding (G) domain. So far, this region has not been reported in any other GTPase, to be involved in protein-protein interaction, thereby representing a novel binding platform of small GTPases. Furthermore, it was demonstrated that AnkX uses a thorn-like β -sheet in order to bind into a conserved hydrophobic cavity of Rab1b, thereby locally unfolding the regulatory *switch II* region of the small GTPase. Thus, the enzyme is able to phosphocholinate the active and inactive states of Rab1b.

AnkX may be exploited as a molecular tool for enzymatic protein labelling. For this purpose, proteins of interest are recombinantly fused with an octapeptide sequence derived from the *switch II* region of Rab1b. By applying synthetic CDP-choline derivatives, AnkX is able to site-specifically transfer molecular probes to a serine residue within the octapeptide sequence. In this work a series of biorthogonal CDP-choline analogues were synthesized and evaluated as co-substrates for AnkX-mediated phosphocholination, thereby demonstrating a broad spectrum of accepted CDP-choline derivatives. Especially, small biorthogonal moieties like azides or terminal alkynes may be transferred with catalytic efficiencies only one order of magnitude smaller than natural phosphocholination. Combination of the synthesized CDP-choline analogues together with the alternate use of the phosphocholine transferase AnkX and the *L. pneumophila* dephosphocholinase Lem3 allowed to develop a strategy in order to site-specifically modify proteins of interest with two distinct molecular probes.

This work provides rare structural insights into the mode of target binding by FIC proteins and provides the basis for exploiting enzymatic phosphocholination as a modular method for protein labelling.

Zusammenfassung

Das intrazelluläre Pathogen *Legionella pneumophila* sekretiert mehr als 300 Effektorproteine in das Cytosol seiner Wirtszelle und manipuliert dadurch zelluläre Transportprozesse zu seinen eigenen Gunsten. Eines dieser Effektorproteine ist die Phosphocholtransferase AnkX, die Cytidindiphosphat (CDP)-Cholin als Cosubstrat nutzt, um eine Phosphocholin (PC)-Gruppe ortsspezifisch in die regulatorische *Switch II*-Region von Transportproteinen der Rab1-Familie einzuführen. AnkX gehört zur Familie der FIC-Proteine, die ihre Zielproteine mit Hilfe von Nukleotiden posttranslational modifizieren. Obwohl zahlreiche Vertreter dieser Proteinfamilie existieren, ist bisher nur wenig darüber bekannt, wie FIC-Proteine ihre Substratproteine auf molekularer Ebene erkennen und binden.

Durch den Einsatz eines thiolreaktiven CDP-Cholin-Derivats konnte der Enzym-Protein-Komplex zwischen einer Cystein-Variante von AnkX und der kleinen GTPase Rab1b kovalent stabilisiert werden. Die Kristallstruktur des Komplexes sowie Mutations-Funktions-Analysen offenbarten, dass AnkX die kleine GTPase Rab1b in einem C-terminalen Bereich der Guaninnukleotid-Bindedomäne (G-Domäne) kontaktiert. Der kontaktierte Bereich ist bisher in keiner anderen GTPase für die Ausbildung von Protein-Protein-Interaktionen beschrieben und stellt somit eine neuartige Bindefläche kleiner GTPasen dar. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass AnkX mit einem dornähnlichen β -Faltblatt in eine konservierte und hydrophobe Tasche von Rab1b bindet und dadurch die regulatorische *Switch II*-Region der kleinen GTPase lokal entfaltet. Auf diese Weise kann das Enzym sowohl die aktive als auch die inaktive Form von Rab1b phosphocholinieren.

AnkX kann als molekulares Werkzeug für die enzymatische Proteinmarkierung eingesetzt werden, indem Zielproteine rekombinant mit einer Octapeptidsequenz aus dem *Switch II*-Bereich von Rab1b ausgestattet werden. Mit Hilfe funktionalisierter CDP-Cholin-Derivate können beliebige Sonden ortsspezifisch durch AnkX auf das Zielprotein übertragen werden. In der vorliegenden Arbeit wurden diverse bioorthogonale CDP-Cholin-Analoga synthetisiert und als Cosubstrate von AnkX evaluiert. Dabei konnte gezeigt werden, dass das Enzym ein breites Spektrum an CDP-Cholin-Derivaten akzeptiert. Kleine bioorthogonale Gruppen wie terminale Alkine oder Azide können mit einer katalytischen Effizienz übertragen werden, die lediglich eine Größeneinheit unter der katalytischen Effizienz der natürlichen Phosphocholinierung liegt. Mit Hilfe der hergestellten CDP-Cholin-Analoga konnte in Kombination mit dem abwechselnden Einsatz der Phosphocholtransferase AnkX und der Legionellen-Dephosphocholinase Lem3 eine Strategie entwickelt werden, um Zielproteine ortsspezifisch mit zwei unterschiedlichen Sonden auszustatten.

Die vorliegende Arbeit liefert seltene strukturelle Einblicke in die Substratbindung von FIC-Proteinen und bildet die Grundlage für die modulare Markierung von Proteinen durch enzymatische Phosphocholinierung.

1. Einleitung

1.1 Das intrazelluläre Pathogen *Legionella pneumophila*

Pathogene haben eine beachtliche Vielzahl an Strategien entwickelt, um während der Infektion zu überleben und sich zu vermehren. Während extrazelluläre Pathogene die äußere Plasmamembran von Wirtszellen besiedeln, treten intrazelluläre Pathogene in das Zellinnere ein, um sich dort ihren Lebensraum zu schaffen. Bei intrazellulären Pathogenen wird zwischen Erregern unterschieden, die passiv durch Phagozytose in Wirtszellen aufgenommen werden, und invasiven Erregern, die ihre Aufnahme selbst initiieren können. Intrazelluläre Pathogene befinden sich nach dem Eintritt in die Wirtszelle zunächst in einem membranumschlossenen Kompartiment, welches während der Aufnahme der Mikroorganismen in die Zelle durch Abschnürungen der Plasmamembran entsteht und im Folgenden als Pathogen-enhaltende Vakuole (engl. *pathogen-containing vacuole*, PCV) bezeichnet wird. Während sich manche intrazelluläre Krankheitserreger aus der PCV befreien und im Cytosol der Wirtszelle vermehren können, haben andere Pathogene Strategien entwickelt, um sich in dieser Vakuole einen dauerhaften Lebensraum zu schaffen. Um in der PCV überleben zu können, müssen intrazelluläre Pathogene verhindern, dass die Vakuole dem lysosomalen Abbau zugeführt wird, und gleichzeitig sicherstellen, dass die PCV ausreichend Platz und Nährstoffe für die eigene Vermehrung bietet. Dies bewerkstelligen intrazelluläre Pathogene oftmals, indem sie mit einem sekretorischen Organell der Wirtszelle assoziieren und dessen sekretorische Vesikel abfangen und an die PCV weiterleiten.¹

Legionella pneumophila, der Auslöser der Legionärskrankheit, ist ein intrazelluläres Pathogen, dessen natürlicher Wirt Protozoen sind.² Durch das Einatmen kontaminierter Aerosole können sich jedoch auch Menschen mit Legionellen infizieren, wobei diese von Makrophagen der Lunge phagozytotisch aufgenommen werden.³ Unbehandelt kann die mit der Legionärskrankheit verbundene Entzündung der Lunge (Pneumonie) vor allem für Menschen mit geschwächtem Immunsystem lebensgefährlich verlaufen. Nach der Aufnahme der Legionellen ins Zellinnere sind die alveolaren Makrophagen nicht in der Lage, die Legionellen-enhaltende Vakuole (engl. *Legionella-containing vacuole*, LCV) mit endocytotischen oder lysosomalen Kompartimenten zu fusionieren und auf diesem Weg zu degradieren.⁴ Stattdessen gestalten die Legionellen die LCV um, so dass sie ihnen ein geschütztes und nährstoffreiches Kompartiment für die eigene Vermehrung bietet. Die Verhinderung des lysosomalen Abbaus sowie die Umgestaltung der Vakuole sind dabei abhängig von einem Typ-IV Sekretionssystem (T4SS), über welches die Legionellen mehr als 300 Effektorproteine in das Cytosol der Wirtszelle injizieren.⁵⁻⁷ In der Folge fängt die LCV sekretorische Vesikel des Endoplasmatischen Retikulums (ER) ab, die für den Transport zum Golgi-Apparat bestimmt wären und verwandelt sich dadurch allmählich selbst in ein ER-ähnliches Kompartiment.⁸⁻¹⁰

Die Art der vesikulären Transportproteine, mit der eine PCV dekoriert ist, liefert oftmals Aufschluss darüber, in welchen vesikulären Transportweg das Pathogen eingreift, um sich eine geschützte Nische zu schaffen.¹¹ So ist auf der LCV hauptsächlich das vesikuläre Transportprotein Rab1 anzutreffen, welches für die Regulation des Vesikeltransports zwischen ER und Golgi-Apparat zuständig ist.^{12,13}

1.2 Das vesikuläre Transportprotein Rab1

1.2.1 Rab-Proteine als molekulare Schalter der Zelle

Rab-Proteine gehören zur Familie der kleinen GTPasen und spielen eine wesentliche Rolle bei der Regulation des Membranverkehrs. Bei Menschen sind über 60 Rab-Proteine bekannt, die sich hinsichtlich ihrer subzellulären Lokalisation und ihrer Aufgabe für den vesikulären Transport unterscheiden. Rab-Proteine verhalten sich dabei wie molekulare Schalter, die zwischen einem aktiven und einem inaktiven Zustand wechseln (Abbildung 1). Der Aktivitätszustand der Rab-Proteine hängt dabei von der Art des Guaninnukleotids ab, welches die kleinen GTPasen gebunden haben. Während Rab-Proteine im Guanosindiphosphat (GDP)-gebundenen Zustand inaktiv sind, versetzt die Bindung von Guanosintriphosphat (GTP) die kleinen GTPasen in den aktiven Zustand. Da Rab-Proteine sowohl für GDP als auch für GTP eine sehr hohe Affinität besitzen, aber GTP intrinsisch nur sehr langsam hydrolysieren, wird der Beladungszustand der kleinen GTPasen durch die Aktivität von spezifischen Enzymen gesteuert: Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (engl. *guanine nucleotide exchange factors*, GEFs) aktivieren Rab-Proteine, indem sie den Austausch von GDP zu GTP beschleunigen. GTPase-aktivierende Proteine (GAPs) stimulieren die intrinsische Hydrolyseaktivität der kleinen GTPasen und bewirken damit die Spaltung von GTP zu GDP. Dies führt in der Folge zur Inaktivierung der Rab-Proteine.¹⁴

Die Membranbindung von Rab-Proteinen erfolgt über Geranylgeranyl-Lipideinheiten, die posttranslational am C-Terminus der kleinen GTPasen angebracht werden.¹⁵ Rab-Proteine, die sich im Cytosol befinden, liegen stets im Komplex mit dem GDP-Dissoziationsinhibitor (GDI) vor. GDI besitzt eine starke Präferenz für GDP-gebundene (inaktive) Rab-Proteine und kann diese aus Membranen extrahieren und in Lösung halten, indem die hydrophobe Geranylgeranyl-Einheit der kleinen GTPase tief in GDI vergraben wird.^{16,17} Ein lösliches an GDI-gebundenes Rab-Protein kann unterschiedliche Membranen der Zelle ansteuern. Erst wenn das inaktive Rab-Protein auf eine Membran trifft, die einen spezifischen GEF für die kleine GTPase besitzt, kann GDI durch den Nukleotidaustausch von GDP zu GTP freigesetzt werden. Das nun aktive Rab-Protein wird in der Folge stabil in der Membran verankert.¹⁸ Dort verankert, rekrutieren die aktiven kleinen GTPasen Rab-Effektorproteine, wie zum Beispiel Motorproteine, und steuern dadurch den vesikulären Transport. Bei den rekrutierten Effektorproteinen kann es sich ebenfalls um GAPs handeln, die die kleine GTPase wieder

inaktivieren oder GEFs, die notwendig sind, um andere Rab-Proteine zu aktivieren.¹⁹ Die Richtung des vesikulären Transports und das Zielkompartiment eines bestimmten Rab-Proteins werden somit sowohl durch die intrinsischen Eigenschaften der kleinen GTPase als auch durch die Verteilung der GAPs und GEFs auf den einzelnen Kompartimenten der Zelle bestimmt.

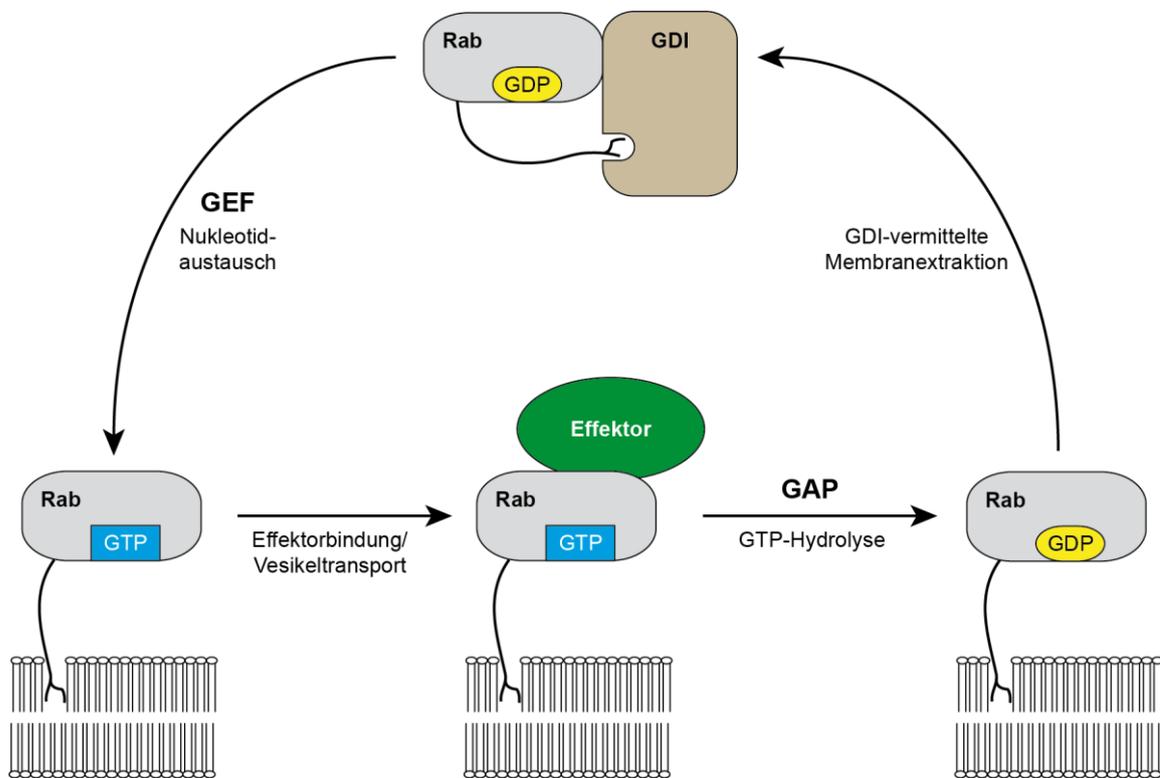


Abbildung 1 Regulation von Rab Proteinen und vesikulärer Transport. Der Aktivitätszustand von Rab-Proteinen wird durch die Art des gebundenen Guanin-Nukleotids bestimmt. Im inaktiven GDP-gebundenen Zustand liegen cytosolische Rab Proteine gebunden an GDI vor. Trifft ein inaktives Rab-Protein auf seine Ziellmembran, katalysiert ein spezifischer GEF den Nukleotidaustausch von GDP zu GTP, wodurch die kleine GTPase aktiviert wird. Der Nukleotidaustausch von GDP zu GTP führt zur Dissoziation von GDI und zur Membranverankerung des Rab-Proteins über eine C-terminale Geranylgeranyl-Einheit. Im aktiven GTP-gebundenen Zustand interagieren Rab-Proteine mit Effektoren und regulieren unterschiedliche Schritte des vesikulären Transports. Anschließend stimuliert ein spezifisches GAP die Hydrolyse von GTP zu GDP, wodurch die kleine GTPase wieder inaktiviert wird. Das inaktive Rab-Protein wird durch GDI ins Cytosol extrahiert und steht somit für eine neue Runde des vesikulären Transports zur Verfügung.

1.2.2 Strukturelle Grundlagen von Rab-Proteinen

Rab-Proteine besitzen eine konservierte globuläre Guaninnukleotid-Bindedomäne (G-Domäne), die aus sechs β -Strängen ($\beta 1$ - $\beta 6$) und fünf ringsum angeordneten α -Helices ($\alpha 1$ - $\alpha 5$) besteht (Abbildung 2).²⁰ Strukturelle Unterschiede zwischen der GDP- und GTP-gebundenen Form von Rab-Proteinen lassen sich vor allem in zwei Schleifenregionen beobachten, die als *Switch I* und *Switch II* bezeichnet werden. Im aktiven Zustand werden benachbarte Bereiche der beiden *Switch*-Regionen durch das γ -Phosphat von GTP stabilisiert und sind somit in ihrer konformationellen Flexibilität eingeschränkt (Abbildung 2a). Bei der

Hydrolyse von GTP zu GDP führt der Verlust des γ -Phosphats zum Zusammenbruch der konformationellen Ordnung der *Switch*-Regionen, wodurch diese eine deutlich höhere konformationelle Flexibilität erlangen (Abbildung 2b).²¹

Durch die ausgeprägten strukturellen Unterschiede zwischen aktivem und inaktivem Zustand können Rab-Proteine in Abhängigkeit ihrer Nukleotidbeladung spezifisch von Bindungspartnern erkannt werden. Das Ausmaß der strukturellen Änderung, das mit dem Wechsel zwischen GDP- und GTP-Zustand verbunden ist, kann dabei zwischen einzelnen Rab-Proteinen variieren. Die meisten Interaktionspartner interagieren mit den kleinen GTPasen über eine ähnliche Interaktionsfläche, die von *Switch I* und *Switch II* sowie dem *Interswitch* (Sequenz zwischen *Switch I* und *Switch II*) ausgebildet wird.²² Diese typische Interaktionsfläche stellt einen Bereich in Rab-Proteinen dar, in dem die Aminosäuresequenz der kleinen GTPasen hoch konserviert ist und gleichzeitig die strukturellen Unterschiede zwischen aktiver und inaktiver Form am stärksten ausgeprägt sind. Da die typische Interaktionsfläche in allen Rab-Proteinen hoch konservierte Aminosäuren aufweist, existieren Bindepartner wie zum Beispiel GDI, die von allen Rab-Proteinen gleichermaßen erkannt werden.¹⁶ Gleichzeitig ermöglichen Sequenzunterschiede in den nicht-konservierten Bereichen der typischen Interaktionsfläche und strukturelle Unterschiede in Abhängigkeit des Nukleotidzustands, dass Rab-Proteine hoch spezifisch mit bestimmten Effektoren und regulatorischen Proteinen (GEFs und GAPs) interagieren.

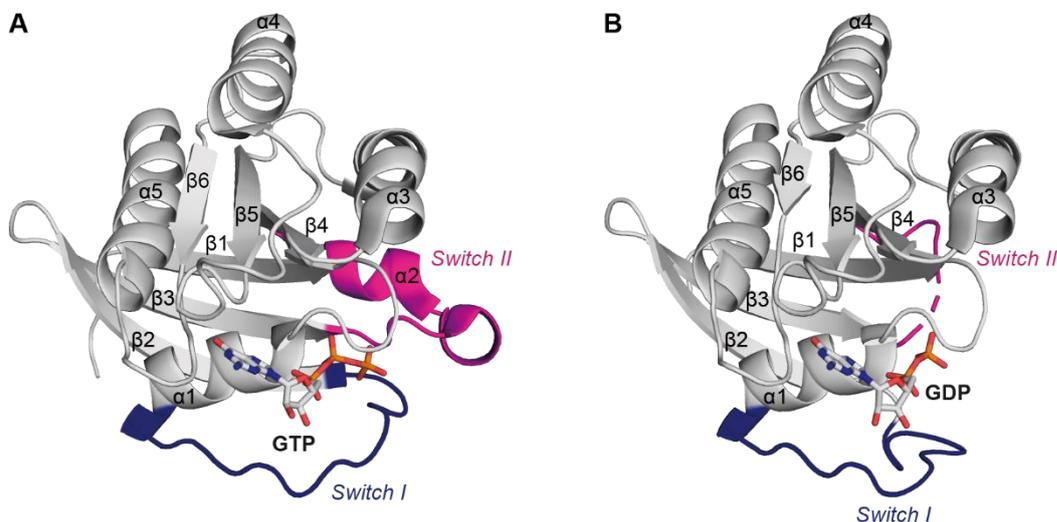


Abbildung 2 Strukturelle Grundlagen von Rab-Proteinen am Beispiel von Rab1a. **(A)** Kristallstruktur von Rab1a im aktiven GTP-gebundenen Zustand (PDB-Eintrag: 3TKL)²³. Die konservierte G-Domäne von Rab besteht aus sechs β -Strängen ($\beta 1$ - $\beta 6$) und fünf ringsum angeordneten α -Helices ($\alpha 1$ - $\alpha 5$). Im GTP-gebundenen Zustand werden benachbarte Bereiche von *Switch I* und *Switch II* durch das γ -Phosphat von GTP koordiniert und stabilisiert. Die strukturelle Flexibilität von *Switch I* und *Switch II* ist eingeschränkt. **(B)** Kristallstruktur von Rab1a im inaktiven GDP-gebundenen Zustand (PDB-Eintrag: 2FOL). Die im GTP-gebundenen Zustand koordinierten Bereiche von *Switch I* und *Switch II*, können im GDP-Zustand nicht mehr durch das Guaninnukleotid stabilisiert werden. *Switch I* und *Switch II* besitzen hohe strukturelle Flexibilität.

1.2.3 Posttranslationale Modifikationen von Rab1

Die kleine GTPase Rab1 reguliert den vesikulären Transport zwischen ER und Golgi. Durch die T4SS-abhängige Sekretion von Effektorproteinen in das Cytosol der Wirtszelle kann *L. pneumophila* diesen Transportweg manipulieren, so dass die LCV bereits eine Stunde nach der Legionelleninfektion mit Rab1 dekoriert ist.²⁴ Die von *L. pneumophila* sekretierten Effektorproteine bewirken die Rekrutierung von Rab1 an die LCV unter anderem dadurch, dass sie posttranslationale Modifikationen (PTMs) in die kleine GTPase einfügen. Die eingeführten PTMs können sich unmittelbar auf den Nukleotidzustand und die Aktivität von Rab1 auswirken.

Die initiale Rekrutierung von Rab1 an die LCV erfolgt über das Effektorprotein DrrA, bei dem es sich um einen bakteriellen GEF handelt.^{25,26} Nach der Translokation ins Cytoplasma wird DrrA über eine Phosphatidylinositol-4-phosphat (PI(4)P)-Bindedomäne auf der cytosolischen Seite der LCV-Membran verankert.²⁷ Über die GEF-Domäne, welche eine sehr hohe Affinität für Rab1 im inaktiven GDP-Zustand besitzt, kann das Nukleotid der kleinen GTPase von GDP zu GTP ausgetauscht werden.²⁸ In der Folge wird GDI freigesetzt und das GTP-beladene aktive Rab1 in der Membran der LCV verankert. Auf diese Weise wird der frühe sekretorische Transport vom ER an die LCV umgeleitet. Aktives Rab1 kann dauerhaft auf der LCV zurückgehalten werden, indem bakterielle Effektoren die regulatorische *Switch II*-Region der kleinen GTPase posttranslational modifizieren. DrrA besitzt zusätzlich zur zentralen GEF-Domäne eine N-terminale Nukleotidyltransferase-Domäne, über die eine Adenosinmonophosphat (AMP)-Einheit ausgehend von Adenosintriphosphat (ATP) auf ein Tyrosin innerhalb der *Switch II*-Region von Rab1 übertragen werden kann (Y80 in Rab1a bzw. Y77 in Rab1b).²⁹

Unabhängig von der AMPylierung kann das Effektorprotein AnkX eine PC-Einheit auf die benachbarte Aminosäure des Tyrosins übertragen (S79 in Rab1a bzw. S76 in Rab1b). Während der Legionelleninfektion wird Rab1 entweder mit AMP oder PC modifiziert, jedoch nicht mit beiden PTMs gleichzeitig.³⁰ Die AMP-Modifikation führt dazu, dass die Affinität von Rab1 zu GAPs abnimmt und die kleine GTPase somit dauerhaft im aktiven GTP-gebundenen Zustand bleibt.²⁹ Die PC-Modifikation bewirkt, dass der Nukleotidaustausch durch GEFs und die Membranextraktion durch GDI inhibiert werden. Auf diese Weise entsteht eine pathologische Situation, in der inaktives GDP-gebundenes Rab1 stabil in der Membran der LCV zurückgehalten wird.³¹

Interessanterweise sekretiert *L. pneumophila* auch bakterielle Proteine, die in der Lage sind, die eingeführten PTMs von Rab1 wieder abzuspalten. Während der bakterielle Effektor SidD die AMP-Einheit entfernt, besitzt Lem3 die Fähigkeit, die PC-Gruppe hydrolytisch abzuspalten.^{31,32} Zu einem späteren Zeitpunkt der Legionelleninfektion kann auch der bakterielle Effektor LepB, bei dem es sich um ein Rab1-spezifisches GAP handelt, an der LCV

angetroffen werden.³³ Bisher ist jedoch unklar, aus welchen Gründen *L. pneumophila* zu einem späteren Zeitpunkt der Infektion die eingeführten PTMs wieder rückgängig macht. Das zeitlich versetzte Auftreten der einzelnen Effektoren scheint auf jeden Fall eine wichtige Rolle für die Kontrolle der Rab1-Dynamik auf der LCV zu spielen.

1.3 Die Phosphocholintransferase AnkX

Während der Legionelleninfektion modifiziert der bakterielle Effektor AnkX die kleine GTPase Rab1 ortsspezifisch mit einer PC-Gruppe. Dabei stellen die Isoformen Rab1a und Rab1b Substratproteine für die AnkX-vermittelte Modifizierung dar. *In vitro* konnte zudem die AnkX-katalysierte Phosphocholinierung von Rab35 beobachtet werden.³¹ Die Aminosäuresequenz von Rab35 ist den Sequenzen von Rab1a und Rab1b sehr ähnlich. Deswegen wurde Rab35 ursprünglich ebenfalls zur Rab1-Familie gezählt und als Rab1c bezeichnet. Diese Isoform ist jedoch nicht wie Rab1a und Rab1b am sekretorischen Transport zwischen ER und Golgi-Apparat beteiligt, sondern reguliert endocytotische Transportwege.³⁴ Um diesen funktionellen Unterschied zu verdeutlichen, hat sich die Bezeichnung Rab35 an Stelle von Rab1c durchgesetzt. Da im Rahmen der Legionelleninfektion Rab35-PC bisher nicht nachgewiesen werden konnte und da Rab35 im Gegensatz zu Rab1a und Rab1b nicht an die LCV rekrutiert wird, ist fraglich, ob Rab35 während der Legionelleninfektion tatsächlich durch AnkX phosphocholinisiert wird. Sollte dies der Fall sein, würde AnkX sowohl in den sekretorischen als auch in den endocytotischen Transportweg der Zelle eingreifen. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass AnkX während der Legionelleninfektion tatsächlich den endocytotischen Transport von Makrophagen inhibiert, jedoch konnte nicht zweifelsfrei nachgewiesen werden, dass diese Inhibition durch die Phosphocholinierung von Rab35 vermittelt wird.³⁵ Interessanterweise besitzt AnkX auch die Fähigkeit, sich an mehreren AS-Positionen selbst zu phosphocholinieren.³⁶ Die physiologische Bedeutung dieser Automodifikation ist bisher jedoch nicht bekannt.

AnkX besitzt insgesamt 949 Aminosäuren und kann in zwei funktionelle Domänen unterteilt werden. Während im N-terminalen Bereich (AS 1-350) eine katalytische FIC (*filamentation induced by cyclic AMP*)-Domäne lokalisiert ist, befindet sich im C-terminalen Bereich (AS 351-949) eine Domäne mit mehreren Wiederholungen des Ankyrin Motivs (engl. *Ankyrin-Repeats*).^{30,37} Die Kristallstruktur von AnkX₁₋₄₈₄ zeigt, dass die vier N-terminalen Ankyrin-*Repeats* (AR 1-4) die katalytische FIC-Domäne strukturell stabilisieren (Abbildung 3).³⁸ Die Funktion der weiteren (vorhergesagten) Ankyrin-*Repeats* ist bisher nicht bekannt. Allgemein sind Ankyrin-*Repeats* jedoch häufig in Protein-Protein-Interaktionen involviert.³⁹ Da ein AnkX-Konstrukt, bei dem C-terminale Ankyrin-*Repeats* deletiert wurden (AnkX₁₋₆₈₇), Rab1b deutlich langsamer phosphocholinisiert als der AnkX-Wildtyp (AnkX_{WT}), ist denkbar, dass die C-terminalen Ankyrin-*Repeats* an der Bindung des Substratproteins beteiligt sind.³⁶

Während klassische FIC-Proteine ein Nukleosidtriphosphat binden (i. d. R. ATP) und ein Nukleosidmonophosphat auf das Substratprotein übertragen (i. d. R. AMP), bindet AnkX das Nukleotid CDP-Cholin und überträgt eine PC-Gruppe. Dieser Sonderfall entsteht, da AnkX im Vergleich zu anderen FIC-Proteinen das Cosubstrat CDP-Cholin um 180° invertiert bindet. Das FIC-Motiv von AnkX, welches das katalytische H229_{AnkX} trägt, hat jedoch dieselbe Konformation wie in anderen bekannten FIC-Proteinen. Eine weitere strukturelle Besonderheit von AnkX ist, dass die konservierte β -Haarnadelschleife durch eine zusätzliche Domäne unterbrochen wird. Diese zusätzliche Domäne, die auch als Insertionsdomäne bezeichnet wird, verdeckt dabei die konservierte β -Haarnadelschleife, welche in anderen FIC-Proteinen an der Bindung des Substratproteins beteiligt ist. Da die konservierte β -Haarnadelschleife von AnkX nicht für die Substratbindung zugänglich ist, wird angenommen, dass die Bindung von Rab1 anders als bei klassischen FIC-Proteinen abläuft.^{38,40}

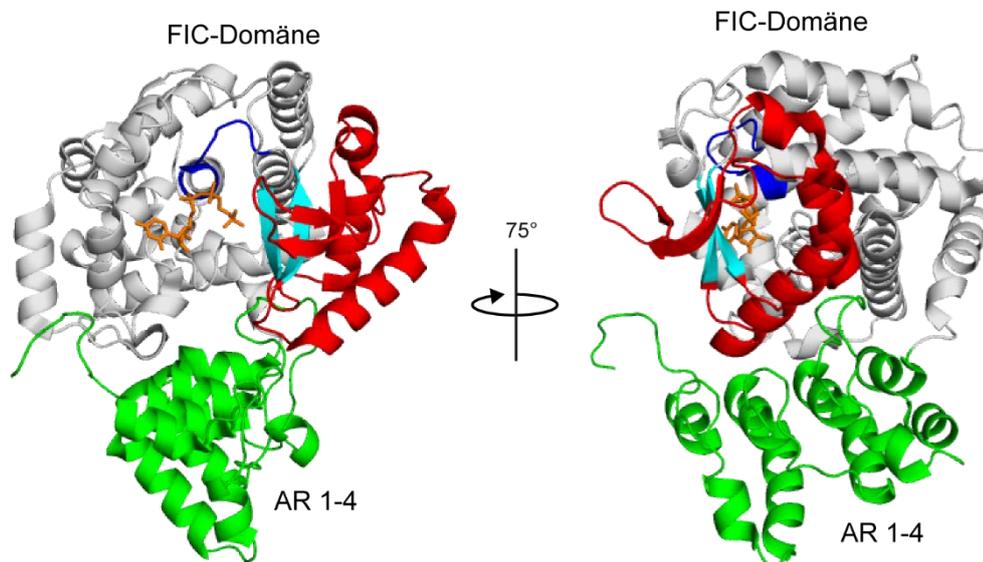


Abbildung 3 Strukturelle Grundlagen von AnkX. Die Kristallstruktur von AnkX₁₋₄₈₄ (PDB-Eintrag: 4BET)³⁸ ist im Bändermodell dargestellt und zeigt die ersten 484 der insgesamt 949 Aminosäuren von AnkX. Die ersten 484 Aminosäuren enthalten die FIC-Domäne (AS 1-350, grau) sowie vier Ankyrin-Repeats (AR 1-4, AS 351-484, grün). Die FIC-Domäne wird durch zahlreiche intramolekulare Kontakte zu den AR 1-4 strukturell stabilisiert und enthält das katalytische FIC-Motiv HPFRDANGR (Konsensussequenz: HPFX[D/E]GN[G/K]R, blau) sowie eine konservierte β -Haarnadelschleife (türkis). Die konservierte β -Haarnadelschleife, die in anderen FIC-Proteinen an der Bindung des Substratproteins beteiligt ist, wird in AnkX durch eine zusätzliche Insertionsdomäne (rot) unterbrochen. Die β -Haarnadelschleife wird dabei von der Insertionsdomäne verdeckt, so dass sie für die Bindung des Substratproteins unzugänglich ist. CDP-Cholin (orange) ist im Stabmodell dargestellt.

Die AnkX-vermittelte Phosphocholinierung wurde zudem von Heller et al. als molekulares Werkzeug für die enzymatische Markierung von Proteinen vorgeschlagen.⁴¹ In den folgenden Kapiteln werden zunächst die Grundlagen sowie unterschiedliche Methoden der Proteinmarkierung vorgestellt, bevor näher auf den Einsatz von AnkX für die enzymatische Proteinmarkierung eingegangen wird.

1.4 Markierung von Proteinen

Proteine gehören neben Kohlenhydraten, Lipiden und Nukleinsäuren zur Gruppe der biologischen Makromoleküle und sind an einer Vielzahl an biochemischen und zellulären Prozessen beteiligt. Dabei spielen Proteine unter anderem wichtige Rollen bei der enzymatischen Katalyse biochemischer Reaktionen, der Weiterleitung biologischer Signale, der Immunabwehr gegen Mikroorganismen sowie der Ausbildung struktureller oder mechanischer Einheiten. Aufgrund der essenziellen Aufgaben bei zellulären Prozessen sind die Fehlfaltung und der daraus resultierende Funktionsverlust von Proteinen oftmals mit der Entstehung von Krankheiten verknüpft. Da bei einer Vielzahl an physiologischen und pathologischen Prozessen die genaue Rolle bestimmter Proteine bisher weitgehend ungeklärt ist, ist die Entwicklung von Methoden notwendig, die die Untersuchung von Proteinen in deren komplexer zellulärer Umgebung erlauben. Solche Methoden sind oftmals darauf ausgelegt, ein bestimmtes Zielprotein so zu modifizieren, dass es sich von anderen zellulären Proteinen unterscheidet und somit gezielt studiert werden kann.

Ein klassisches Beispiel ist die rekombinante Fusion eines Zielproteins mit dem aus der Qualle *Aequoria victoria* stammenden grün fluoreszierenden Protein (GFP), um die Expression und Lokalisation des Zielproteins *in vivo* zu untersuchen.⁴² Die zusätzliche Anbringung des 27 kDa großen GFP kann jedoch in einigen Fällen die Funktion oder zelluläre Lokalisation des Zielproteins beeinträchtigen. Daher werden zunehmend Methoden entwickelt, die auf die ortsspezifische Anbringung kleiner synthetischer Sonden abzielen, um möglichst gering in die native Struktur des Zielproteins einzugreifen. Neben *in vivo* Lokalisationsstudien ermöglicht die ortsspezifische Markierung von Proteinen außerdem ein breites Spektrum an *in vitro* Studien, wie zum Beispiel die biophysikalische Analyse von Faltungsvorgängen, die Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen oder die Charakterisierung natürlich vorkommender PTMs.⁴³⁻⁴⁶ Neben der biochemischen und biophysikalischen Grundlagenforschung wird die ortsspezifische Markierung von Proteinen auch zunehmend in angewandten Bereichen der Medizin und Biotechnologie eingesetzt. So werden zum Beispiel Kontrastmittel oder cytotoxische Wirkstoffe an Antikörper fusioniert, um eine effizientere Diagnose und Behandlung von Krebserkrankungen zu ermöglichen.^{47,48} Des Weiteren werden Proteine einheitlich orientiert auf Oberflächen immobilisiert, um Biosensoren, wiederverwendbare Katalysatoren oder *Microarrays* zu generieren.⁴⁹⁻⁵¹

Die unterschiedlichen Methoden, die in diesem Zusammenhang Anwendung finden, müssen einige grundlegende Voraussetzungen erfüllen, um für die Modifizierung von Zielproteinen geeignet zu sein: Die Modifikation sollte ausschließlich am Zielprotein angebracht werden, an allen anderen Proteinen jedoch nicht. Der Einbau der Modifikation sollte ortsspezifisch an einer bestimmten Position des Zielproteins erfolgen. Die eingeführte Modifikation sollte zudem möglichst klein und sterisch wenig anspruchsvoll sein. Des Weiteren sollte die Modifizierung

unter physiologischen Bedingungen möglichst schnell und möglichst vollständig ablaufen. Die Methode sollte eine Bindung zwischen Zielprotein und Sonde herstellen, die einerseits stabil ist und andererseits nach Möglichkeit wieder reversibel aufgelöst werden kann. Außerdem sollte die Methode den Einbau einer Vielzahl an unterschiedlichen Sonden erlauben, wobei die Sonden mit einem möglichst geringen Syntheseaufwand verbunden sein sollten. Die Methode sollte ferner für die Markierung von Proteinen *in vitro* in komplexen Proteinproben sowie *in vivo* auf der Zelloberfläche, innerhalb von Zellen und in lebenden Organismen geeignet sein. Für Anwendungen *in vivo* müssen die Sonden zellpermeabel sein und dürfen nicht zelltoxisch sein. Aufgrund dieser Vielzahl an Anforderungen existiert bisher keine universelle Methode zur Markierung von Proteinen, die alle diese Voraussetzungen erfüllt. Abhängig von der geplanten Anwendung müssen Vor- und Nachteile unterschiedlicher Methoden abgewogen und die optimale Methode für den beabsichtigten Zweck identifiziert werden.⁵²

Neben der klassischen rekombinanten Fusion von Zielproteinen mit Proteinen, Proteindomänen oder Peptidsequenzen, die eine bestimmte Funktion vermitteln, wurden bereits früh Methoden entwickelt, um bestimmte Seitenketten von Proteinen gezielt zu modifizieren. Besonders geeignet hierfür erweist sich die Thiolgruppe von Cysteinen, die durch Disulfide, Maleimide, Acetamide, sowie photoinduzierbar durch Alkene und Alkine adressiert werden kann.⁵³⁻⁵⁵ Ebenso lässt sich die primäre Aminogruppe von Lysinen gezielt mit N-Hydroxysuccinimid (NHS)-Ethern oder Isothiocyanaten modifizieren.^{56,57} Kürzlich wurden zudem photokatalytische Strategien und Redoxreaktionen für die Modifizierung der Seitenketten von Tryptophan und Methionin ausgearbeitet.^{58,59} Der entscheidende Nachteil bei der Markierung von Proteinseitenketten liegt jedoch darin, dass die adressierte Seitenkette im Zielprotein meist mehrmals vorhanden ist und die gewünschte Modifikation somit nicht ortsspezifisch an einer gewünschten Position eingeführt werden kann. Stattdessen werden Zielproteine in Abhängigkeit von der Anzahl und Position der adressierten Seitenkette mehrfach modifiziert.

Im Folgenden wird daher eine Auswahl an bioorthogonalen, biosynthetischen und enzymatischen Markierungsmethoden vorgestellt, die allesamt eine ortsspezifische Markierung von Zielproteinen ermöglichen. Während chemische Reaktionen unter anderem anhand ihrer Geschwindigkeitskonstante k miteinander verglichen werden, wird die Effizienz enzymatischer Reaktionen anhand des k_{cat}/K_M -Werts eingeordnet. Die katalytische Konstante k_{cat} eines Enzyms gibt an, wie viele Substratmoleküle bei vollständiger Sättigung des Enzyms pro Zeiteinheit umgesetzt werden. Die Michaelis-Menten-Konstante K_M ist definiert als die Substratkonzentration bei halbmaximaler Reaktionsgeschwindigkeit und gibt Auskunft über die Affinität zwischen Enzym und Substrat. Je kleiner K_M dabei ist, desto höher ist die Affinität

zwischen Enzym und Substrat. Ein hoher k_{cat}/K_M -Wert deutet folglich auf ein katalytisch effizientes Enzym hin.

1.5 Bioorthogonale Proteinmarkierung

Bei bioorthogonalen Reaktionen handelt es sich um Reaktionen zwischen zwei unterschiedlichen Funktionalitäten, die spezifisch miteinander reagieren, ohne dabei mit den vielfältigen funktionellen Gruppen in biologischen Systemen zu kreuzreagieren. Idealerweise sollten bioorthogonale Gruppen und ihre Reaktionsprodukte unter physiologischen Bedingungen stabil und nicht zelltoxisch sein. Für die Anwendung von bioorthogonalen Reaktionen in biologischen Systemen ist es außerdem von Vorteil, wenn die Reaktionen möglichst schnell bei gleichzeitig geringer Konzentration ablaufen. Um ein Zielprotein durch eine bioorthogonale Reaktion markieren zu können, muss zunächst eine bioorthogonale Funktionalität ortsspezifisch in das Zielprotein eingeführt werden. Dies kann entweder durch den biosynthetischen Einbau einer unnatürlichen Aminosäure oder durch den enzymatischen Einbau eines modifizierten Cosubstrats erfolgen (Abbildung 4). Anschließend kann die eingeführte Funktionalität über einen komplementären Reaktionspartner adressiert und markiert werden. Im Folgenden wird eine Reihe an bioorthogonalen funktionellen Gruppen vorgestellt, die für die Markierung von Proteinen verwendet werden können. Dabei gilt zu beachten, dass es für die meisten Anwendungen nicht entscheidend ist, welche der beiden komplementären Gruppen am Zielprotein und welche an der Sonde angebracht ist. In den folgenden Abbildungen wird daher immer nur einer der beiden Fälle dargestellt. Die Anbringung der komplementären Gruppen an Protein und Sonde ist prinzipiell jedoch auch in umgekehrter Weise möglich.

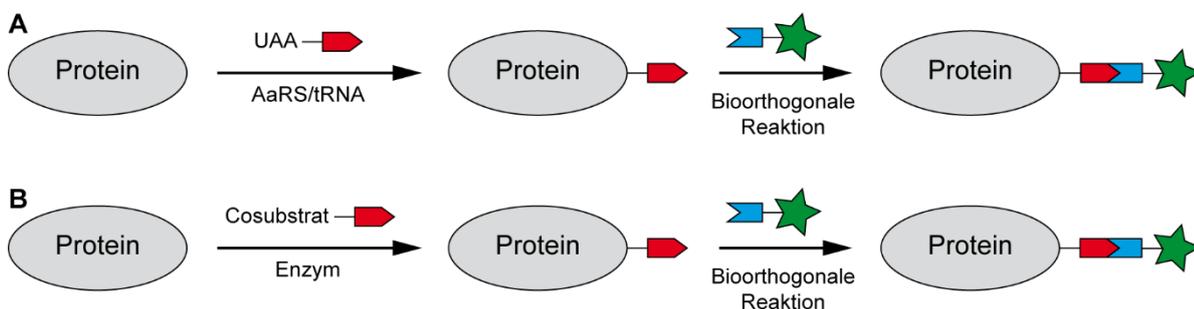


Abbildung 4 Markierung von Proteinen durch bioorthogonale Reaktionen. Die Einführung einer bioorthogonalen Funktionalität (rot) in das Zielprotein erfolgt **(A)** durch den Einbau einer unnatürlichen Aminosäure (UAA) mit Hilfe eines geeigneten Aminoacyl-tRNA-Synthetase (AaRS)/tRNA-Paares oder **(B)** durch die enzymatische Modifizierung mit einem synthetischen Cosubstrat. Anschließend wird die eingeführte Funktionalität über eine komplementäre bioorthogonale Gruppe (blau) adressiert und dadurch das Zielprotein mit einer Sonde (grün) markiert.

1.5.1 Carbonyl-basierte Proteinmarkierung

Aldehyde und Ketone wurden als eine der ersten Funktionalitäten für die Markierung von Proteinen eingesetzt, da ihre Carbonylgruppe mit starken Nucleophilen, wie Hydrazinen oder Alkoxyaminen, unter Bildung von Hydrazonen bzw. Oximen reagieren kann (Abbildung 5a, b).^{60,61} Diese Kondensationsreaktionen bevorzugen jedoch leicht saure Bedingungen und laufen daher unter physiologischen Bedingungen nur sehr langsam ab ($k \sim 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$).⁶² Da die ausgebildete C=N-Bindung hydrolyseanfällig ist, wurden Strategien entwickelt, die bei der Kondensation der Carbonylgruppe eine stabile C-C-Bindung statt der C=N-Bindung entstehen lassen. Ein Beispiel hierfür ist die Pictet-Spengler-Ligation mit Hydrazin-funktionalisierten Indolen (Abbildung 5c).⁶³ Es muss jedoch erwähnt werden, dass sich Carbonyl-vermittelte Proteinmarkierungen hauptsächlich für *in vitro* Reaktionen und Markierungen auf der Oberfläche von Zellen eignen, da im Inneren von Zellen ebenfalls Carbonyl-haltige Verbindungen vorkommen, die mit den gewünschten Kondensationsreaktionen interferieren würden.^{64,65} Carbonyl-basierte Reaktionen werden oftmals bei der Herstellung von Antikörper-Wirkstoff-Konjugaten eingesetzt.^{66,67}

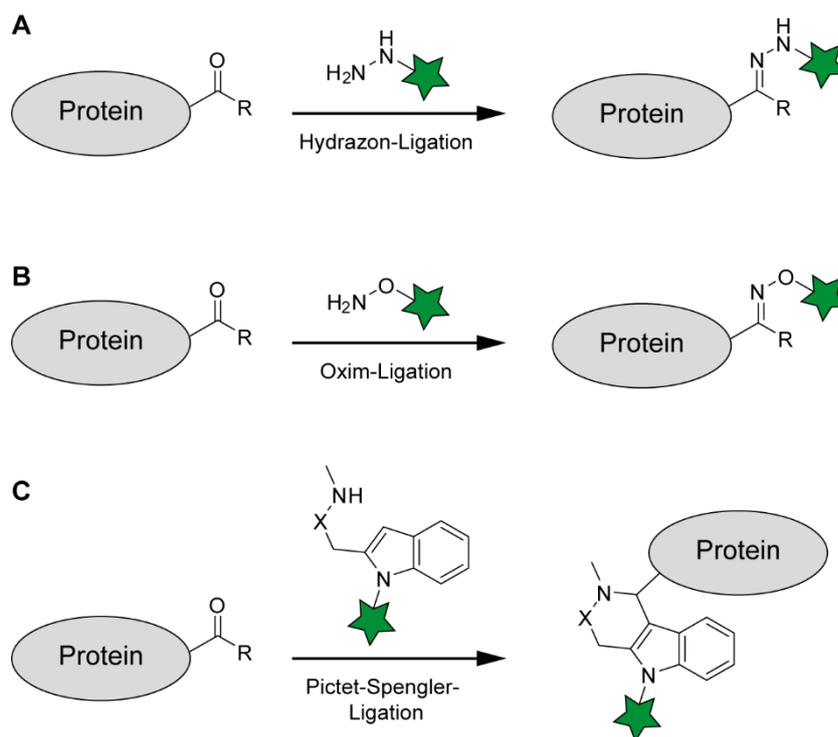


Abbildung 5 Carbonyl-basierte bioorthogonale Reaktionen zur Markierung von Proteinen. Die im Zielprotein eingeführte Carbonylgruppe reagiert mit **(A)** einem Hydrazin unter Ausbildung eines Hydrazons, **(B)** einem Alkoxyamin unter Ausbildung eines Oxims oder **(C)** einem Hydrazin-funktionalisierten Indol. Dabei wird eine Sonde (grün) auf das Zielprotein übertragen.

1.5.2 Azid-basierte Proteinmarkierung

Die Azidgruppe ist vollständig bioorthogonal, da sie in biologischen Systemen nicht vorkommt und inert gegenüber zellulären Funktionalitäten ist. Eine der bekanntesten bioorthogonalen Reaktionen ist dabei die Staudinger-Ligation, bei der ein Azid mit einem trivalenten Phosphin unter Ausbildung einer stabilen Amidbindung reagiert (Abbildung 6a).⁶⁸ Eine Weiterentwicklung der Staudinger-Ligation ist die spurlose Staudinger-Ligation, bei der das verwendete Phosphin-Reagenz so konzipiert ist, dass bei der Reaktion mit einem Azid eine native Amidbindung entsteht (Abbildung 6b).^{69,70} Da das notwendige Phosphin-Reagenz jedoch leicht oxidiert und die Reaktion nur sehr langsam abläuft ($k \sim 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), kann die Staudinger-Ligation in biologischen Systemen nur begrenzt eingesetzt werden.⁷¹

Glykokonjugate, wie zum Beispiel Glykoproteine, bieten eine ausgezeichnete Plattform, um die Bioorthogonalität und Biokompatibilität von Azid-basierten Biokonjugationen zu testen. Der Azid-funktionalisierte Zucker N-Azidoacetylmannosamin (Ac_4ManNAz) wird als Vorstufe bei der Sialinsäure-Biosynthese erkannt und kann durch externe Zugabe metabolisch in die Glykokonjugate einer Zelle eingebaut werden. Auf diese Weise konnten Azid-funktionalisierte Glykokonjugate auf der Oberfläche von lebenden Zellen mit Phosphin-basierten Sonden markiert werden. Die Eignung der Staudinger-Ligation für Biokonjugationen konnte dadurch mehrfach demonstriert werden.^{68,72}

Eine weitere Azid-basierte bioorthogonale Reaktion ist die Kupfer-katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition (CuAAC), in der ein Azid mit einem terminalen Alkin in einer [3 + 2] Cycloaddition unter Ausbildung eines 1,4-Triazols reagiert (Abbildung 6c).^{73,74} Gründe für die Beliebtheit der CuAAC sind die geringe Größe und der geringe sterische Anspruch der Azid- und Alkingruppe. Beide Funktionalitäten reagieren hoch spezifisch miteinander und sind vollständig inert gegenüber den Biomolekülen zellulärer Systeme. Das Produkt der CuAAC entsteht regioselektiv und ist chemisch stabil. Verglichen mit anderen bioorthogonalen Reaktionen läuft die CuAAC relativ schnell ab ($k \sim 10^1 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$).⁷⁵ Da für die Katalyse der Reaktion jedoch Cu(I) nötig ist, welches gewöhnlich *in situ* durch die Reduktion von Cu(II) gebildet wird, und freie Kupfer-Ionen die Entstehung von zelltoxischen reaktiven Sauerstoffspezies begünstigen, ist die Anwendung der CuAAC für Proteinmarkierungen im Zellinneren nur begrenzt möglich.⁷⁶ Eine Verringerung der Cu(I)-Konzentration auf Werte, die von lebenden Zellen toleriert werden, führt zu einer drastischen Verminderung der Reaktionsgeschwindigkeit der CuAAC.⁷⁷

Aus diesem Grund wurde eine Vielzahl an wasserlöslichen Cu(I)-Liganden entwickelt, die verhindern, dass sich freies zelltoxisches Cu(I) anreichert.⁷⁸⁻⁸² Durch den Einsatz dieser Liganden kann die CuAAC auch in lebenden Systemen ohne Einbußen in der Reaktionsgeschwindigkeit durchgeführt werden. Neben wasserlöslichen Cu(I)-Liganden wurde ein breites Spektrum an fluorogenen Azid-Sonden entwickelt. Diese verzeichnen nach der Triazol-Bildung mit einem Alkin einen starken Anstieg der Fluoreszenzintensität, so dass

die Hintergrundfluoreszenz von Markierungsreaktionen gering gehalten werden kann.^{72,83-85} Die Eignung der CuAAC für Biokonjugationen konnte in mehreren Studien demonstriert werden. So konnte zum Beispiel die Oberfläche von Viruskapsiden mit Azid- oder Alkylgruppen derivatisiert und anschließend mit komplementären Sonden oder Proteinen markiert werden.^{80,86} In *Escherichia coli* und *Saccharomyces cerevisiae* konnten Proteine durch den Einbau unnatürlicher Aminosäuren mit einer Azid- oder Alkylgruppe ausgestattet und *in vivo* mit komplementären Sonden markiert werden.^{87,88}

Die effektivste Methode, die Biokompatibilität der Azid-Alkin-Cycloaddition zu verbessern, besteht darin, vollständig auf Cu(I) als Katalysator zu verzichten. Stattdessen kann die unkatalysierte Reaktion durch Ringspannung des verwendeten Alkins beschleunigt werden. (Abbildung 6d, e). Die ringspannungsinduzierte Azid-Alkin-Cycloaddition (engl. *strain-promoted azide-alkyne cycloaddition*, SPAAC) mit Cyclooctin ist allerdings wesentlich langsamer ($k \sim 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) als die CuAAC (Abbildung 6d).⁸⁹ Die Reaktionsgeschwindigkeit von gespannten Alkinen kann jedoch erhöht werden, indem elektronenziehende Substituenten, wie zum Beispiel Fluorgruppen, in der Nähe der Dreifachbindung angebracht werden.^{90,91} Alternativ kann die SPAAC beschleunigt werden, indem die Ringspannung des verwendeten Alkins erhöht wird. Dies kann durch die Anbringung rigider aromatischer Ringe an das Cyclooctin oder durch Ringverkürzung bis hin zum Cyclopentin geschehen.^{92,93} Die Anbringung zweier Benzolringe an Cyclooctin resultiert beispielsweise in einer Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit um zwei Größenordnungen ($k \sim 10^{-1} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) (Abbildung 6e).⁹⁴ Da gespannte Alkine durch Ringverkürzung und Anbringung zusätzlicher aromatischer Ringe zunehmend instabiler werden, muss für die Anwendung der SPAAC ein Gleichgewicht zwischen Reaktivität und Stabilität des gespannten Alkins gefunden werden.

Eine wesentliche Herausforderung bei der Markierung von Proteinen durch die SPACC besteht im hohen sterischen Anspruch und der starken Hydrophobizität der gespannten Alkine. Diese beiden Eigenschaften können die Faltung und Funktion von Proteinen beeinträchtigen, so dass nicht alle Proteine den Einbau gespannter Alkine tolerieren.⁹⁵ Eine Problematik für die Markierung im Inneren von Zellen ist, dass gespannte Alkine zu Nebenreaktionen mit zellulären Thiolgruppen neigen.⁹⁶ Analog zur Staudinger-Ligation wurde die Bioorthogonalität und Biokompatibilität der SPAAC über die Markierung Azid-funktionalisierter Glykokonjugate demonstriert. Die SPAAC-vermittelte Markierung konnte dabei nicht nur auf der Oberfläche von kultivierten Zellen, sondern auch *in vivo* in Nematoden, im Zebrafisch und in der Maus durchgeführt werden.^{89,97-100}

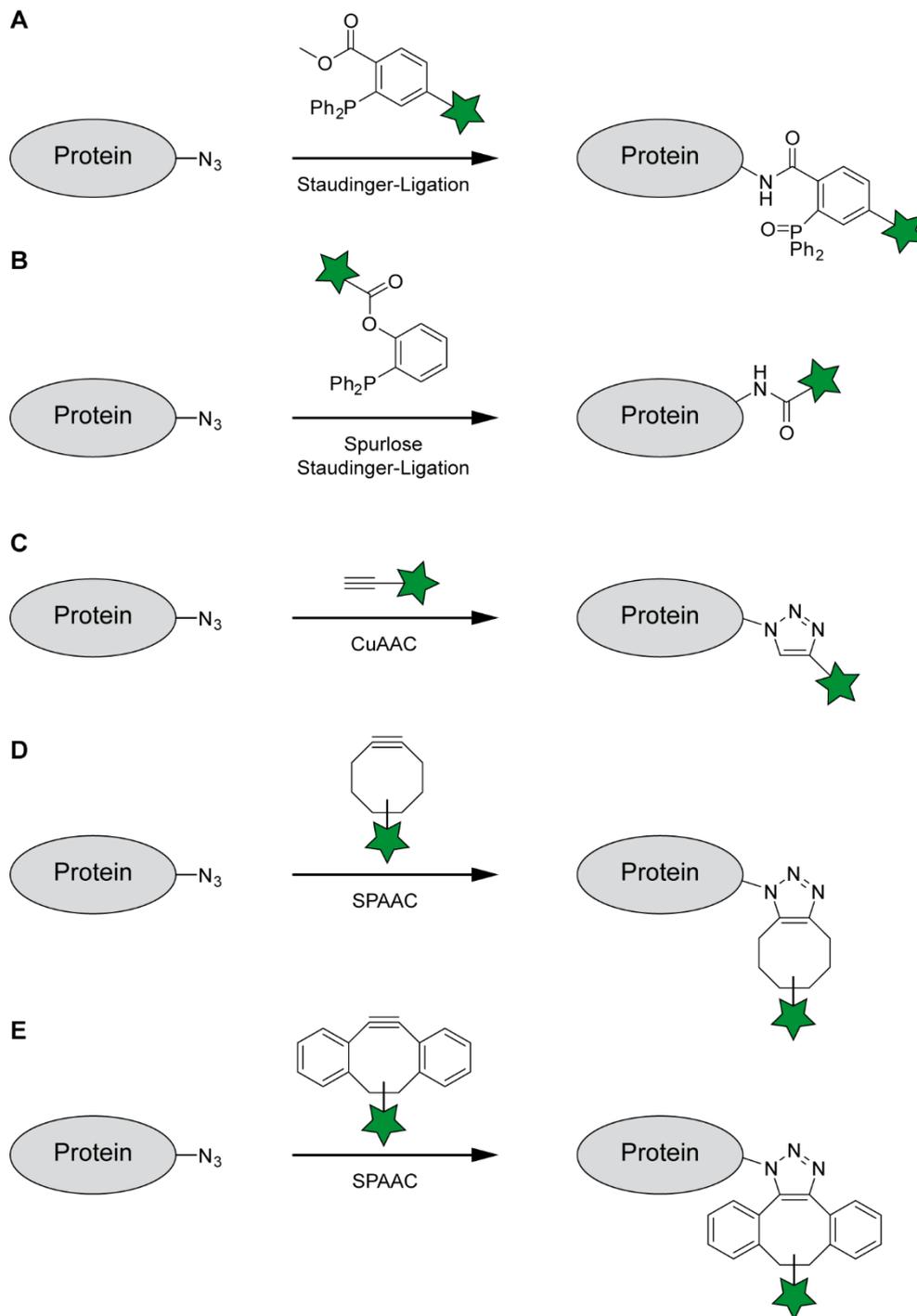


Abbildung 6 Azid-basierte bioorthogonale Reaktionen zur Markierung von Proteinen. Die im Zielprotein eingeführte Azidgruppe reagiert mit **(A)** einem Triphenylphosphin in der Staudinger-Ligation, **(B)** einem modifizierten Triphenylphosphin in der spurlosen Staudinger-Ligation, **(C)** einem terminalen Alkin in der Kupfer-katalysierten Azid-Alkin-Cycloaddition (CuAAC). Alternativ zur CuAAC reagiert die Azidgruppe in der ringspannungsinduzierten Azid-Alkin-Cycloaddition (SPAAC) mit **(D)** einem Cyclooctin oder **(E)** einem Dibenzocyclooctin (DBCO). Dabei wird eine Sonde (grün) auf das Zielprotein übertragen.

1.5.3 Tetrazin-basierte Proteinmarkierung

Mit der Entwicklung der inversen Diels-Alder-Reaktion zwischen Tetrazinen und Dienophilen, wie gespannten Alkenen/Alkinen, wurde ein neuer Standard für die Geschwindigkeit bioorthogonaler Konjugationen gesetzt ($k \sim 1 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$).^{101,102} Die Reaktionsgeschwindigkeit hängt dabei stark vom Reaktionspartner des Tetrazins ab. Bei der Reaktion mit Trans-

Cycloocten (TCO) lassen sich außerordentlich hohe Reaktionsgeschwindigkeiten erzielen ($k \sim 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), die bereits im Bereich enzymatischer Reaktionen liegen (Abbildung 7a).¹⁰³ Mit anderen Dienophilen, wie zum Beispiel Cyclooctin, ist die Reaktionsgeschwindigkeit zwar deutlich herabgesetzt ($k \sim 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), anderen bioorthogonalen Konjugationen aber dennoch überlegen (Abbildung 7b).¹⁰⁴ Der sterische Anspruch und die Hydrophobizität von gespannten Alkenen/Alkinen, wie TCO oder Cyclooctin, wird jedoch nicht von allen Proteinen toleriert. Daher wurden Cyclopropen-Derivate entwickelt, die minimalen sterischen Anspruch besitzen und ausreichend schnell mit Tetrazinen reagieren ($k \sim 10^1 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) (Abbildung 7c).¹⁰⁵

Da Fluorophore, die an Tetrazin gebunden sind oftmals reduzierte Fluoreszenz aufweisen, konnten Tetrazin-basierte fluorogene Sonden entwickelt werden, die ihre volle Fluoreszenzintensität erst nach Cycloaddition mit einem Dienophil entfalten.^{106,107} Die Bioorthogonalität Tetrazin-basierter Konjugationen konnte demonstriert werden, indem isolierte Krebszellen mit einem TCO-funktionalisierten Antikörper oder Inhibitor adressiert und anschließend mit einer Tetrazin-funktionalisierten Sonde markiert wurden.^{108,109} Auf ähnliche Weise konnte *in vivo* die Markierung von Krebszellen mit anschließender Bildgebung in Mäusen realisiert werden.¹¹⁰⁻¹¹² Auf Proteinebene konnte bereits eine Reihe an Tetrazin-basierten Markierungen *in vivo* an Zelloberflächenrezeptoren sowie im Inneren von Säugerzellen an Proteinen des Zellkerns und des Cytoskeletts durchgeführt werden.¹¹³⁻¹¹⁶ Aufgrund ihrer außerordentlichen Reaktionsgeschwindigkeit bietet die Tetrazin-basierte Biokonjugation gute Voraussetzungen zur Auflösung schneller biologischer Prozesse und zur Markierung von zellulären Proteinen, die nur in geringen Mengen vorhanden sind.

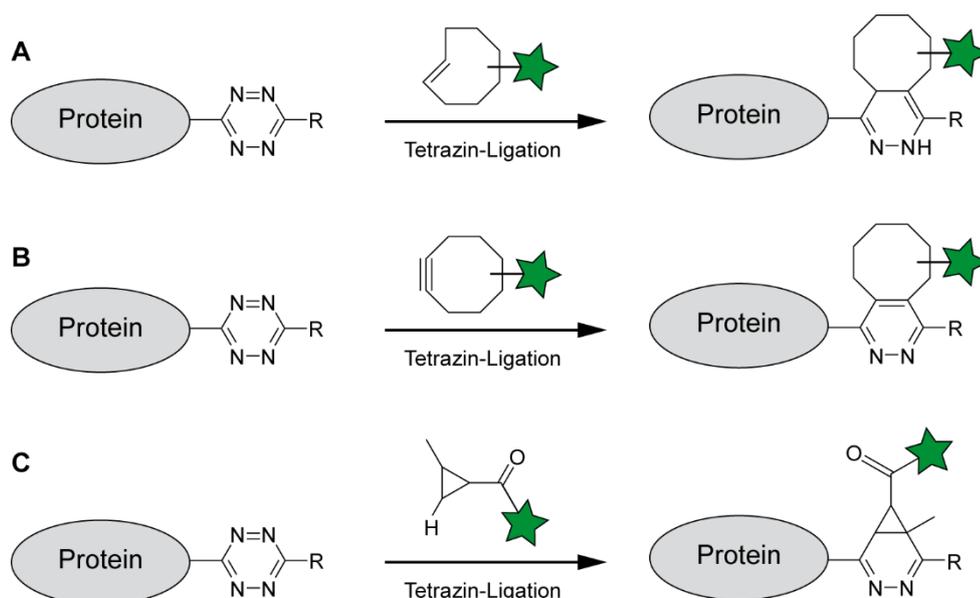


Abbildung 7 Tetrazin-basierte bioorthogonale Reaktionen zur Markierung von Proteinen. Die im Zielprotein eingeführte Tetrazingruppe wird ligiert mit **(A)** einem Trans-Cycloocten (TCO), **(B)** einem Cyclooctin oder **(C)** einem Cyclopropen. Dabei wird eine Sonde (grün) auf das Zielprotein übertragen.

1.6 Biosynthetische Proteinmarkierung

Für gewöhnlich bestehen Proteine aus den 20 natürlichen Aminosäuren. Um die Funktion von Proteinen studieren zu können, bedarf es oftmals der Einführung neuer Funktionalitäten, die nicht im genetischen Code enthalten sind. Eine Methode das Repertoire des genetischen Codes zu erweitern, besteht im Einbau unnatürlicher Aminosäuren (engl. *unnatural amino acids*, UAAs), die mit einer gewünschten funktionellen Gruppe ausgestattet sind. Im einfachsten Fall des UAA-Einbaus, wird die natürliche Aminoacyl-tRNA-Synthetase (AaRS) einer natürlichen Aminosäure genutzt, um eine UAA an Stelle der natürlichen Aminosäure in ein Zielprotein einzubauen.^{117,118} Dieses Vorgehen setzt voraus, dass die UAA als Substrat der natürlichen AaRS erkannt wird.

In der Praxis wird für den Einbau einer UAA an Stelle einer natürlichen Aminosäure ein auxotropher *E. coli*-Stamm verwendet, der für die Synthese der natürlichen Aminosäure defizient ist. Der Expressionsstamm wird zunächst in Vollmedium angezogen, welches alle 20 natürlichen Aminosäuren enthält. Anschließend wird der Stamm in ein Mangelmedium transferiert, dem die entsprechende natürliche Aminosäure fehlt und nach Zugabe der UAA wird die Expression des Zielproteins induziert. Auf diese Weise wird die UAA an Stelle der natürlichen Aminosäure in das Zielprotein eingebaut. Die AaRS von Methionin eignet sich dabei am besten für dieses Verfahren.¹¹⁹⁻¹²¹ Die AaRS von Tryptophan,¹²² Leucin,¹²³ Isoleucin,¹²⁴ Phenylalanin¹²⁵ oder Prolin¹²⁶ kann jedoch ebenfalls für den UAA-Einbau verwendet werden. Ein entscheidender Nachteil dieser Methode ist allerdings, dass Position und Anzahl des UAA-Einbaus davon abhängen, an welcher Stelle und wie oft die natürliche Aminosäure im Zielprotein vorhanden ist.

Eine elegantere Methode, die den ortsspezifischen UAA-Einbau erlaubt, ist die sogenannte Erweiterung des genetischen Codes.^{87,127} Bei der Erweiterung des genetischen Codes wird ein orthogonales AaRS/tRNA-Paar genutzt, um eine UAA während der Translation in ein Zielprotein einzubauen (Abbildung 8). Dabei wird eine Suppressor-tRNA verwendet, die das seltene *Amber*-Stopcodon UAG auf der mRNA erkennt. Dadurch führt das Stopcodon nicht wie üblich zum Abbruch der Translation, sondern zum Einbau der Aminosäure, mit der die Suppressor-tRNA beladen ist.¹²⁸ Um in Antwort auf das *Amber*-Stopcodon eine UAA in die wachsende Polypeptidkette einzubauen, muss eine AaRS eingesetzt werden, die die Suppressor-tRNA spezifisch mit der UAA belädt. Bei der Erweiterung des genetischen Codes in einem heterologen Wirt muss darauf geachtet werden, dass ein AaRS/tRNA-Paar verwendet wird, welches orthogonal zur Translationsmaschinerie des Wirts ist. Das bedeutet, dass die orthogonale AaRS die orthogonale tRNA spezifisch mit der UAA beladen muss, ohne dabei eine endogene tRNA des Wirts zu beladen. Ebenso muss die orthogonale tRNA ein spezifisches Substrat der orthogonalen AaRS sein und darf von keiner endogenen AaRS erkannt werden.

Ein AaRS/tRNA-Paar, das häufig für den Einbau unnatürlicher Aminosäuren verwendet wird, ist das Pyrrolysyl-tRNA-Synthetase (PylRS)/tRNA_{CUA}-Paar aus *Methanosarcina barkeri*.^{129,130} Der Vorteil des PylRS/tRNA_{CUA}-Paares besteht darin, dass es im Vergleich zu anderen AaRS/tRNA-Paaren nicht eine der 20 gewöhnlichen Aminosäuren erkennt, sondern Pyrrolysin. Wird das PylRS/tRNA_{CUA}-Paar in einem heterologen Wirt eingesetzt, in dem die Aminosäure Pyrrolysin nicht vorkommt, muss das aktive Zentrum der PylRS lediglich zur Erkennung der UAA evolviert werden. Es ist in diesem Fall jedoch nicht notwendig, das aktive Zentrum der PylRS so zu verändern, dass das natürliche Substrat Pyrrolysin nicht mehr erkannt wird.

Um Mutanten der PylRS zu identifizieren, die eine bestimmte UAA erkennen, die 20 gewöhnlichen Aminosäuren jedoch nicht, wird ein zweistufiges Verfahren bestehend aus positiver und negativer Selektion angewandt.¹³¹ So konnte das PylRS/tRNA_{CUA}-Paar bereits für die Erweiterung des genetischen Codes in *E. coli*, *S. cerevisiae*, *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*, und in Säugerzellen evolviert werden.^{127,132-137} Indem das Amber-Stopcodon UAG rekombinant an der gewünschten Stelle im Gen eines Zielproteins eingeführt wird, ist es möglich mit Hilfe des optimierten PylRS/tRNA_{CUA}-Paares eine UAA ortsspezifisch in das Zielprotein einzubauen.

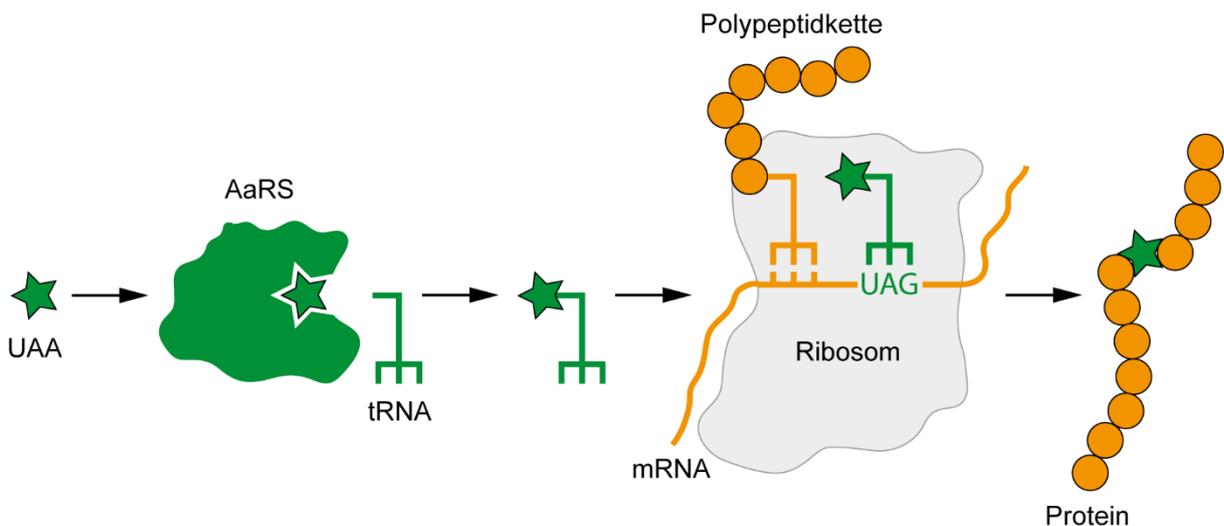


Abbildung 8 Erweiterung des genetischen Codes. Eine unnatürliche Aminosäure (UAA) wird von einer orthogonalen Aminoacyl-tRNA-Synthetase (AaRS) auf eine orthogonale Suppressor-tRNA geladen. Bei der ribosomalen Translation der mRNA wird das Amber-Stopcodon UAG, welches rekombinant in das Gen des Zielproteins eingeführt wurde, von der beladenen Suppressor-tRNA erkannt und die UAA in die wachsende Polypeptidkette eingebaut. Auf diese Weise entsteht ein Protein, das ortsspezifisch mit der UAA modifiziert ist.

Durch die Erweiterung des genetischen Codes kann ein Zielprotein beispielsweise ortsspezifisch mit einer bioorthogonalen Gruppe ausgestattet werden, die an eine UAA konjugiert ist. Dies erlaubt die anschließende Markierung des Zielproteins mit einer komplementären Sonde. Auf diese Weise konnten bereits Ketone, Azide, terminale Alkine,

gespannte Alkine/Alkene und Tetrazine ortsspezifisch in Proteine eingeführt werden (Abbildung 9).^{95,138-142}

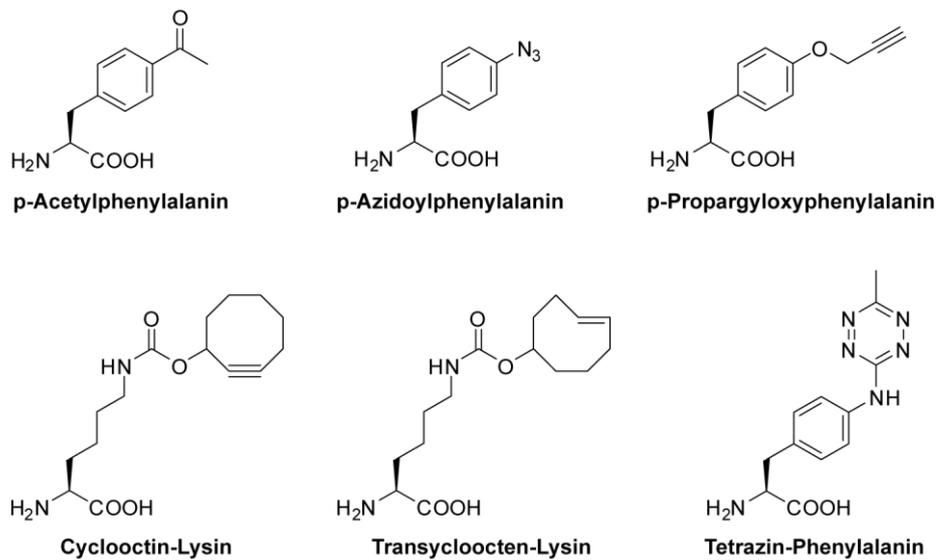


Abbildung 9 Bioorthogonale unnatürliche Aminosäuren (UAAs) für die Erweiterung des genetischen Codes. Die dargestellten UAAs erlauben die ortsspezifische Funktionalisierung von Zielproteinen mit diversen bioorthogonalen Gruppen. Die funktionalisierten Zielproteine können anschließend mit Hilfe von komplementären Sonden markiert werden.

Obwohl der biosynthetische Einbau von UAAs in Zielproteine ortsspezifisch realisiert werden kann und bereits eine Vielzahl an bioorthogonalen UAAs in Zielproteine eingebaut werden konnten, ist die Erweiterung des genetischen Codes mit gewissen Einschränkungen und Herausforderungen verbunden. So ist beim Einbau einer UAA die Ausbeute des Zielproteins nach rekombinanter Expression im Vergleich zum Wildtyp-Protein meist deutlich reduziert. Für Zielproteine, die ein niedriges Expressionslevel besitzen, ist der Einbau der UAA somit oft nur in sehr geringem Ausmaß möglich. Des Weiteren kann es vorkommen, dass das *Amber*-Stopcodon UAG während der Proteintranslation tatsächlich als Stopcodon gelesen wird und somit kein UAA-Einbau stattfindet. In diesem Fall bricht die Translation ab und es entstehen verkürzte Proteinvarianten, die die Aufreinigung des korrekt modifizierten Zielproteins erschweren können. Soll der genetische Code um eine neue UAA erweitert werden, muss eine geeignete AaRS oftmals für die Erkennung der UAA evolviert werden und die Kompatibilität des evolvierten AaRS/tRNA-Paares mit dem heterologen Expressionssystem aufwendig überprüft werden.⁵²

Eine Methode, die diese Schwierigkeiten überwinden kann und gleichzeitig zu einer effizienten und ortsspezifischen Markierung von Zielproteinen führt, ist die enzymatische Proteinmarkierung.

1.7 Enzymatische Proteinmarkierung

Als Katalysatoren chemischer Reaktionen besitzen Enzyme wertvolle Eigenschaften, die für die Markierung von Proteinen ausgenutzt werden können. Enzyme sind hochspezifisch für eine bestimmte Reaktion und können diese unter milden physiologischen Bedingungen mit hoher Reaktionsgeschwindigkeit ausführen. In manchen Fällen ist eine kurze Peptidsequenz ausreichend, um von einem bestimmten Enzym erkannt und modifiziert zu werden. Fusioniert man diese Erkennungssequenz an ein Zielprotein, kann dieses durch das entsprechende Enzym ortsspezifisch an der eingeführten Peptidsequenz modifiziert werden (Abbildung 10a). Wird bei der Modifizierung an Stelle des natürlichen Cosubstrats ein synthetisches Cosubstrat eingesetzt, welches mit einer Sonde oder bioorthogonalen Gruppe ausgestattet ist, so kann die Sonde bzw. bioorthogonale Gruppe enzymkatalysiert und ortsspezifisch auf das Zielprotein übertragen werden. Auf diese Weise konnten bereits unterschiedliche Enzymklassen für die Markierung von Proteinen ausgenutzt werden, wie zum Beispiel Peptidasen (Sortase A (SrtA)¹⁴³⁻¹⁵² und Subtiligase),¹⁵³⁻¹⁵⁵ Ligasen (Liponsäure-Ligase (LplA),^{116,156,157} Tubulin-Tyrosin-Ligase^{158,159} und Biotin-Ligase)¹⁶⁰⁻¹⁶⁴ und Transferasen (Phosphopantetheinyl-Transferase (PPTase),¹⁶⁵⁻¹⁶⁸ Farnesyl-Transferase,¹⁶⁹⁻¹⁷⁷ N-Myristoyl-Transferase¹⁷⁸⁻¹⁸² und mikrobielle Transglutaminasen).¹⁸³⁻¹⁸⁸ Im Folgenden wird jeweils ein etablierter Vertreter dieser drei Enzymklassen beispielhaft vorgestellt.

Bei SrtA handelt es sich um eine Transpeptidase, die als Werkzeug für die Proteinmarkierung *in vitro* und *in vivo* bereits eingehend untersucht und charakterisiert wurde. SrtA stammt ursprünglich aus *Staphylococcus aureus* und verankert Oberflächenproteine, die am C-Terminus die Konsensussequenz LPXTG besitzen, in der bakteriellen Zellwand.¹⁸⁹⁻¹⁹¹ Zu diesem Zweck spaltet das Enzym zunächst die Peptidbindung zwischen dem Threonin und dem Glycin der LPXTG-Konsensussequenz unter Ausbildung eines Acyl-Enzym-Intermediats. Dieses Intermediat wird in der Folge vom N-terminalen Amin der Penta-Glycin-Brücke eines Peptidoglykans unter Ausbildung einer neuen Peptidbindung aufgelöst und das Oberflächenprotein auf diese Weise in der Zellwand verankert. Wird die Erkennungssequenz LPXTG rekombinant an ein Zielprotein angebracht, so kann dieses SrtA-katalysiert mit funktionalisierten Poly-Glycin-Peptiden markiert werden (Abbildung 10b).^{192,193} Interessanterweise kann das Acyl-Enzym-Intermediat nicht nur von Poly-Glycin-Peptiden, sondern auch von Hydrazinen aufgelöst werden, was das Cosubstrat-Spektrum der SrtA-vermittelten Proteinmarkierung erweitert.¹⁹⁴ Abhängig davon ob die LPXTG- oder die Poly-Glycin-Sequenz am Zielprotein angebracht wird, kann die Markierung am C- oder N-Terminus stattfinden. Die katalytische Effizienz des SrtA_{WT} ist eher gering ($k_{\text{cat}}/K_M = 2,0 \cdot 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ für die Reaktion von LPETG mit einem Tri-Glycin-Peptid), konnte durch zielgerichtete Evolution jedoch um einen Faktor von 140 gesteigert werden ($k_{\text{cat}}/K_M = 2,8 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$).¹⁴⁵ Katalysiert durch SrtA konnten bereits Azide und terminale Alkine sowie DBCO und TCO auf Zielproteine

übertragen werden.^{144,148,150} Die mit SrtA verbundenen Anwendungen reichen von der *in vitro* Beladung von Antikörpern mit bildgebenden Sonden über die Identifikation von Rezeptor-Ligand-Interaktion auf Zelloberflächen bis hin zur *in vivo* Markierung von Proteinen in *C. elegans*.^{144,147,149}

LplA ist ein Enzym aus der Gruppe der Ligasen und überträgt in einer ATP-abhängigen Reaktion eine Lipoat-Einheit spezifisch auf ein konserviertes Lysin eines Lipoat-Akzeptorproteins.¹⁹⁵ Da LplA auch Lipoat-Analoga als Cosubstrate erkennt und überträgt, können Zielproteine, die rekombinant mit der LplA-Erkennungssequenz ausgestattet sind, ortsspezifisch markiert werden (Abbildung 10c).¹⁹⁶ Die durch zielgerichtete Evolution von ursprünglich 22 auf 13 Aminosäuren verkürzte LplA-Erkennungssequenz GFEIDKVWYDLDA kann dabei sowohl an den Termini von Zielproteinen als auch in internen Schleifenregionen angebracht werden.^{197,198} Die Übertragung einer Lipoat-Einheit auf das Erkennungspeptid ($k_{cat}/K_M = 1,7 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) ist lediglich um einen Faktor von 8 niedriger als die Übertragung auf das natürliche Lipoat-Akzeptorprotein.¹⁹⁷ Mit Hilfe der LplA-vermittelten Ligation konnten bereits Aldehyde, Azide, terminale Alkine sowie TCO auf Zielproteine übertragen werden.^{116,156,196,198} Die LplA-vermittelte Proteinmarkierung wurde bereits *in vitro* für die Markierung von Antikörperfragmenten mit bildgebenden Sonden und zur Aktivierung von Immuntherapeutika eingesetzt und konnte *in vivo* für die Markierung von Proteinen auf der Oberfläche von Zellen verwendet werden.^{156,157,196,199}

PPTasen stellen einen Vertreter aus der Enzymklasse der Transferasen dar und nutzen Coenzym A (CoA), um eine Phosphopantethein (Ppant)-Gruppe auf ein konserviertes Serin von nicht-ribosomalen Peptid-Synthetasen (NRPSs) zu übertragen.²⁰⁰ Stattet man Zielproteine rekombinant mit einer aus den NRPSs abgeleiteten Erkennungssequenz aus, können diese durch den Einsatz synthetischer CoA-Derivate und einer geeigneten PPTase ortsspezifisch markiert werden (Abbildung 10d).¹⁶⁵ Die PPTase-Erkennungssequenz kann dabei an den Termini oder in internen Schleifenregionen des Proteins angebracht werden. Die PPTase, die für die enzymatische Proteinmarkierung am häufigsten verwendet wird, ist die Surfactin-PPTase (Sfp) aus *Bacillus subtilis*, da diese ein sehr breites Spektrum an Cosubstraten akzeptiert.²⁰¹⁻²⁰³ Bei der PPTase-vermittelten Proteinmarkierung werden Sonden meist über Maleimid-Chemie direkt an die Thiolgruppe von CoA gekoppelt, so dass Zielproteine in einer Ein-Schritt-Reaktion mit der entsprechenden Sonde markiert werden können. Die Sfp-Erkennungssequenz konnte bereits hinsichtlich der Effizienz und Spezifität der Ppant-Übertragung optimiert werden. Der k_{cat}/K_M -Wert für die Sfp-katalysierte Übertragung eines Ppant-Biotin-Konjugats auf die zwölf Aminosäuren lange Sfp-Erkennungssequenz GDSLSWLLRLLN beträgt dabei $3,2 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.²⁰⁴ *In vitro* wurden durch die Sfp-vermittelte Ppant-Übertragung bereits Protein-DNA-Chimären erzeugt, Antikörper mit Cytotoxinen beladen und Konjugationen für Förster-Resonanzenergietransfer (FRET)-Studien

durchgeführt.^{166,167,205,206} Da CoA-Derivate aufgrund ihrer negativen Ladung nicht zellpermeabel sind, beschränken sich Anwendungen *in vivo* bisher auf die Markierung von Proteinen der Zelloberfläche. Im Gegensatz zu den meisten anderen enzymatischen Markierungsmethoden existieren für die Sfp-vermittelte Markierung Hydrolasen, die die eingeführte Ppant-Gruppe von Zielproteinen wieder abspalten können und somit eine reversible Modifikationsstrategie erlauben.^{207,208}

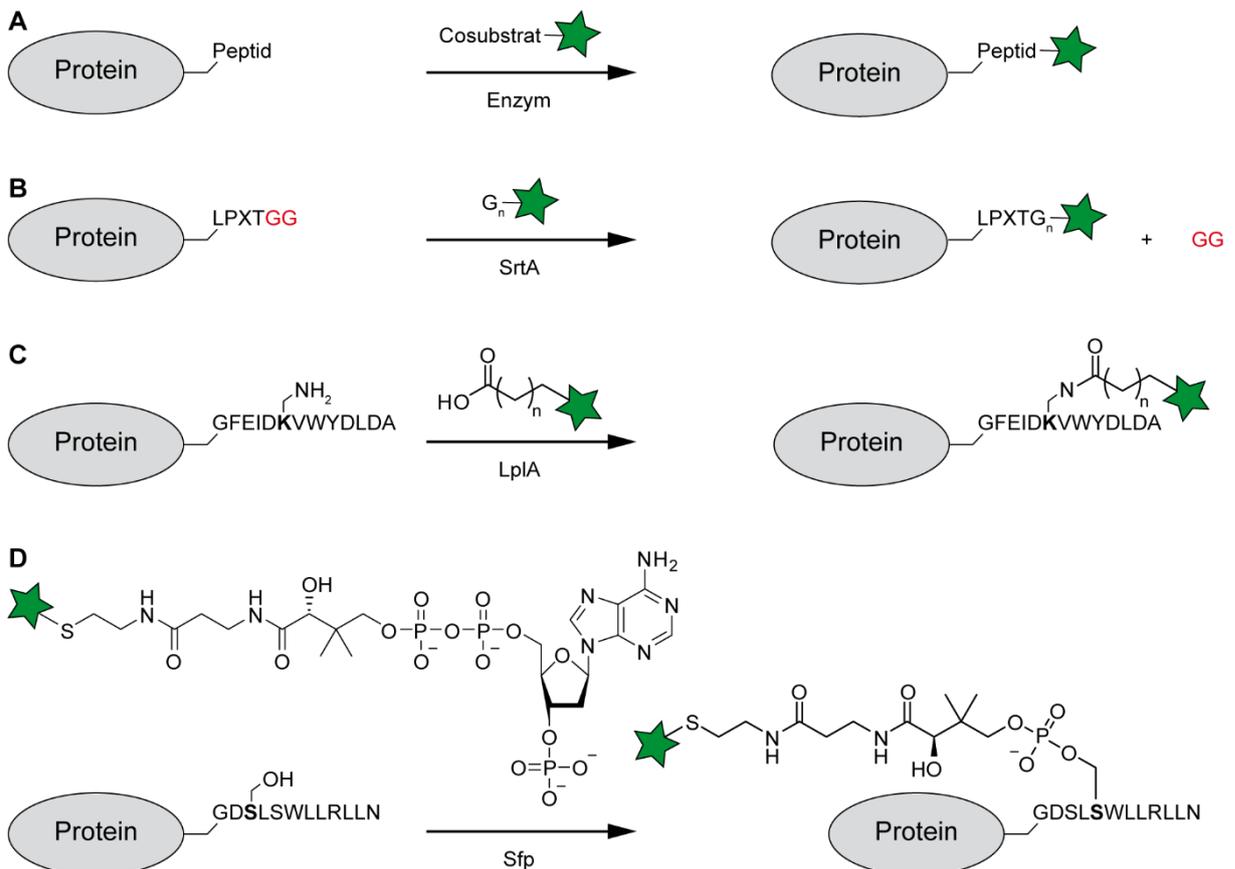


Abbildung 10 Enzymatische Markierung von Proteinen. **(A)** Die Strategie der enzymatischen Proteinmarkierung. Ein Zielprotein wird rekombinant mit der Peptid-Erkennungssequenz eines Enzyms ausgestattet. Mit Hilfe des entsprechenden Enzyms kann eine Sonde (grüner Stern) aus einem synthetischen Cosubstrat ortsspezifisch auf die Erkennungssequenz übertragen werden. **(B)** Ein Zielprotein wird rekombinant mit der Erkennungssequenz LPXTG der Sortase A (SrtA) ausgestattet. Die Transpeptidase SrtA knüpft eine neue Peptidbindung zwischen dem Threonin der Erkennungssequenz und einem funktionalisierten Poly-Glycin-Peptid. Dabei wird eine Sonde (grüner Stern) auf das Zielprotein übertragen. **(C)** Ein Zielprotein wird rekombinant mit der Erkennungssequenz GFEIDK[VWY]DLDA der Liponsäure-Ligase (LplA) ausgestattet. LplA überträgt aus einem Liponsäure-Derivat eine Lipoat-Einheit ortsspezifisch auf ein Lysin der Erkennungssequenz. Dabei wird eine Sonde (grüner Stern) auf das Zielprotein übertragen. **(D)** Ein Zielprotein wird rekombinant mit der Erkennungssequenz GDSLSWLLRLLN der Surfactin-PPTase (Sfp) ausgestattet. Die Transferase Sfp überträgt aus einem Coenzym A-Derivat eine Phosphopantethein-Einheit ortsspezifisch auf ein Serin der Erkennungssequenz. Dabei wird eine Sonde (grüner Stern) auf das Zielprotein übertragen.

1.8 AnkX als Werkzeug für die enzymatische Proteinmarkierung

Wie eingangs erwähnt wurde die Phosphocholintransferase AnkX, die Rab1b ortsspezifisch an $S76_{\text{Rab1b}}$ modifiziert, von Heller et al. ebenfalls als Werkzeug für die enzymatische Proteinmarkierung vorgeschlagen (Abbildung 11).⁴¹ Die Wahl von AnkX für die Etablierung einer neuen Methode zur Markierung von Proteinen hatte mehrere Gründe: AnkX kann das Substratprotein Rab1b sowohl im GDP- als auch im GTP-gebundenen Zustand mit annähernd gleicher Effizienz modifizieren. Da sich die beiden Aktivierungszustände maßgeblich in ihrer Struktur unterscheiden, wurde angenommen, dass die AnkX-Erkennungssequenz keine definierte Sekundärstruktur einnehmen muss, um als Substrat für AnkX zu dienen. In der Folge konnte gezeigt werden, dass die Octapeptidsequenz TITSSYYR aus der *Switch II*-Region von Rab1b ausreichend ist, um von AnkX erkannt und phosphocholiniert zu werden. Mit lediglich 8 Aminosäuren ist die AnkX-Erkennungssequenz daher kürzer als die meisten anderen enzymatischen Erkennungssequenzen. Zudem ist die von AnkX übertragene PC-Gruppe sehr klein und sterisch wenig anspruchsvoll. Ein weiterer Vorteil der AnkX-basierten Markierung ist die Einführung einer kovalenten und stabilen Phosphodiesterbindung. Diese Bindung kann mit Hilfe des Legionellenenzym Lem3 bei Bedarf wieder hydrolytisch gespalten werden. Somit ist die AnkX-vermittelte Markierungsstrategie spurlos reversibel. Die Reversibilität einer Proteinmarkierung kann von Vorteil sein, wenn kostbare Proben nach der Modifizierung und dem damit verbundenen Experiment wieder in ihren nativen Zustand versetzt werden sollen. Die AnkX-katalysierte Phosphocholinierung des natürlichen Substratproteins Rab1b läuft mit einem $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ -Wert von $2 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ außerdem relativ schnell ab und befindet sich im Bereich anderer für die Proteinmarkierung etablierter Enzyme.³¹

Von Heller et al. wurde gezeigt, dass Zielproteine, die rekombinant mit der AnkX-Erkennungssequenz TITSSYYR ausgestattet sind, von AnkX phosphocholiniert werden können.⁴¹ Dabei wurden der kleine Ubiquitin-verwandte Modifikator (engl. *small ubiquitin-related modifier*, SUMO), das Maltose-bindende Protein (MBP) und der Legionelleneffektor DrrA als Modellproteine gewählt. Diese Modellproteine wurden entweder an den Termini (SUMO und MBP) oder in internen Schleifenregionen (DrrA) mit der AnkX-Erkennungssequenz ausgestattet. Der $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ -Wert für die Phosphocholinierung der untersuchten Modellproteine ist im Vergleich zum natürlichen Substratprotein Rab1b jedoch deutlich reduziert (Faktor 50-4000). Zudem wurde gezeigt, dass die relativ große Sonde Fluorescein von AnkX sowohl auf Rab1b als auch auf Modellproteine übertragen werden kann. Dazu muss die Sonde über einen Linker aus mindestens vier Polyethylenglykol (PEG)-Einheiten an die Cholin Kopfgruppe von CDP-Cholin angebracht sein. Bisher konnte die Anwendbarkeit der AnkX-vermittelten Proteinmarkierung *in vivo* nicht bestätigt werden.

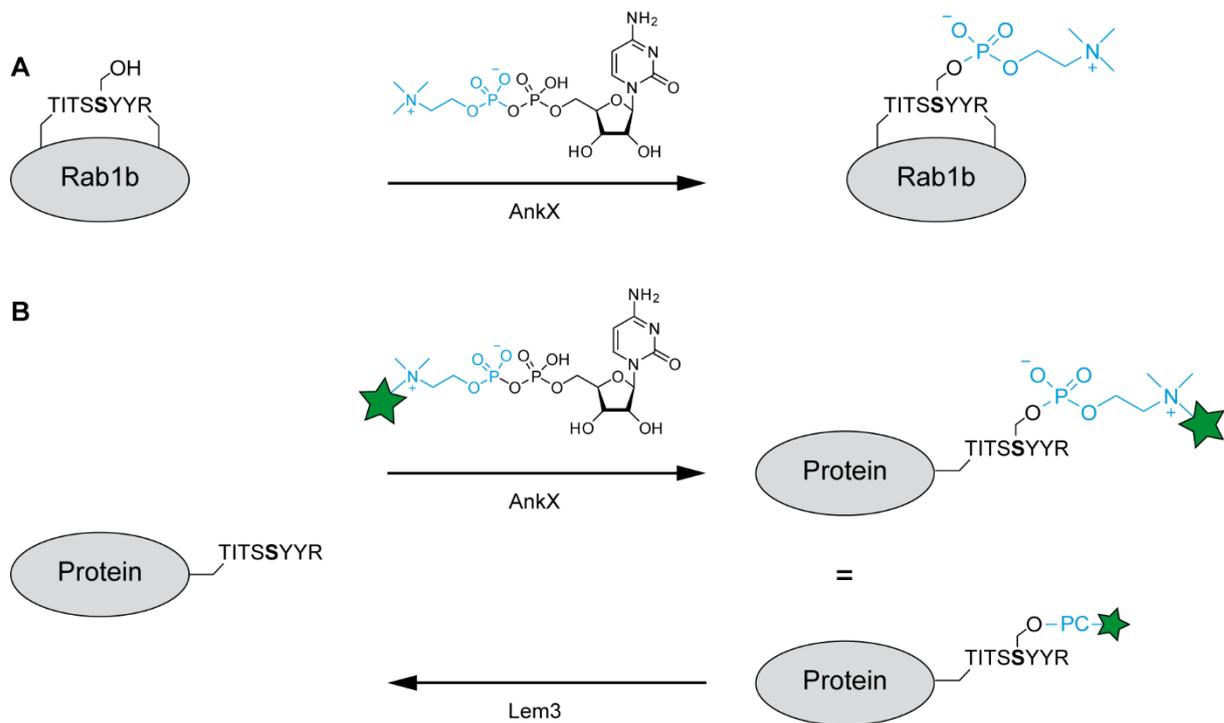


Abbildung 11 Strategie der AnkX-vermittelten Proteinmarkierung. **(A)** Die Phosphocholintransferase AnkX modifiziert ihr natürliches Substratprotein Rab1b ortsspezifisch an S76_{Rab1b} mit einer PC-Gruppe. Dabei wird CDP-Cholin als Cosubstrat verwendet. S76_{Rab1b} befindet sich innerhalb der regulatorischen *Switch II*-Region von Rab1b. **(B)** Ein Zielprotein wird rekombinant mit der AnkX-Erkennungssequenz TITSSYYR aus der regulatorischen *Switch II*-Region von Rab1b ausgestattet. Mit Hilfe eines synthetischen CDP-Cholin-Derivats kann durch die AnkX-vermittelte Phosphocholinierung eine Sonde (grüner Stern) ortsspezifisch auf das Zielprotein übertragen werden. Die AnkX-Erkennungssequenz kann dabei sowohl an den Termini als auch in internen Schleifenregionen des Zielproteins eingeführt werden. Bei Bedarf kann Lem3 die Sonde wieder hydrolytisch vom Zielprotein abspalten. In den folgenden Abbildungen dieser Arbeit wird die PC-Gruppe (blau) meist nicht mit chemischen Strukturformeln dargestellt, sondern durch das Textkürzel „PC“.

2. Zielsetzung

Die Phosphocholintransferase AnkX aus *L. pneumophila* verwendet CDP-Cholin für die Phosphocholinierung kleiner GTPasen der Rab1-Familie und kann als molekulares Werkzeug für die enzymatische Proteinmarkierung eingesetzt werden. Zu diesem Zweck werden Zielproteine rekombinant mit einer AnkX-Erkennungssequenz ausgestattet, die aus der regulatorischen *Switch II*-Region des natürlichen Substratproteins Rab1b stammt. Sonden, die synthetisch an der Cholinkopfgruppe von CDP-Cholin angebracht sind, lassen sich durch die AnkX-vermittelte Phosphocholinierung ortsspezifisch auf die AnkX-Erkennungssequenz des Zielproteins übertragen. Zielproteine, die mit der AnkX-Erkennungssequenz ausgestattet sind, werden bisher jedoch wesentlich langsamer phosphocholiniert als das natürliche Substratprotein Rab1b. Um eine zielgerichtete Optimierung der AnkX-basierten Modifikationsstrategie zu ermöglichen, sind daher Einblicke in die Substratproteinbindung von AnkX von großem Interesse.

In der vorliegenden Arbeit sollte daher die Interaktion zwischen AnkX und Rab1b durch biochemische und strukturelle Methoden untersucht werden. Der schwach affine AnkX:Rab1b-Komplex ($K_D = 122 \pm 23 \mu\text{M}$)³¹ sollte durch den Einsatz funktionalisierter CDP-Cholin-Derivate kovalent stabilisiert und die Struktur des Enzym-Protein-Komplexes mit Hilfe von Röntgenkristallographie bestimmt werden. Zunächst sollte die Expression und Reinigung der Phosphocholintransferase optimiert werden, um ausreichend Protein für die präparative Komplexbildung mit Rab1b zur Verfügung zu stellen und ein möglichst aktives Enzym für die AnkX-vermittelte Proteinmarkierung zu generieren. Die Interaktion zwischen AnkX und Rab1b sollte zusätzlich durch Mutations-Funktions-Analysen untersucht werden.

Des Weiteren sollten im Rahmen eines Forschungsaufenthalts an der Universität Umeå unter Anleitung von Prof. Dr. Christian Hedberg und Dr. Philipp Ochtrup bioorthogonale CDP-Cholin-Derivate synthetisiert werden, um die AnkX-basierte Modifikationsstrategie möglichst modular zu gestalten. Die bioorthogonalen Gruppen sollten dabei mit unterschiedlich langen Linkern an der Cholinkopfgruppe von CDP-Cholin angebracht werden, um die Toleranz von AnkX gegenüber einem diversen Spektrum an Cosubstraten zu evaluieren. Des Weiteren sollten kinetische Parameter der synthetisierten CDP-Cholin-Analoga bestimmt und die Cosubstrate *in vitro* und *in vivo* im Rahmen der AnkX-basierten Proteinmarkierung eingesetzt werden: Durch den abwechselnden Einsatz der Phosphocholintransferase AnkX und der Dephosphocholinase Lem3 sollte eine Strategie entwickelt werden, um Zielproteine *in vitro* ortsspezifisch mit zwei unterschiedlichen Sonden zu markieren. Durch die rekombinante Ausstattung eines Transmembranrezeptors mit der AnkX-Erkennungssequenz sollte untersucht werden, ob die AnkX-katalysierte Proteinmarkierung auch *in vivo* auf der Oberfläche von Cos-7-Zellen möglich ist. Die Modifizierung des Transmembranrezeptors sollte durch Fluoreszenzmikroskopie fixierter Cos-7-Zellen überprüft werden.

3. Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde die Interaktion zwischen der Phosphocholintransferase AnkX und der kleinen GTPase Rab1b untersucht und die Eignung von AnkX als molekulares Werkzeug für die enzymatische Proteinmarkierung analysiert. Dazu wurde das Enzym zunächst biochemisch charakterisiert und die Expression und Reinigung von AnkX optimiert (Abschnitt 3.1). Anschließend wurden diverse CDP-Cholin-Derivate synthetisiert und als Cosubstrate für die AnkX-vermittelte Phosphocholinierung evaluiert (Abschnitt 3.2). Mit Hilfe der hergestellten CDP-Cholin-Analoga und durch den abwechselnden Einsatz der Phosphocholintransferase AnkX und der Dephosphocholinase Lem3 wurde eine Strategie entwickelt, um Zielproteine *in vitro* ortsspezifisch mit zwei unterschiedlichen Sonden auszustatten (Abschnitt 3.3). Des Weiteren wurde überprüft, ob die AnkX-vermittelte Proteinmarkierung auch *in vivo* auf der Oberfläche von Cos-7-Zellen möglich ist (Abschnitt 3.4). Abschließend wurde die Interaktion zwischen AnkX und Rab1b auf struktureller und biochemischer Ebene untersucht (Abschnitt 3.5).

3.1 Biochemische Charakterisierung von AnkX

3.1.1 Optimierung der Expression und Reinigung von AnkX

Die Phosphocholintransferase AnkX besitzt 949 Aminosäuren und ist in zwei funktionelle Domänen unterteilt. Während sich N-terminal (AS 1-350) die katalytische FIC-Domäne befindet, erstreckt sich C-terminal (AS 351-949) eine Domäne mit mehreren Ankyrin-*Repeats*. Die vier N-terminalen Ankyrin-*Repeats* tragen zur strukturellen Stabilisierung der FIC-Domäne bei.³⁸ Die Rolle und Struktur der weiteren Ankyrin-*Repeats* ist bisher nicht bekannt. Während die Verkürzung des Enzyms auf den AS-Bereich 1-800 zu keinerlei Einbuße der katalytischen Aktivität führt, ist die Verkürzung auf den AS-Bereich 1-687 mit einer reduzierten Enzymaktivität verbunden.³⁶ Um das AnkX-Konstrukt zu identifizieren, welches bei minimaler Größe gleichzeitig maximale katalytische Aktivität aufweist, wurden ausgehend von AnkX₁₋₈₀₀ mehrere rekombinante C-terminale AnkX-Verkürzungskonstrukte erstellt. In einem Western-Blot-basierten Ansatz wurde die Effizienz der verkürzten Enzymvarianten untersucht (Abbildung 12a).

Dabei lässt sich beobachten, dass bereits die Verkürzung von AnkX auf den AS-Bereich 1-769 zu einem Absinken der Enzymaktivität auf 25 % der Wildtypaktivität führt. Bei der Verkürzung auf den AS-Bereich 1-688 nimmt die Enzymaktivität auf 2 % der Wildtypaktivität ab. Bei weiter verkürzten Varianten des Enzyms kann im untersuchten Zeitraum von 2 h keine Phosphocholinierung von Rab1b beobachtet werden. Nach Inkubation über einen Zeitraum von 16 h kann jedoch für alle Verkürzungskonstrukte (bis hin zu AnkX₁₋₄₈₄) Rab1b-PC nachgewiesen werden (Anhang Abbildung 41).

Die Deletion C-terminaler Ankyrin-*Repeats* führt demnach zu einer drastischen Reduktion der Enzymaktivität. Folglich kann AnkX C-terminal nicht weiter als auf die AS-Region 1-800 verkürzt werden, ohne enzymatische Aktivität zu verlieren. Diese Beobachtung demonstriert die Wichtigkeit der Ankyrin-*Repeats* für die AnkX-vermittelte Phosphocholinierung von Rab1b. Für den Großteil der nachfolgenden Experimente wurde daher das Konstrukt AnkX₁₋₈₀₀ verwendet. Rekombinant hergestelltes AnkX₁₋₈₀₀ wird im Folgenden mit AnkX (ohne Angabe des AS-Bereichs 1-800) bezeichnet. Bei Experimenten bei denen ebenfalls AnkX-Konstrukte anderer Länge eingesetzt werden, wird der AS-Bereich 1-800 jedoch angegeben.

Um ausreichend Protein für die präparative Komplexbildung mit Rab1b zur Verfügung zu stellen und um ein möglichst effizientes Enzym für die AnkX-basierte Markierungsstrategie zu generieren, wurde zunächst die rekombinante Expression und Aufreinigung von AnkX optimiert. Dazu wurde AnkX N-terminal mit unterschiedlichen Löslichkeitsfaktoren in Form von Fusionskonstrukten ausgestattet. Bei Löslichkeitsfaktoren handelt es sich um Proteine, die die Faltung und damit die Aktivität und die Ausbeute eines Zielproteins während der rekombinanten Proteinexpression positiv beeinflussen können. Als Löslichkeitsfaktoren für AnkX wurden die Proteine MBP, GFP, Glutathion-S-Transferase (GST) und eine Domäne der Haloalkan-Dehalogenase (Halo) getestet. Dazu wurde AnkX rekombinant mit den unterschiedlichen Löslichkeitsfaktoren exprimiert und die katalytische Effizienz sowie die Ausbeute des Enzyms im Anschluss an die Proteinreinigung bestimmt (Abbildung 12b-d).

Dabei gilt zu beachten, dass die Löslichkeitsfaktoren während der Proteinreinigung durch gezielte proteolytische Spaltung wieder von AnkX entfernt wurden, so dass am Ende der Reinigung in allen Fällen das gleiche AnkX-Konstrukt für die Aktivitätstests vorlag. Unterschiede in der katalytischen Effizienz und der Ausbeute ergeben sich demnach ausschließlich aus dem Einfluss des Löslichkeitsfaktors während der Expression und Translation des Fusionsproteins. Als Referenz diente Enzym, welches ohne Löslichkeitsfaktor exprimiert wurde.

Die katalytische Effizienz der aufgereinigten AnkX-Varianten wurde mit Hilfe eines etablierten Ansatzes bestimmt.³¹ Dieser Ansatz beruht darauf, dass die intrinsische Tryptophanfluoreszenz von Rab1b bei der Phosphocholinierung von S76_{Rab1b} um 8-10 % ansteigt. Um die Aktivität der aufgereinigten Enzymvarianten zu bestimmen, wurde die Tryptophanfluoreszenz von Rab1b während der Phosphocholinierung durch AnkX zeitaufgelöst verfolgt (Abbildung 12b). Durch die Anpassung der Messkurven an eine exponentielle Funktion wurde die beobachtete Geschwindigkeitskonstante (k_{obs}) der AnkX-vermittelten Phosphocholinierung ermittelt. Division von k_{obs} durch die eingesetzte Enzymkonzentration lieferte die katalytische Effizienz ($k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$) der eingesetzten Enzymvarianten (Abbildung 12c).

Durch den Einsatz der verschiedenen Löslichkeitsfaktoren konnte in allen Fällen ein moderater Anstieg der katalytischen Effizienz von AnkX im Vergleich zur katalytischen Effizienz des Enzyms bei der Expression ohne Löslichkeitsfaktor beobachtet werden. Bei der Expression mit Halo nimmt der k_{cat}/K_M -Wert von AnkX dabei am meisten zu und ist in etwa doppelt so hoch wie der k_{cat}/K_M -Wert von AnkX bei der Expression ohne Löslichkeitsfaktor.

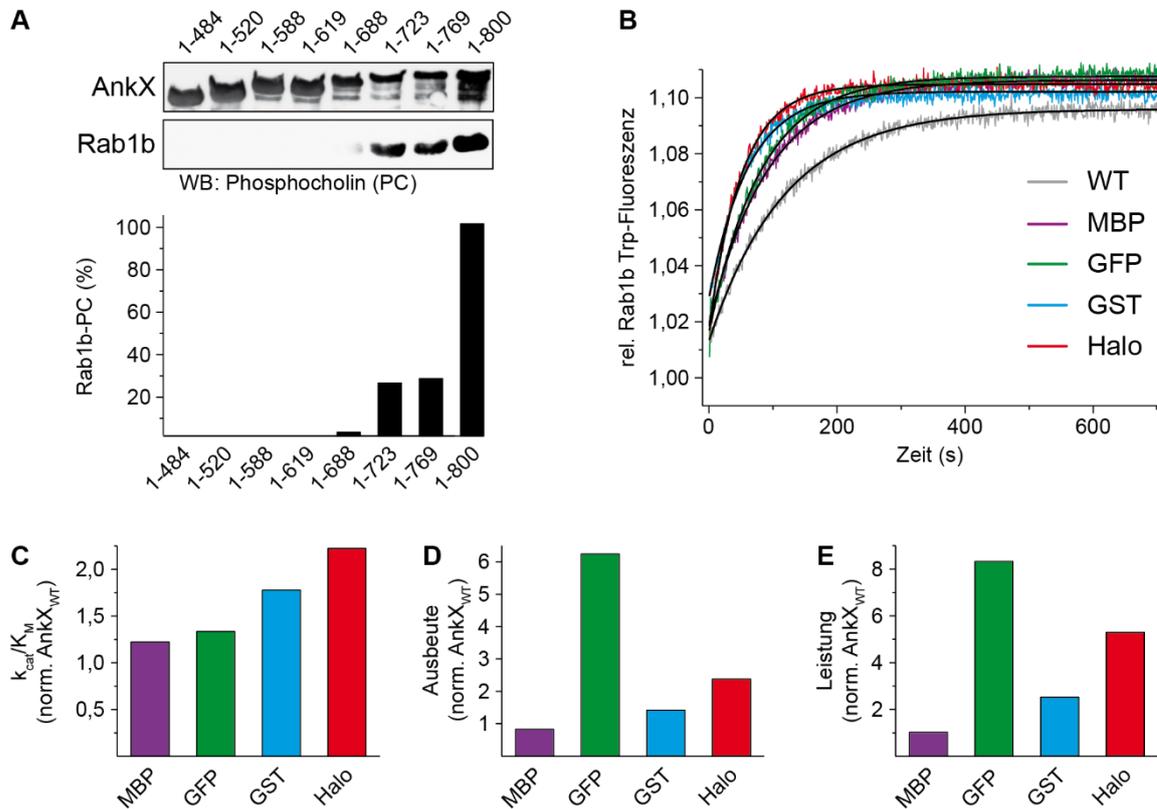


Abbildung 12 Optimierung der Expression und Reinigung von AnkX. **(A)** Western-Blot-basierte Bestimmung der katalytischen Aktivität von C-terminalen AnkX-Verkürzungsstrukturen. Rab1b (5 μ M) wurde mit CDP-Cholin (1 mM) und *E. coli*-Zellysate (2 mg/ml Gesamtprotein), welches ein rekombinant exprimiertes AnkX-Verkürzungsstruktur enthielt, für 2 h bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Anschließend wurde die Menge an Rab1b-PC über Western Blot (WB) mit einem PC-Antikörper bestimmt. Das Signal von Rab1b-PC wurde auf das Signal von autophosphocholinisiertem AnkX (AnkX-PC) normalisiert (siehe Anhang Tabelle 25). **(B)** Auswirkung unterschiedlicher Löslichkeitsfaktoren auf die katalytische Aktivität von AnkX. Rab1b (5 μ M) wurde mit CDP-Cholin (1 mM) bei 25 °C in einer Fluoreszenzküvette vorgelegt und der Anstieg der Rab1b-Tryptophan (Trp)-Fluoreszenz nach Zugabe von AnkX (100 nM) aufgenommen. Durch die Anpassung der Fluoreszenzkurven an eine exponentielle Funktion (schwarze Linien) wurde die beobachtete Geschwindigkeitskonstante (k_{obs}) ermittelt. Als Referenz diente Enzym, welches ohne Löslichkeitsfaktor exprimiert wurde (WT). **(C)** Einfluss unterschiedlicher Löslichkeitsfaktoren auf die katalytische Effizienz (k_{cat}/K_M) von AnkX. Die k_{cat}/K_M -Werte wurden berechnet, indem k_{obs} aus Teilabbildung (B) durch die eingesetzte Enzymkonzentration (100 nM) geteilt wurde. Anschließend wurden die k_{cat}/K_M -Werte auf den k_{cat}/K_M -Wert von AnkX bei der Expression ohne Löslichkeitsfaktor normalisiert (norm. AnkX_{WT}). **(D)** Einfluss der unterschiedlichen Löslichkeitsfaktoren auf die Ausbeute der Proteinreinigung von AnkX. Die Ausbeute der Proteinreinigung von AnkX wurde bestimmt und auf die Ausbeute der Proteinreinigung von AnkX bei der Expression ohne Löslichkeitsfaktor normalisiert (norm. AnkX_{WT}). **(E)** Leistung unterschiedlicher Löslichkeitsfaktoren für die katalytische Effizienz und für die Ausbeute der Proteinreinigung von AnkX. Die Leistung der Löslichkeitsfaktoren wurde definiert als das Produkt aus dem normalisierten k_{cat}/K_M -Wert aus Teilabbildung (C) und der normalisierten Ausbeute der Proteinreinigung aus Teilabbildung (D). Die Zahlenwerte aus den Teilabbildungen (C)-(E) sind in Tabelle 26 des Anhangs zu finden.

Zusätzlich wurden die Ausbeuten der Proteinreinigungen von AnkX bestimmt (Abbildung 12d). Verglichen mit der Expression von AnkX ohne Löslichkeitsfaktor führt die Expression mit MBP zu einer leichten Reduktion der Proteinausbeute. Bei der Expression mit GST und Halo kann eine moderate Erhöhung und bei der Expression mit GFP ein beachtlicher Anstieg der Proteinausbeute um das ca. 6fache im Vergleich zur Expression von AnkX ohne Löslichkeitsfaktor beobachtet werden.

Um ein Maß für die Leistung der unterschiedlichen Löslichkeitsfaktoren zu erhalten, wurde das Produkt gebildet aus der Änderung der katalytischen Effizienz und der Änderung der Proteinausbeute bei der Expression von AnkX mit dem jeweiligen Löslichkeitsfaktor (Abbildung 12e). Verglichen mit der Expression von AnkX ohne Löslichkeitsfaktor kann bei der Expression mit MBP keine Zunahme der Leistung beobachtet werden. Die Expression mit GST führt hingegen zu einer moderaten Erhöhung und die Expression mit Halo und GFP zu einem beachtlichen Anstieg der Leistung um das ca. 5- bzw. 8fache im Vergleich zur Expression von AnkX ohne Löslichkeitsfaktor.

Aufgrund der erhöhten Löslichkeit und dem damit verbundenen Anstieg der katalytischen Effizienz und der Proteinausbeute wurde AnkX für die nachfolgenden Experimente stets mit GFP als Löslichkeitsfaktor exprimiert.

3.1.2 AnkX-katalysierte Phosphocholinierung von Modellproteinen

Im vorherigen Kapitel wurde gezeigt, dass das Verkürzungs-konstrukt AnkX₁₋₄₈₄ das natürliche Substratprotein Rab1b im Vergleich zu AnkX₁₋₈₀₀ wesentlich langsamer phosphocholiniert. Bisher ist jedoch nicht bekannt, ob die C-terminale Verkürzung des Enzyms auch Auswirkungen auf die Phosphocholinierung von Modellproteinen hat. Abhängig von der Rolle der C-terminalen Ankyrin-*Repeats* wären zwei unterschiedliche Szenarien denkbar: Falls die C-terminalen Ankyrin-*Repeats* spezifische Wechselwirkungen zu Rab1b ausbilden, die zu Modellproteinen von keiner der beiden Enzymvarianten ausgebildet werden können, wäre denkbar, dass beide AnkX-Konstrukte Modellproteine mit der gleichen Geschwindigkeit phosphocholinieren. Falls die C-terminalen Ankyrin-*Repeats* ähnlich wie die vier N-terminalen Ankyrin-*Repeats* zur strukturellen Stabilisierung der FIC-Domäne beitragen und keine spezifischen Interaktionen zu Rab1b ausbilden, wäre denkbar, dass Modellproteine ähnlich wie das natürliche Substratprotein Rab1b vom verkürzten Konstrukt AnkX₁₋₄₈₄ deutlich langsamer phosphocholiniert werden als von AnkX₁₋₈₀₀.

Um die Aktivität der beiden Enzymvarianten gegenüber Modellproteinen abzuschätzen, wurde das Protein SUMO mit N-terminaler AnkX-Erkennungssequenz (TITSSYYR-SUMO) eingesetzt.⁴¹ Dazu wurde TITSSYYR-SUMO (50 µM) mit CDP-Cholin (1 mM) und AnkX₁₋₄₈₄ (5 µM) oder AnkX₁₋₈₀₀ (5 µM) über Nacht inkubiert. Anschließend wurde das Ausmaß

der Phosphocholinierung von TITSSYYR-SUMO über Massenspektrometrie bestimmt (Abbildung 13). Bei der Inkubation mit AnkX₁₋₈₀₀ fällt auf, dass TITSSYYR-SUMO an vier verschiedenen Stellen phosphocholiniert wird (Abbildung 13a). Die Beobachtung, dass TITSSYYR-SUMO an mehreren Positionen modifiziert wird, ist überraschend und steht in Konflikt zur Strategie der ortsspezifischen Proteinmarkierung. Da jedoch weder für das Peptid TITSSYYR noch für andere Modellproteine bisher eine derartige Mehrfachmodifizierung beobachtet wurde, wird an dieser Stelle angenommen, dass die Mehrfachmodifizierung speziell mit dem Modellprotein TITSSYYR-SUMO zusammenhängt. Bei der Inkubation von TITSSYYR-SUMO mit AnkX₁₋₄₈₄ lässt sich im gleichen Zeitraum eine Phosphocholinierung an zwei statt vier Position beobachten (Abbildung 13b). Das verkürzte AnkX₁₋₄₈₄ scheint das Modellprotein TITSSYYR-SUMO demnach langsamer zu phosphocholinieren als AnkX₁₋₈₀₀. Aufgrund der Mehrfachmodifizierung ist eine genauere Einschätzung der Enzymaktivitäten an dieser Stelle jedoch nicht möglich.

Es bleibt festzuhalten, dass AnkX₁₋₈₀₀ Modellproteine schneller zu modifizieren scheint als das verkürzte AnkX₁₋₄₈₄. Aus diesem Grund werden die folgenden Experimente zur Modifizierung von Modellproteinen größtenteils mit AnkX₁₋₈₀₀ durchgeführt.

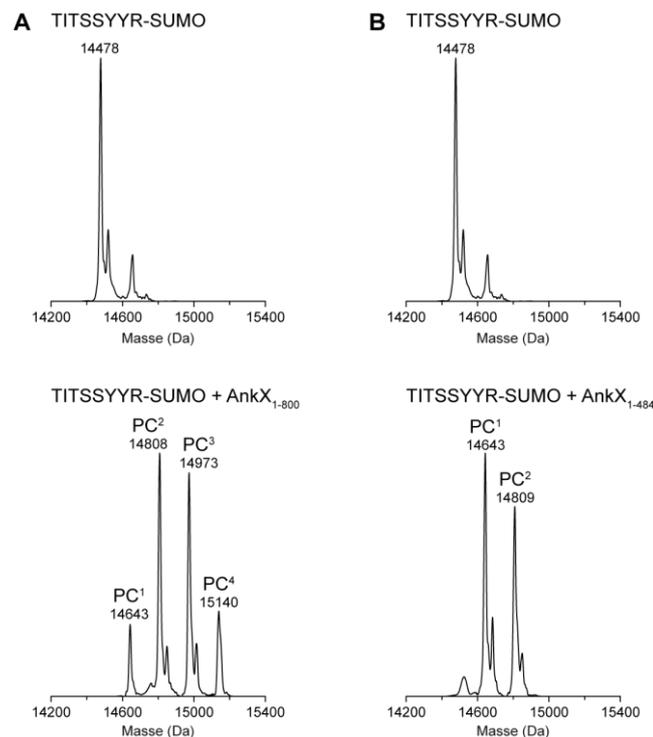


Abbildung 13 Phosphocholinierung von TITSSYYR-SUMO mit AnkX₁₋₈₀₀ und AnkX₁₋₄₈₄. **(A)** TITSSYYR-SUMO (50 μ M) wurde mit CDP-Cholin (1 mM) und AnkX₁₋₈₀₀ (5 μ M) über Nacht bei RT inkubiert. Anschließend wurde das Ausmaß der Modifizierung von TITSSYYR-SUMO mit Hilfe von Massenspektrometrie analysiert. Dabei wurden die Massen für ein-, zwei-, drei- und vierfach phosphocholiniertes TITSSYYR-SUMO detektiert (PC¹-PC⁴). **(B)** TITSSYYR-SUMO (50 μ M) wurde mit CDP-Cholin (1 mM) und AnkX₁₋₄₈₄ (5 μ M) über Nacht bei RT inkubiert. Anschließend wurde das Ausmaß der Modifizierung von TITSSYYR-SUMO mit Hilfe von Massenspektrometrie analysiert. Dabei wurden die Massen für ein- und zweifach phosphocholiniertes TITSSYYR-SUMO detektiert (PC¹ und PC²).

3.1.3 Kinetische Parameter der AnkX-vermittelten Hydrolyse von CDP-Cholin

Zusätzlich zu seiner Transferaseaktivität besitzt AnkX die Fähigkeit CDP-Cholin hydrolytisch zu CMP und PC zu spalten, ohne dabei die PC-Gruppe auf ein Substratprotein zu übertragen.³¹ Im Gegensatz zur Transferaseaktivität ist die Hydrolyseaktivität von AnkX unabhängig von der Anzahl an Ankyrin-*Repeats*, über die das Enzym verfügt. Statt dessen wird diese unerwünschte Nebenreaktion ausschließlich von der katalytischen FIC-Domäne vermittelt.³⁶ Um AnkX als effizientes Werkzeug für die enzymatische Proteinmarkierung einsetzen zu können, muss sichergestellt werden, dass der Transfer der PC-Gruppe auf ein Zielprotein schneller abläuft, als die konkurrierende Hydrolyse von CDP-Cholin. Um dies zu überprüfen sollten die kinetischen Parameter der AnkX-vermittelten Hydrolyse von CDP-Cholin über eine Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl. *high performance liquid chromatography*, HPLC)-basierte Michaelis-Menten-Kinetik bestimmt werden.

Dazu wurden unterschiedliche Konzentrationen an CDP-Cholin mit katalytischen Mengen an AnkX inkubiert. Die Produkte der zeitaufgelösten Hydrolyse von CDP-Cholin wurden mittels Ionenpaar-Umkehrphasen-Chromatographie über eine C18-Säule getrennt und anschließend quantifiziert (Abbildung 14a). In Abhängigkeit der eingesetzten CDP-Cholin-Konzentration wurde die beobachtete Geschwindigkeitskonstante (k_{obs}) der Hydrolysereaktion bestimmt, indem die Hydrolysegeschwindigkeit (v) durch die verwendete Enzymkonzentration geteilt wurde. Durch Auftragung von k_{obs} gegen die eingesetzte CDP-Cholin-Konzentration und durch eine Michaelis-Menten-Anpassung der Datenpunkte wurden die katalytische Konstante (k_{cat}) und die Michaelis-Menten-Konstante (K_{M}) bestimmt (Abbildung 14b). K_{M} gibt die CDP-Cholin-Konzentration an, bei der die halbmaximale Geschwindigkeit der CDP-Cholin-Hydrolyse erreicht wird. Der K_{M} -Wert ist damit ein Maß für die Affinität zwischen AnkX und CDP-Cholin.

Auf diese Weise konnte ein k_{cat} -Wert für die AnkX-vermittelte Hydrolyse von CDP-Cholin von $7,8 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ bestimmt werden. Der K_{M} -Wert für die Affinität zwischen AnkX und CDP-Cholin beträgt $6 \mu\text{M}$. Für die AnkX-vermittelte Hydrolyse von CDP-Cholin ergibt sich daraus ein $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ -Wert von $1,3 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Vergleicht man diesen Wert mit dem $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ -Wert für den Transfer der PC-Gruppe auf Rab1b von $1,3 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (siehe Tabelle 26), wird deutlich, dass die AnkX-katalysierte Hydrolyse von CDP-Cholin lediglich um einen Faktor von 100 langsamer abläuft als der PC-Transfer auf das optimale Substratprotein Rab1b. Die AnkX-vermittelte Hydrolyse von CDP-Cholin läuft somit teilweise schneller ab, als der PC-Transfer auf Modellproteine, welche 50-4000 mal langsamer phosphocholiniert werden als das natürliche Substratprotein Rab1b.⁴¹

Die ermittelten Zahlenwerte verdeutlichen, dass vor allem bei der AnkX-vermittelten Modifizierung von Modellproteinen, bei denen die Geschwindigkeit der Phosphocholinerung stark vermindert ist, ausreichend CDP-Cholin-Derivat eingesetzt werden muss, um eine quantitative Modifizierung des Modellproteins zu erzielen.

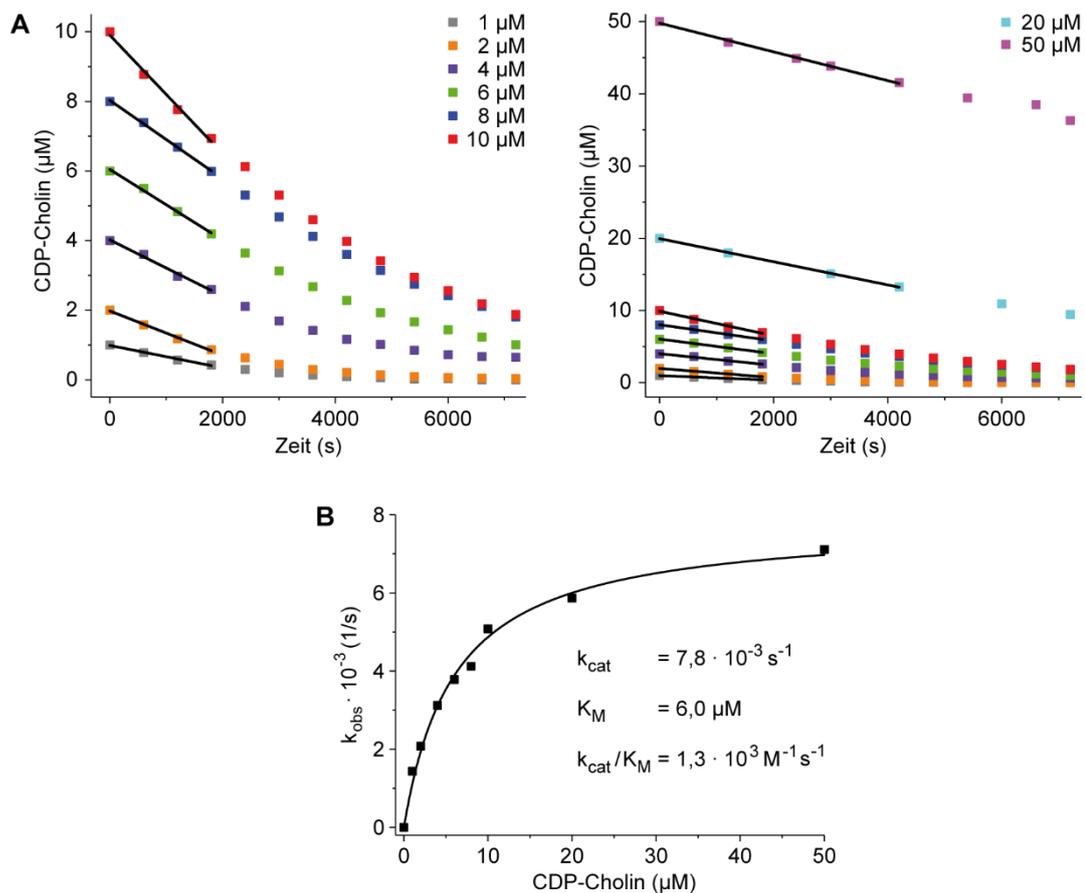


Abbildung 14 Michaelis-Menten-Kinetik der AnkX-vermittelten Hydrolyse von CDP-Cholin. **(A)** Unterschiedliche Konzentrationen an CDP-Cholin (1-50 µM) wurden mit AnkX (250 nM) bei 15 °C inkubiert. Die Produkte der zeitaufgelösten Hydrolyse von CDP-Cholin wurden mittels Ionenpaar-Umkehrphasen-Chromatographie über eine C18-Säule getrennt und quantifiziert. In Abhängigkeit der eingesetzten CDP-Cholin-Konzentration wurde die beobachtete Geschwindigkeitskonstante (k_{obs}) der Hydrolysereaktion bestimmt, indem die Hydrolysegeschwindigkeit (v) durch die verwendete Enzymkonzentration (250 nM) geteilt wurde. Dazu wurde v aus der Steigung der linearen Anpassung der Datenpunkte im Anfangsbereich der Hydrolysereaktion ermittelt (schwarze Linien). Die Zahlenwerte für v und k_{obs} sind in Tabelle 27 des Anhangs zu finden. **(B)** Durch Auftragung von k_{obs} gegen die eingesetzte Konzentration an CDP-Cholin und die anschließende Michaelis-Menten-Anpassung der Datenpunkte wurde die katalytische Konstante k_{cat} der CDP-Cholin-Hydrolyse und die Michaelis-Menten-Konstante K_M von AnkX für CDP-Cholin bestimmt. Aus diesen beiden Werten wurde die katalytische Effizienz (k_{cat}/K_M) der AnkX-vermittelten Hydrolyse von CDP-Cholin ermittelt.

3.2 Synthese und Evaluierung von CDP-Cholin-Derivaten

Nach der Charakterisierung und Optimierung des Enzyms AnkX sollten verschiedene CDP-Cholin-Derivate synthetisiert und auf ihre Eignung als Cosubstrate für die AnkX-katalysierte Phosphocholinierung getestet werden. Um die AnkX-basierte Markierungsstrategie möglichst flexibel zu gestalten, sollten dabei zwei Arten von CDP-Cholin-Derivaten hergestellt werden (Abbildung 15). Zum einen sollten Analoga generiert werden, die direkt mit Sonden wie Affinitätsankern oder Fluorophoren gekoppelt sind (Abbildung 15b). Diese Art von Sonden-gekoppelten Cosubstraten würde die Funktionalisierung von Zielproteinen in einem einzigen Schritt erlauben. Der Nachteil dieser Ein-Schritt-Markierung ist jedoch, dass für jede neue Sonde, die in ein Zielprotein eingeführt werden soll, stets ein neues CDP-Cholin-Derivat synthetisiert werden müsste.

Um diesen Syntheseaufwand zu umgehen, sollte eine zweite Sorte von CDP-Cholin-Derivaten generiert werden, die anstatt der Sonden gängige bioorthogonale Gruppen tragen (Abbildung 15c). Nach der Übertragung auf ein Zielprotein könnten diese Gruppen durch eine Vielzahl an komplementären Sonden adressiert werden und würden auf diese Weise die modulare Markierung von Zielproteinen in zwei Schritten erlauben. Im Folgenden wird zunächst auf die Synthese der CDP-Cholin-Derivate eingegangen, bevor anschließend ihre Eignung als Cosubstrate für die AnkX-katalysierte Phosphocholinierung untersucht wird.

3.2.1 Synthese bioorthogonaler CDP-Cholin-Derivate

Die Herstellung von CDP-Cholin-Derivaten, die mit einer funktionellen Sonde für die Ein-Schritt-Markierung von Zielproteinen ausgestattet sind, wurde im Rahmen einer Kooperation von Prof. Dr. Christian Hedberg und Dr. Philipp Ochtrop durchgeführt. Zu Beginn der Synthese war bereits bekannt, dass die Sonde Fluorescein von AnkX auf Substratproteine übertragen werden kann, wenn sie über einen PEG₄- oder PEG₆-Linker an die quartäre Ammoniumgruppe von CDP-Cholin angebracht ist. Wenn Fluorescein über einen PEG₂-Linker an CDP-Cholin konjugiert ist, ist die Übertragung hingegen nicht möglich.⁴¹ Aus diesem Grund wurden alle Sonden für die Ein-Schritt-Markierung von Zielproteinen über einen PEG₄-Linker an CDP-Cholin angebracht.

Die Synthese der bioorthogonalen CDP-Cholin-Derivate für die modulare Zwei-Schritt-Markierung von Zielproteinen wurde im Rahmen dieser Arbeit während eines Forschungsaufenthalts an der Universität Umeå unter Anleitung von Prof. Dr. Christian Hedberg und Dr. Philipp Ochtrop durchgeführt. Die verwendeten bioorthogonalen Gruppen (Alkin, Azid, DBCO, TCO und Tetrazin) sind kleiner als Fluorescein, weisen jedoch untereinander erhebliche Größenunterschiede auf. Daher wurden für die Anbringung der bioorthogonalen Gruppen an CDP-Cholin unterschiedlich lange Linker gewählt. Die relativ große DBCO-, TCO- und Tetrazingruppe wurde sowohl mit einem PEG₄-Linker als auch mit einem kürzeren Kohlenstoff-basierten C3-Linker mit CDP-Cholin verknüpft. Die Alkin- und Azidgruppe wurde wegen ihrer geringen Größe lediglich über einen C1- bzw. C3-Linker an CDP-Cholin angebracht.

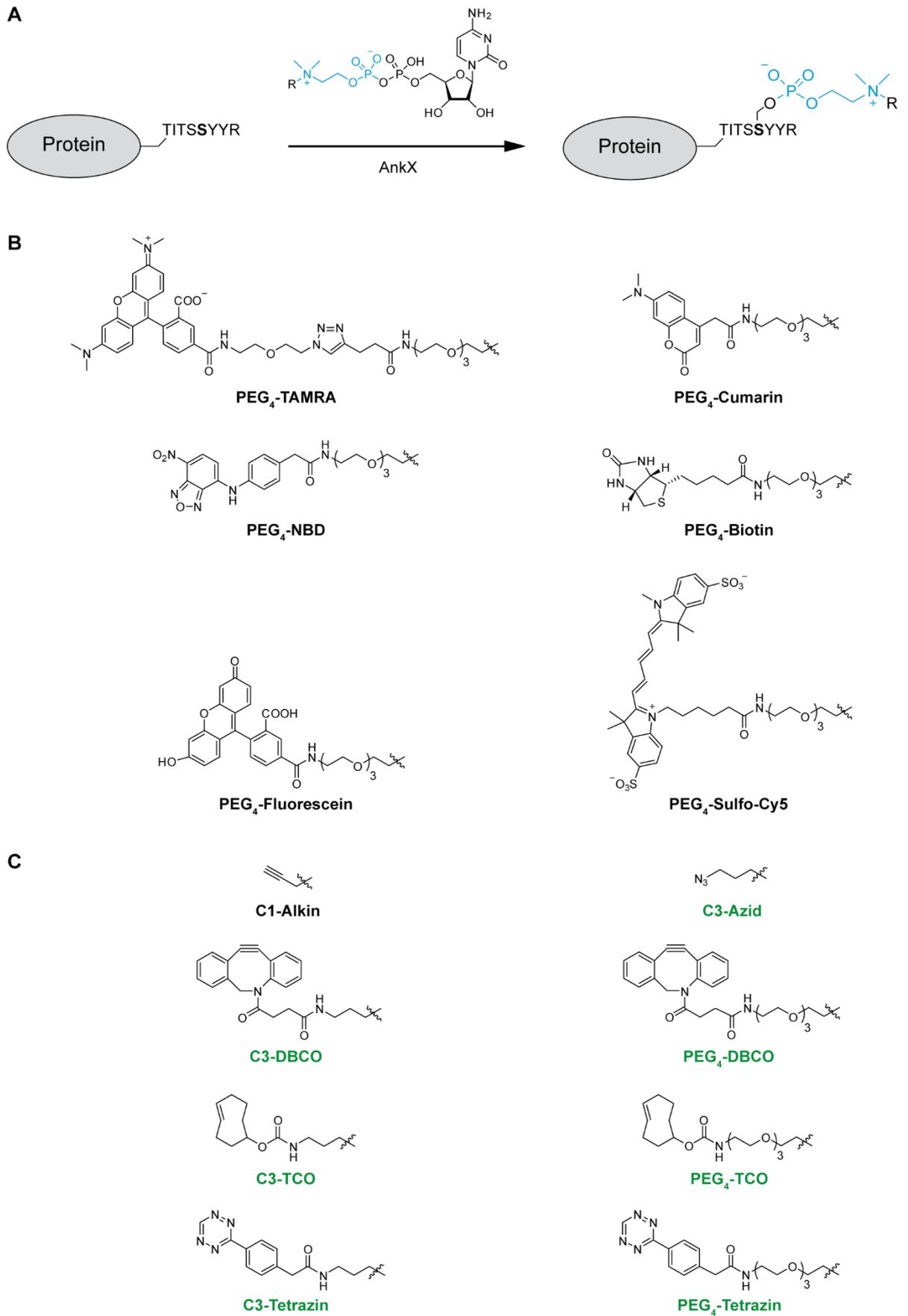


Abbildung 15 Synthetische CDP-Cholin-Derivate für die AnkX-basierte Proteinmarkierung. (Abbildungslegende siehe nächste Seite).

(A) Strategie der AnkX-basierten Proteinmarkierung. Zielproteine, die rekombinant mit der AnkX-Erkennungssequenz TITSSYYR ausgestattet sind, können durch die AnkX-katalysierte Phosphocholinierung mit synthetischen CDP-Cholin-Analoga modifiziert werden. Dabei kann CDP-Cholin an der quartären Ammoniumgruppe mit einem beliebigen Rest (R) synthetisch funktionalisiert werden. CDP-Cholin-Derivate wurden entweder mit **(B)** Sonden für die Ein-Schritt-Markierung oder **(C)** bioorthogonalen Gruppen für die modulare Zwei-Schritt-Markierung von Zielproteinen ausgestattet. Die konjugierten Sonden beinhalten den Affinitätsanker Biotin sowie eine Reihe an Fluorophoren: 5-Carboxytetramethylrhodamin (TAMRA), Cumarin, 7-Nitro-1,2,3-benzoxadiazol (NBD), Fluorescein und Sulfo-Cy5. Die konjugierten bioorthogonalen Gruppen beinhalten die kleine Alkin- und Azidgruppe sowie die größere DBCO-, TCO und Tetrazingruppe. Für die Kopplung der Sonde bzw. bioorthogonalen Gruppe an die quartäre Ammoniumgruppe von CDP-Cholin wurde ein Polyethylenglykol (PEG)- oder Kohlenstoff (C)-basierter Linker verwendet. Die Benennung der CDP-Cholin-Analoga erfolgt dabei nach Art und Länge des Linkers sowie nach der konjugierten Sonde bzw. bioorthogonalen Gruppe. Die in grün gekennzeichneten Derivate wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit während eines Forschungsaufenthalts an der Universität Umeå unter Anleitung von Prof. Dr. Christian Hedberg und Dr. Philipp Ochtrup synthetisiert. Die in schwarz gekennzeichneten Derivate wurden im Rahmen einer Kooperation von Prof. Dr. Christian Hedberg und Dr. Philipp Ochtrup synthetisiert.

Die Synthesen der CDP-Cholin-Derivate mit PEG₄- und C3-Linker folgten beide einem ähnlichen Schema: Ein Linker mit einer selektiv geschützten Aminogruppe wurde choliniert, phosphoryliert und an aktiviertes CMP gekoppelt. Anschließend wurde die Aminogruppe des entstandenen CDP-Cholin Konjugats entschützt und an den NHS-Ester der gewünschten bioorthogonalen Gruppe gekoppelt (Abbildung 16). Die Synthese der CDP-Cholin-Derivate mit PEG₄-Linker wurde ausgehend von 1-Bromo-Amino-PEG₄ in fünf Schritten durchgeführt (Abbildung 16a). Dabei war die Aminogruppe des Linkers, die am Ende der Synthese mit einer bioorthogonalen Gruppe funktionalisiert werden sollte, zunächst mit einer Carboxybenzyl (Cbz)-Gruppe geschützt. Durch Umsetzung mit 2-Dimethylaminoethanol wurde die cholinierte Form des Linkers als Bromid-Salz erzeugt. Anschließend wurde der cholinierte Linker mit Hilfe von Phosphoroxchlorid (POCl₃) und 2,6-Lutidin phosphoryliert. Im nächsten Schritt wurde der phosphocholinierte Linker mit Hilfe von Tetrazol an aktiviertes CMP-Morpholidat gekoppelt. Abschließend wurde die Aminogruppe des CDP-Cholin-PEG₄-Konjugats Palladium-katalysiert mit Wasserstoff entschützt und anschließend an den NHS-Ester einer bioorthogonalen Gruppe gekoppelt.

Die Synthese der CDP-Cholin-Derivate mit C3-Linker wurde ausgehend von 1,3-Dibromopropan in sechs Schritten durchgeführt (Abbildung 16b). Durch Umsetzung mit 2-Dimethylaminoethanol wurde zunächst die cholinierte Form des C3-Linkers als Bromid-Salz erzeugt. Durch Umsetzung mit Natriumazid (NaN₃) wurde eine als Azid maskierte Aminogruppe in den cholinierten Linker eingeführt. Der Azid-geschützte Linker wurde mit POCl₃ und 2,6-Lutidin phosphoryliert und anschließend mit Hilfe von Tetrazol an aktiviertes CMP-Morpholidat gekoppelt. Das entstandene CDP-Cholin-C3-Azid kann Palladium-katalysiert mit Wasserstoff entschützt und an den NHS-Ester einer bioorthogonalen Gruppe gekoppelt werden. Gleichzeitig stellt CDP-Cholin-C3-Azid selbst ein bioorthogonales Derivat dar.

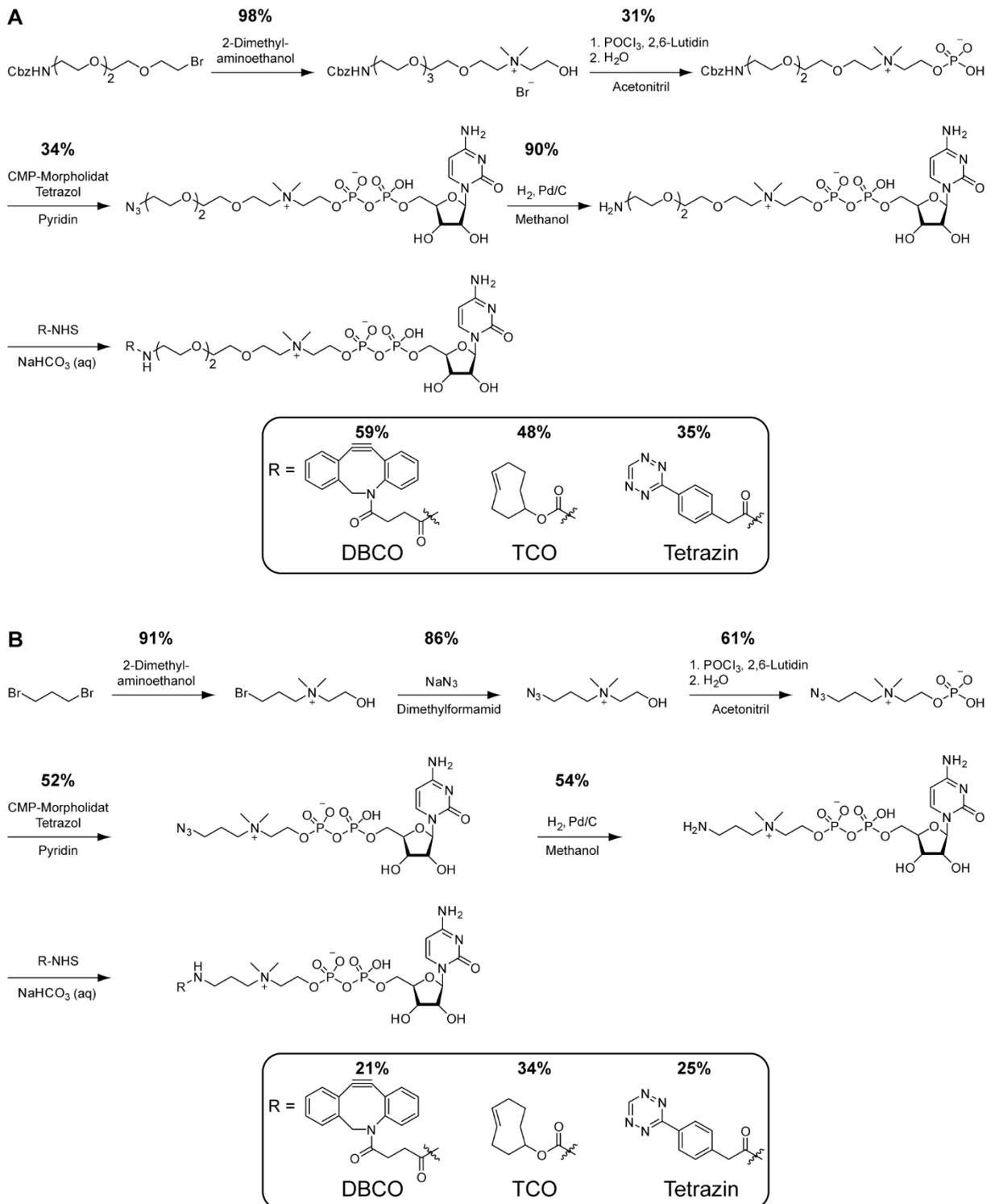


Abbildung 16 Schema und Ausbeute der Synthese bioorthogonaler CDP-Cholin-Derivate. Ein (A) PEG₄-Linker oder ein (B) C3-Linker mit selektiv geschützter Aminogruppe wurde choliniert, phosphoryliert und anschließend an aktiviertes CMP gekoppelt. Anschließend wurde die Aminogruppe des entstandenen CDP-Cholin-Konjugats entschützt und an den NHS-Ester der gewünschten bioorthogonalen Gruppe gekoppelt. Die Synthese wurde unter Anleitung von Prof. Dr. Christian Hedberg und Dr. Philipp Ochtrop an der Universität Umeå durchgeführt.

3.2.2 Evaluierung von CDP-Cholin-Derivaten für die Proteinmarkierung

Nachdem eine Reihe an CDP-Cholin-Derivaten für die Ein- und Zwei-Schritt-Markierung von Zielproteinen zur Verfügung stand, sollte getestet werden, mit welcher Effizienz die hergestellten Analoga von AnkX als Cosubstrate der enzymatischen Phosphocholinierung erkannt werden. Zu diesem Zweck sollte für jedes CDP-Cholin-Derivat der k_{cat}/K_M -Wert für die AnkX-katalysierte Enzymreaktion bestimmt werden. Da die Modifizierung von Modellproteinen allgemein sehr langsam abläuft, wurde Rab1b als Substratprotein für die vergleichende Evaluierung der CDP-Cholin-Derivate gewählt. Auf diese Weise ist eine zuverlässige Bestimmung des k_{cat}/K_M -Werts gewährleistet. Zudem konnte bereits gezeigt werden, dass Rab1b und Modellproteine ein identisches Cosubstratprofil besitzen.⁴¹ Die relativen k_{cat}/K_M -Werte der CDP-Cholin-Derivate für die Phosphocholinierung von Rab1b lassen sich damit qualitativ auf das System der Modellproteine übertragen.

Für die Bestimmung des k_{cat}/K_M -Werts wurde Rab1b (50 μ M) mit einem CDP-Cholin-Derivat (200 μ M) und katalytischen Mengen an AnkX (1 μ M) inkubiert. Abhängig von den Eigenschaften der von AnkX übertragenen Sonde bzw. funktionellen Gruppe wurden unterschiedliche Methoden eingesetzt, um die Modifizierung von Rab1b zeitabhängig zu bestimmen (Abbildung 17). Für die Übertragung großer Sonden wie TAMRA, Cumarin und NBD, erfolgte die Bestimmung durch die Bandenverschiebung von modifiziertem gegenüber unmodifiziertem Rab1b in der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (engl. *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE). Im Fall des PEG₄-Biotin-Derivats erfolgte die Quantifizierung von modifiziertem Rab1b durch Western Blot mit einem Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase (engl. *horseradish peroxidase*, HRP)-Konjugat. Bei den bioorthogonalen CDP-Cholin-Derivaten wurde die Modifizierung von Rab1b durch In-Gel-Fluoreszenz mit einer komplementären Cy5-Sonde verfolgt. Um den k_{cat}/K_M -Wert durch eine exponentielle Anpassung der Messpunkte zuverlässig bestimmen zu können, musste sichergestellt werden, dass Rab1b zum Zeitpunkt der letzten Probennahme vollständig modifiziert vorlag. Durch Massenspektrometrie konnte gezeigt werden, dass dies bei allen untersuchten CDP-Cholin-Derivaten der Fall ist (Anhang Abbildung 42). Zudem konnte durch Massenspektrometrie gezeigt werden, dass Lem3 die eingeführte Modifikation in allen Fällen wieder vollständig abspalten kann (Anhang Abbildung 42).

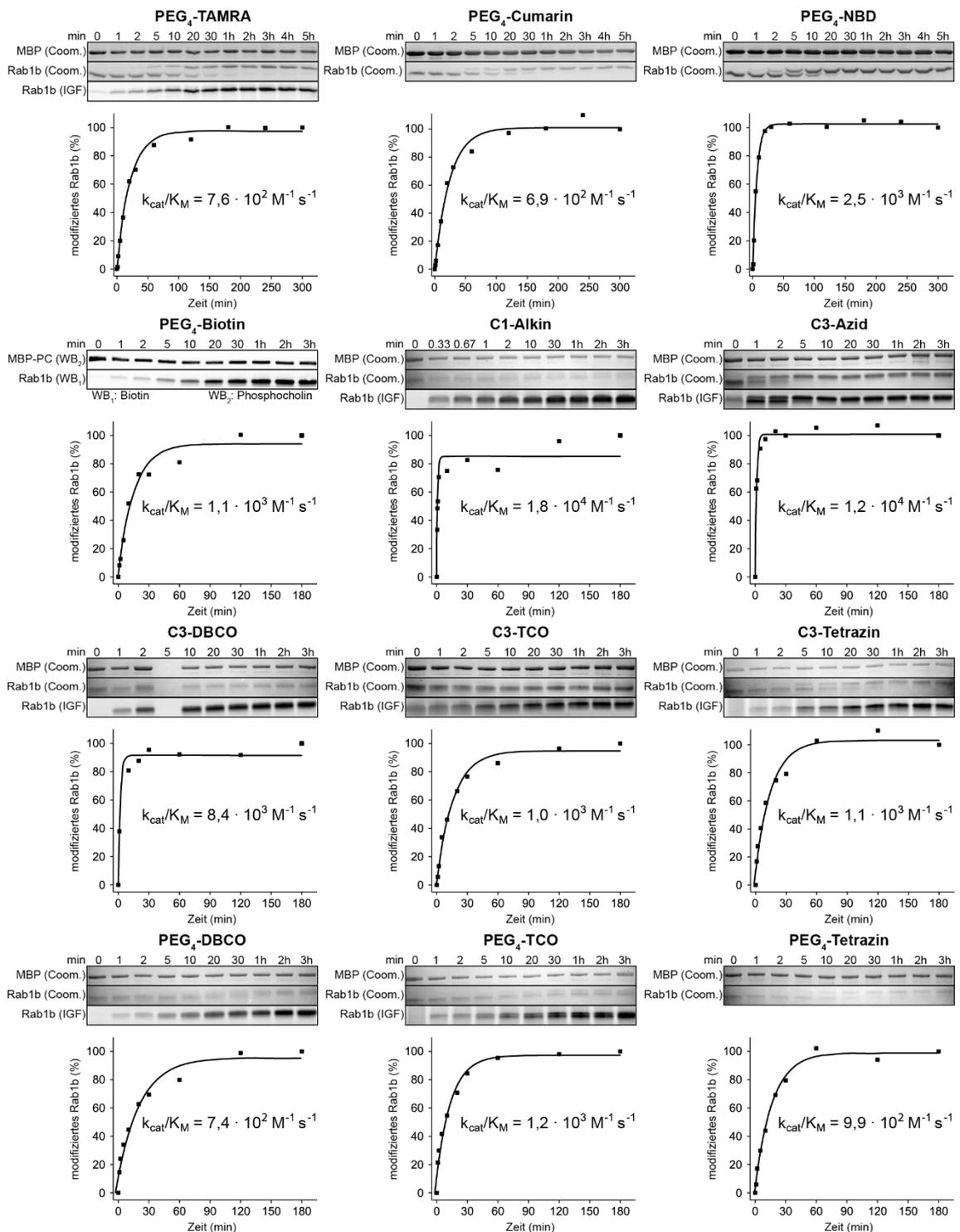


Abbildung 17 Bestimmung der k_{cat}/K_M -Werte unterschiedlicher CDP-Cholin-Analoga für die AnkX-katalysierte Phosphocholinierung von Rab1b. Rab1b (50 μM) wurde mit einem CDP-Cholin-Derivat (200 μM) und katalytischen Mengen an AnkX (1 μM) bei 25 $^\circ\text{C}$ inkubiert und die Phosphocholinierung von Rab1b zeitabhängig verfolgt. Die Quantifizierung von modifiziertem Rab1b erfolgte durch die Bandenverschiebung auf einem Coomassie-gefärbten (Coom.) SDS-PAGE-Gel (PEG₄-TAMRA, PEG₄-Cumarin, PEG₄-NBD und PEG₄-Tetrazin), Western Blot (WB) mit einem Streptavidin-HRP-Konjugat (PEG₄-Biotin) oder In-Gel-Fluoreszenz (IGF) mit einer komplementären Cy5-Sonde (C3-DBCO, C3-TCO, C3-Tetrazin, PEG₄-DBCO und PEG₄-TCO). Das Signal von modifiziertem Rab1b wurde auf das Signal der eingesetzten Ladekontrolle (MBP (Coom.) oder MBP-PC (WB)) normalisiert. Die normalisierten Werte (in % des Werts der letzten Probenahme) wurden gegen die Zeit aufgetragen und exponentiell angepasst. Die auf diese Weise erhaltene beobachtete Geschwindigkeitskonstante (k_{obs}) wurde durch die eingesetzte Enzymkonzentration (1 μM) geteilt, um den k_{cat}/K_M -Wert des CDP-Cholin-Derivats für die AnkX-katalysierte Phosphocholinierung von Rab1b zu bestimmen.

Setzt man die k_{cat}/K_M -Werte der untersuchten CDP-Cholin-Derivate zur katalytischen Effizienz des natürlichen Cosubstrats CDP-Cholin ins Verhältnis, fällt auf, dass die k_{cat}/K_M -Werte des C1-Alkin-, C3-Azid- und C3-DBCO-Derivats mit 14 %, 9 % und 6 % der katalytischen Effizienz von CDP-Cholin lediglich eine Größenordnung unter dem natürlichen Cosubstrat liegen (Abbildung 18). Die k_{cat}/K_M -Werte aller anderen CDP-Cholin-Derivate befinden sich mit 1-2 % der katalytischen Effizienz von CDP-Cholin in einem ähnlichen Bereich und liegen zwei Größenordnungen unter dem natürlichen Cosubstrat. Die k_{cat}/K_M -Werte aller CDP-Cholin-Derivate mit PEG₄-Linker liegen damit in einem sehr ähnlichen Bereich. Dies lässt vermuten, dass der PEG₄-Linker lang genug ist, um sich in der CDP-Cholin-Bindetasche von AnkX so auszurichten, dass die konjugierte Sonde bzw. bioorthogonale Gruppe außerhalb der Bindetasche positioniert werden kann. Diese Ergebnisse legen nahe, dass jede beliebige Sonde von AnkX auf ein Substratprotein übertragen werden kann, wenn die Sonde über einen Linker mit mindestens vier PEG-Einheiten an CDP-Cholin gekoppelt ist.

Bei den bioorthogonalen CDP-Cholin-Analoga mit C1-/C3-Linker ist anzunehmen, dass die Länge des Linkers nicht ausreicht, um die bioorthogonale Gruppe außerhalb der relativ tiefen CDP-Cholin-Bindetasche von AnkX zu positionieren.³⁸ Die katalytische Effizienz dieser CDP-Cholin-Derivate dürfte somit davon abhängen, wie gut die bioorthogonale Gruppe in die CDP-Cholin-Bindetasche passt. Aufgrund ihres geringen sterischen Anspruchs werden das C1-Alkin- und C3-Azid-Derivat mit 14 % und 9 % der katalytischen Effizienz von CDP-Cholin erwartungsgemäß relativ schnell auf Rab1b übertragen. Überraschenderweise wird das C3-DBCO-Derivat, welches die sterisch anspruchsvollste bioorthogonale Gruppe trägt, mit 6 % der katalytischen Effizienz von CDP-Cholin ähnlich schnell auf Rab1b übertragen wie die beiden kleinen Derivate. Der Transfer des C3-TCO- und C3-Tetrazin-Derivats findet mit 0,8 % der katalytischen Effizienz von CDP-Cholin um eine Größenordnung langsamer statt und liegt im Bereich der CDP-Cholin-Derivate mit PEG₄-Linker. Die sterisch besonders anspruchsvolle DBCO-Gruppe scheint demnach besser in die CDP-Cholin-Bindetasche zu passen als die TCO- und Tetrazingruppe.

Die Tatsache, dass alle CDP-Cholin-Derivate mit C1-/C3-Linker von AnkX toleriert werden, zeigt, dass das Enzym ein breites Spektrum an Cosubstraten toleriert, ohne dass die CDP-Cholin-Bindetasche mutiert werden muss. Durch den Einsatz des PEG₄-Linkers scheint es möglich zu sein, jede beliebige Sonde auf ein Zielprotein zu übertragen. Die katalytische Effizienz scheint dabei unabhängig von der Sonde zwei Größenordnungen unter der katalytischen Effizienz des natürlichen Cosubstrats CDP-Cholin zu liegen. Bei der Übertragung von chemischen Gruppen, die generell kleiner als funktionelle Sonden sind, besteht die Möglichkeit, die Übertragungsgeschwindigkeit durch Verwendung eines kurzen Kohlenstoff-Linkers an Stelle des PEG₄-Linkers zu erhöhen (vgl. C3-DBCO und PEG₄-DBCO). Eine Erhöhung der Übertragungsgeschwindigkeit ist allerdings nicht für jede funktionelle Gruppe

möglich und muss von Fall zu Fall evaluiert werden (vgl. C3-TCO und PEG₄-TCO sowie C3-Tetrazin und PEG₄-Tetrazin). Mit dem C1-Alkin-, C3-Azid und C3-DBCO-Derivat konnten drei funktionalisierte Cosubstrate generiert werden, deren k_{cat}/K_M -Werte lediglich eine Größenordnung unter der katalytischen Effizienz des natürlichen Cosubstrats von AnkX liegen.

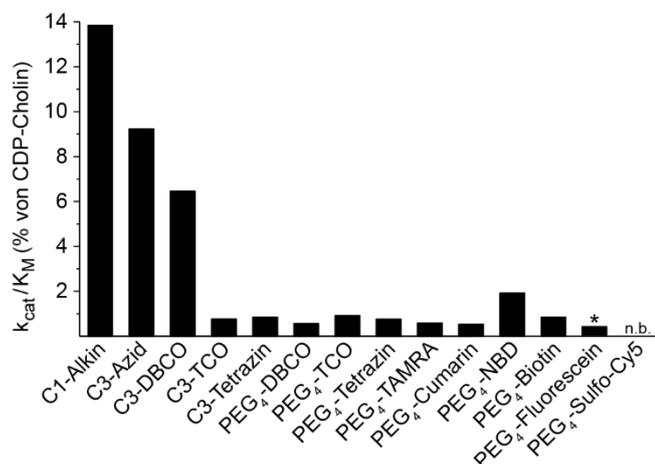


Abbildung 18 Vergleich der k_{cat}/K_M -Werte unterschiedlicher CDP-Cholin-Analoga für die AnkX-katalysierte Phosphocholinierung von Rab1b. Der k_{cat}/K_M -Wert des PEG₄-Fluorescein-Derivats (*) wurde von Heller et al. zu $5,0 \cdot 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ bestimmt (entspricht 0,4 % von CDP-Cholin).⁴¹ Der k_{cat}/K_M Wert des PEG₄-Sulfo-Cy5-Derivats wurde nicht bestimmt (n.b.). Die Zahlenwerte der katalytischen Effizienzen sind in Tabelle 28 des Anhangs zu finden.

3.3 AnkX/Lem3-basierte Zweifach-Markierung von Zielproteinen

Nachdem ein breites Spektrum an funktionellen CDP-Cholin-Derivaten für die Ein- und Zweischritt-Markierung von Proteinen zur Verfügung gestellt werden konnte, sollte eine Strategie entwickelt werden, um Zielproteine ortsspezifisch mit zwei unterschiedlichen Sonden auszustatten. Dazu wurde die Beobachtung genutzt, dass AnkX nicht nur die Erkennungssequenz TITSS_YYR (S-Sequenz) aus Rab1b modifizieren kann, sondern auch die Erkennungssequenz TITSI_YYR (T-Sequenz) aus Rab35. Anstelle des Serins modifiziert AnkX dabei ein Threonin. Im Gegensatz zum Serin kann die Modifikation des Threonins jedoch nicht durch Lem3 abgespalten werden. Stattet man ein Zielprotein rekombinant mit der S- und T-Sequenz aus, sollte es durch den abwechselnden Einsatz von AnkX und Lem3 in Kombination mit zwei unterschiedlichen CDP-Cholin-Derivaten möglich sein, zwei verschiedene Sonden ortsspezifisch an der S- und T-Sequenz zu installieren.

Bei der Wahl eines geeigneten Zielproteins für die Etablierung der Zweifach-Markierung wurde berücksichtigt, dass Modellproteine um einen Faktor von 50-4000 langsamer phosphocholiniert werden als das natürliche Substratprotein Rab1b.⁴¹ Um die Strategie der Zweifach-Markierung in einem angemessenen Zeitrahmen evaluieren zu können, wurde darauf verzichtet, ein Modellprotein rekombinant mit der S- und T-Sequenz auszustatten. Bei einem solchen Konstrukt würde sich die Modifizierung beider Sequenzen über verhältnismäßig

lange Zeiträume erstrecken. Stattdessen wurde ein Fusionskonstrukt aus dem Modellprotein MBP und Rab1b entworfen (Abbildung 19a). Rab1b ist das optimale Substratprotein von AnkX und besitzt intrinsisch die S-Sequenz. Das Modellprotein MBP wurde N-terminal mit der T-Sequenz ausgestattet.

Wird dieses Fusionskonstrukt in einem ersten AnkX-vermittelten Markierungsschritt mit einer Sonde A modifiziert, so sollte die Sonde A sowohl auf die S- als auch auf die T-Sequenz übertragen werden. Durch anschließende Zugabe von Lem3 sollte Sonde A spezifisch von der S-Sequenz entfernt werden. An der T-Sequenz sollte die Modifikation mit Sonde A jedoch bestehen bleiben. Die S-Sequenz sollte daher in einem zweiten AnkX-vermittelten Markierungsschritt mit einer Sonde B modifiziert werden können. Diese Strategie sollte gewährleisten, dass die T-Sequenz an MBP ortsspezifisch mit Sonde A und die S-Sequenz in Rab1b ortsspezifisch mit Sonde B modifiziert wird. Um nach jedem Schritt der Zweifach-Markierung den Ort der Modifizierung verfolgen zu können, wurde im Fusionskonstrukt eine Schnittstelle für die *Tobacco etch virus* (TEV)-Protease zwischen MBP und Rab1b installiert. Die verwendeten CDP-Cholin-Derivate können dabei entweder direkt mit zwei unterschiedlichen Sonden funktionalisiert sein oder über zwei unterschiedliche bioorthogonale Gruppen verfügen, die durch komplementäre Sonden adressiert werden können.

Zunächst wurde die Strategie der Zweifach-Markierung mit CDP-Cholin-Derivaten evaluiert, die direkt an eine Sonde gekoppelt sind. Dazu wurden das grün fluoreszierende PEG₄-Fluorescein-Derivat und das rot fluoreszierende PEG₄-TAMRA-Derivat gewählt (siehe Abbildung 15b). Der ortsspezifische Einbau der beiden Sonden in das Fusionskonstrukt wurde im Verlauf der Zweifach-Markierung durch analytischen TEV-Verdau und In-Gel-Fluoreszenz der Proben verfolgt (Abbildung 19b).

Nach der ersten Markierung mit dem PEG₄-Fluorescein-Derivat befindet sich die Fluorescein-Sonde sowohl an MBP als auch an Rab1b. Nach der Demodifizierung mit Lem3 ist die Fluorescein-Modifikation vollständig aus Rab1b entfernt, bleibt an MBP jedoch bestehen. Nach der zweiten Markierung mit dem PEG₄-TAMRA-Derivat befindet sich die TAMRA-Sonde ausschließlich in Rab1b, nicht jedoch an MBP. Es ist zu beachten, dass beim zweiten Markierungsschritt bereits vor dem Verdau mit der TEV-Protease freies Rab1b im TAMRA-Kanal zu sehen ist. Diese Beobachtung legt nahe, dass das Fusionskonstrukt nicht über die volle Dauer der Zweifach-Markierung stabil ist, sondern spontan degradiert. Des Weiteren können nach dem Verdau mit der TEV-Protease noch geringe Spuren an ungeschnittenem Fusionskonstrukt im TAMRA-Kanal beobachtet werden. Die Präsenz von freiem TAMRA-modifiziertem Rab1b vor TEV-Verdau und der unvollständige TEV-Verdau des Fusionskonstrukts stehen jedoch in keinem Widerspruch zum Erfolg der Zweifach-Markierung: Rab1b ist ausschließlich mit der TAMRA Sonde ausgestattet, MBP ausschließlich mit der Fluorescein-Sonde. Auffällig ist jedoch, dass MBP nach der ersten Markierung deutlich

schwächer mit der Fluorescein-Sonde modifiziert ist als Rab1b. Dies deutet darauf hin, dass MBP nicht quantitativ mit der Fluorescein-Sonde markiert wurde. Die prinzipielle Anwendbarkeit der AnkX/Lem3-basierten Strategie zur Zweifach-Markierung von Zielproteinen kann mit diesem Experiment jedoch bestätigt werden.

Zusätzlich sollte die Methode der ortsspezifischen Zweifach-Markierung mit den zur Verfügung stehenden bioorthogonalen CDP-Cholin-Derivaten evaluiert werden. Die beiden Paare aus bioorthogonaler Gruppe und komplementärer Sonde mussten dabei so gewählt werden, dass die Paare zueinander orthogonal sind und nicht miteinander kreuzreagieren. Da im vorangegangenen Experiment der MBP-Part des Fusionskonstrukts nicht quantitativ markiert werden konnte, wurde für das geplante Experiment das C1-Alkin-Derivat als das CDP-Cholin-Analogon mit der höchsten katalytischen Effizienz für die Markierung des MBP-Parts gewählt. Mittels CuAAC kann die übertragene Alkingruppe mit einer Azid-funktionalisierten Sonde gekoppelt werden. Orthogonal zum Alkin/Azid-Paar ist das Tetrazin/TCO-Paar. Für die Markierung des Rab1b-Parts wurde das PEG₄-TCO-Derivat gewählt. Die eingeführte TCO-Gruppe kann durch eine komplementäre Tetrazin-Sonde adressiert werden. Als Sonden wurden das grün fluoreszierende Rhodamin-Azid und das rot fluoreszierende Cy5-Tetrazin gewählt. Die Zweifach-Markierung wurde dabei so durchgeführt, dass zunächst das C1-Alkin- und C3-TCO-Derivat in das Fusionskonstrukt eingebaut wurden. Im Anschluss wurden die eingeführten bioorthogonalen Gruppen gleichzeitig mit einem Gemisch der komplementären Sonden markiert. Nach jedem Schritt der Zweifach-Markierung wurden analytische Proben genommen und mit einem Gemisch der komplementären Sonden inkubiert. Durch anschließenden Verdau mit der TEV-Protease und In-Gel-Fluoreszenz wurde der ortsspezifische Einbau der beiden bioorthogonalen Gruppen verfolgt (Abbildung 19c).

Nach dem ersten Markierungsschritt mit dem C1-Alkin-Derivat kann die Alkin-Modifikation durch das Rhodamin-Azid sowohl an MBP als auch an Rab1b nachgewiesen werden. Obwohl für den ersten Markierungsschritt mit dem C1-Alkin-Derivat diesmal das effizienteste CDP-Cholin-Derivat eingesetzt wurde, ist die Modifizierung von MBP erneut deutlich schwächer als von Rab1b. Auch mit dem effizienten C1-Alkin-Derivat ist folglich unter den gewählten Bedingungen keine quantitative Modifizierung von MBP möglich. Bei der anschließenden Inkubation mit Lem3 kann zwar der Großteil der Alkin-Modifikation von Rab1b entfernt werden, jedoch bleiben geringe Spuren der Alkin-Modifikation an Rab1b zurück. Nach der zweiten Markierung mit dem PEG₄-TCO-Derivat kann die TCO-Modifikation durch das Cy5-Tetrazin ausschließlich an Rab1b nachgewiesen werden, nicht jedoch an MBP. Das ausschließlich Alkin-modifizierte MBP konnte demnach ortsspezifisch mit dem Rhodamin-Azid markiert werden. Da Rab1b bei der Inkubation mit Lem3 nicht vollständig von der Alkin-Modifikation befreit werden konnte, trägt das Protein neben der TCO-Modifikation auch Rückstände der Alkin-Modifikation und wird sowohl mit dem Cy5-Tetrazin als auch in geringem Maße mit dem

Rhodamin-Azid markiert. Aufgrund der unvollständigen Demodifizierung durch Lem3 ist die ortsspezifische Markierung von Rab1b in diesem Experiment demnach nicht gelungen.

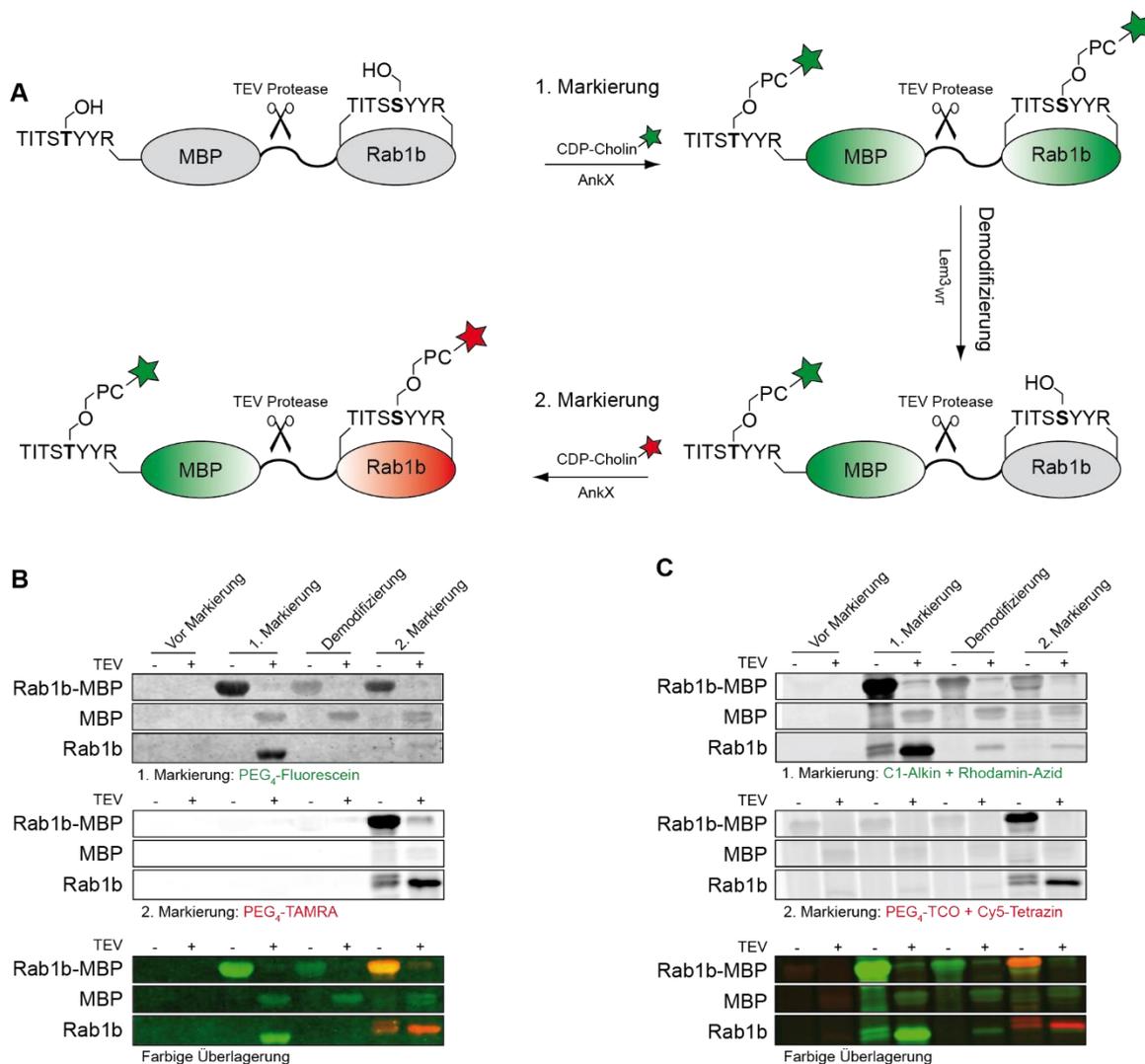


Abbildung 19 AnkX/Lem3-basierte Zweifach-Markierung eines MBP-Rab1b-Fusionskonstrukts. **(A)** Strategie der Zweifachmarkierung. Ein Fusionskonstrukt aus MBP, welches rekombinant mit der T-Sequenz (TITSTYYR) ausgestattet ist, und Rab1b, welches intrinsisch die S-Sequenz (TITSSYYR) trägt, kann durch den abwechselnden Einsatz von AnkX und Lem3 in drei Schritten ortsspezifisch mit zwei unterschiedlichen Sonden markiert werden. Im ersten Markierungsschritt werden die S- und T-Sequenz AnkX-katalysiert mit einer Sonde A (grüner Stern) ausgestattet. Durch Lem3 wird Sonde A wieder von der S-Sequenz entfernt. In einem Zweiten Markierungsschritt wird die T-Sequenz AnkX-katalysiert mit einer Sonde B (roter Stern) modifiziert. Bei den mit Hilfe von CDP-Cholin-Derivaten übertragenen Sonden A und B kann es sich entweder direkt um funktionelle Sonden handeln oder um bioorthogonale Gruppen, die über funktionelle Sonden adressiert werden können. **(B)** Durchführung der Zweifach-Markierung mit dem PEG₄-Fluorescein- und PEG₄-TAMRA-Derivat. Im ersten Markierungsschritt wurde das MBP-Rab1b-Fusionskonstrukt (40 µM) mit dem PEG₄-Fluorescein-Derivat (2 mM) und AnkX (4 µM) über Nacht bei RT inkubiert. Anschließend wurde das Fusionskonstrukt (30 µM) mit Lem3 (500 nM) für 3 h bei RT inkubiert. Im zweiten Markierungsschritt wurde das MBP-Rab1b-Fusionskonstrukt (5 µM) mit dem PEG₄-TAMRA-Derivat (40 µM) und AnkX (250 nM) für 1 h bei RT inkubiert. Nach jedem Schritt wurden analytische Proben mit der TEV-Protease (200 µg per mg Protein) bei 30 °C für 3 h verdaut, um die Modifizierung des MBP-Rab1b-Fusionskonstrukts ortsspezifisch mit Hilfe von In-Gel-Fluoreszenz zu verfolgen. Der Einbau der Fluorescein-Sonde wurde im grünen Kanal (obere Spur) verfolgt, der Einbau der TAMRA-Sonde im roten Kanal (mittlere Spur). Anschließend wurde eine farbige Überlagerung der beiden Kanäle (untere Spur) erstellt. (Fortsetzung der Abbildungslegende siehe nächste Seite).

(C) Durchführung der Zweifach-Markierung mit dem C1-Alkin- und PEG₄-TCO-Derivat. Im ersten Markierungsschritt wurde das MBP-Rab1b-Fusionskonstrukt (40 µM) mit dem C1-Alkin-Derivat (2 mM) und AnkX (4 µM) über Nacht bei RT inkubiert. Anschließend wurde das Fusionskonstrukt (30 µM) mit Lem3 (500 nM) für 3 h bei RT inkubiert. Im zweiten Markierungsschritt wurde das MBP-Rab1b-Fusionskonstrukt (5 µM) mit dem PEG₄-TCO-Derivat (40 µM) und AnkX (250 nM) für 1 h bei RT inkubiert. Nach jedem Schritt wurden analytische Proben mit Rhodamin-Azid und Cy5-Tetrazin inkubiert und anschließend mit der TEV-Protease (200 µg pro mg Protein) bei 30 °C für 3 h verdaut, um die Modifizierung des MBP-Rab1b-Fusionskonstrukts ortsspezifisch mit Hilfe von In-Gel-Fluoreszenz zu verfolgen. Der Einbau der Alkingruppe wurde nach Reaktion mit Rhodamin-Azid im grünen Kanal (obere Spur) verfolgt, der Einbau der TCO-Gruppe nach Reaktion mit Cy5-Tetrazin im roten Kanal (mittlere Spur). Anschließend wurde eine farbige Überlagerung der beiden Kanäle (untere Spur) erstellt.

Die Ergebnisse der beiden Experimente legen nahe, dass durch den abwechselnden Einsatz von AnkX und Lem3 die ortsspezifische Zweifach-Markierung eines Zielproteins, das mit der S- und T-Sequenz ausgestattet ist, prinzipiell möglich ist. Dabei muss vor allem darauf geachtet werden, dass im ersten Markierungsschritt die T-Sequenz vollständig modifiziert wird und bei anschließender Inkubation mit Lem3 die S-Sequenz vollständig demodifiziert wird.

Bei der Zweifach-Markierung des MBP-Rab1b-Fusionskonstrukts mit der Fluorescein- und der TAMRA-Sonde war die quantitative Modifizierung der T-Sequenz (MBP) mit der Fluorescein-Sonde nicht möglich. Daher wäre zu befürchten gewesen, dass die T-Sequenz (MBP) im zweiten Markierungsschritt zusätzlich zur Fluorescein-Sonde auch mit der TAMRA-Sonde markiert wird. Eine Modifizierung der T-Sequenz (MBP) mit der TAMRA-Sonde wurde mittels In-Gel-Fluoreszenz jedoch nicht detektiert. Der Grund dafür ist wohl, dass der zweite Markierungsschritt mit der TAMRA-Sonde mit 1 h wesentlich kürzer durchgeführt wurde als der erste Markierungsschritt mit der Fluorescein-Sonde, der über Nacht stattfand. Der zweite Markierungsschritt konnte deshalb kurz ausgeführt werden, da die Modifizierung der S-Sequenz (Rab1b) sehr schnell erfolgt. Da MBP bei Inkubation über Nacht nur gering mit der Fluorescein-Sonde modifiziert wird, ist es nicht verwunderlich, dass nach einstündiger Inkubation keine nachweisbare Modifikation mit der TAMRA-Sonde zu beobachten ist.

Überträgt man die Zweifach-Markierung auf ein System, welches zwei Modellproteine enthält, ist davon auszugehen, dass die Markierung von S- und T-Sequenz den gleichen zeitlichen Rahmen benötigt. Werden beide Markierungsschritte gleich lang ausgeführt, würde im ersten Schritt eine unvollständige Modifizierung der T-Sequenz mit Sonde A wohl im zweiten Schritt zu einer detektierbaren Modifizierung mit Sonde B führen. Um die Strategie der Zweifach-Markierung auf beliebige Modellproteine anwenden zu können, ist es daher notwendig die AnkX-vermittelte Modifizierung von Modellproteinen möglichst effizient zu gestalten.

3.4 Anwendung der AnkX-basierten Markierungsmethode *in vivo*

Als nächstes sollte die AnkX-basierte Markierungsmethode *in vivo* auf der Oberfläche von kultivierten Säugerzellen getestet werden. Als Modellprotein wurde der humane Neuropeptid Y2 Rezeptor (hY2R) verwendet, bei dem es sich um einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor (engl. *G protein-coupled receptor*, GPCR) mit sieben Transmembranhelices handelt (Abbildung 20). Dieser Rezeptor wurde gewählt, da er an seinem extrazellulären N-Terminus mit Peptiden fusioniert werden kann, ohne Einbußen in der Aktivität zu erleiden.²⁰⁹ Somit war es möglich, den GPCR N-terminal mit dem Hämagglutinin (HA)-Epitop und der AnkX-Erkennungssequenz TITSSYYR auszustatten. Durch Immunfluoreszenzmikroskopie mit einem Primärantikörper gegen das HA-Epitop kann auf diese Weise überprüft werden, ob das GPCR-Konstrukt so in die Membran von Säugerzellen eingebaut wird, dass der N-Terminus mit dem HA-Epitop und der AnkX-Erkennungssequenz extrazellulär zugänglich ist. Des Weiteren wurde an den intrazellulären C-Terminus das gelb fluoreszierende Protein (engl. *enhanced yellow fluorescent protein*, eYFP) fusioniert, um die Expression des GPCRs in Säugerzellen verifizieren zu können. Der auf diese Weise generierte GPCR wird als HA-TITSSYYR-hY2R-eYFP bezeichnet. Durch Kolokalisationsstudien mit eYFP sollte getestet werden, ob sich der entworfene GPCR unter Verwendung von AnkX und CDP-Cholin-PEG₄-Sulfo-Cy5 mit der rot fluoreszierenden Cy5-Sonde markieren lässt (Abbildung 20).

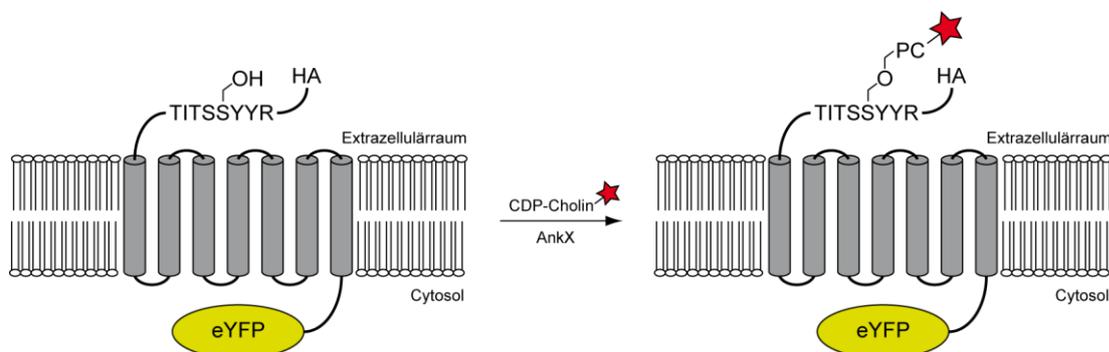


Abbildung 20 Strategie der AnkX-vermittelten Markierung von HA-TITSSYYR-hY2R-eYFP. Der GPCR wurde am extrazellulären N-Terminus mit dem HA-Epitop und der AnkX-Erkennungssequenz TITSSYYR ausgestattet. An den intrazellulären C-Terminus wurde eYFP fusioniert. Durch Kolokalisationsstudien mit eYFP soll verifiziert werden, ob AnkX ausgehend von CDP-Cholin-PEG₄-Sulfo-Cy5 die rot fluoreszierende Cy5-Sonde (roter Stern) auf den GPCR übertragen kann.

Zunächst sollte durch Immunfluoreszenzmikroskopie überprüft werden, ob das entworfene GPCR-Konstrukt so in die Membran von Säugerzellen eingebaut werden kann, dass der N-Terminus mit dem HA-Epitop und der AnkX-Erkennungssequenz extrazellulär zugänglich ist. Als Zelllinie wurden Cos-7-Zellen gewählt, da diese sich auf Grund ihrer Größe besonders gut für mikroskopische Aufnahmen eignen. Die Cos-7-Zellen wurden mit HA-TITSSYYR-hY2R-eYFP transfiziert und für 16 h inkubiert, um die transiente Expression und den Einbau des Rezeptors in die Zellmembran zu erlauben. Anschließend wurden die Zellen mit

4 % Formaldehyd fixiert und mit einem Primärantikörper gegen das HA-Epitop und einem Alexa-Fluor-568-gekoppelten Sekundärantikörper gefärbt (Abbildung 21a).

Die Lokalisation des Rezeptors wurde über die Fluoreszenz von eYFP im grünen Kanal verfolgt. Dabei lässt sich beobachten, dass der GPCR größtenteils korrekt in die Plasmamembran transfizierter Zellen eingebaut ist. Vereinzelt lässt sich jedoch auch starke eYFP-Fluoreszenz im Inneren von Zellen beobachten, was auf lokale Ansammlungen von fehlgefalteten Rezeptoren hindeutet, die nicht in die Plasmamembran eingebaut werden konnten. Im roten Kanal wurde die Antikörperfärbung des HA-Epitops und damit die extrazelluläre Zugänglichkeit des N-terminalen Bereichs des Rezeptors verfolgt. Das rote Signal der entsprechenden Alexa-Fluor-568-Färbung ist hauptsächlich in der Plasmamembran transfizierter Zellen zu beobachten und kolokalisiert mit der eYFP-Fluoreszenz des Rezeptors. Dabei ist deutlich zu sehen, dass die rote HA-Färbung ausschließlich mit der eYFP-Fluoreszenz von Rezeptoren kolokalisiert, die korrekt in die Plasmamembran eingebaut sind. Eine Kolokalisation mit den intrazellulären Einschlüssen fehlgefalteter Rezeptoren ist nicht zu beobachten. Der N-Terminus von Rezeptoren, die in die Plasmamembran eingebaut sind, ist demnach extrazellulär für die Antikörperfärbung des HA-Epitops zugänglich.

Daher wurde angenommen, dass auch die AnkX-Erkennungssequenz am N-Terminus des GPCR-Konstrukts extrazellulär zugänglich ist und für die Modifizierung durch AnkX zur Verfügung steht. Falls die geplante AnkX-vermittelte Markierung des Rezeptors mit der Cy5-Sonde Erfolg zeigen sollte, sollte sich ein ähnliches Bild ergeben, wie bei der vorliegenden Antikörperfärbung des HA-Epitops.

Als Kontrolle für die Spezifität des Alexa-Fluor-568-gekoppelten Sekundärantikörpers wurden Cos-7-Zellen mit HA-TITSSYYR-hY2R-eYFP transfiziert, fixiert und ohne Zugabe des primären HA-Antikörpers mit dem Alexa-Fluor-568-gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert (Abbildung 21b). Die Lokalisation der grünen eYFP-Fluoreszenz belegt dabei erneut den Einbau des Rezeptors in die Plasmamembran transfizierter Zellen. Diesmal ist im roten Kanal jedoch kein Signal des Alexa-Fluor-568-gekoppelten Sekundärantikörpers zu beobachten. Diese Beobachtung demonstriert, dass der Alexa-Fluor-568-gekoppelte Sekundärantikörper spezifisch für den primären HA-Antikörper ist und keine Kreuzreaktivität zeigt.

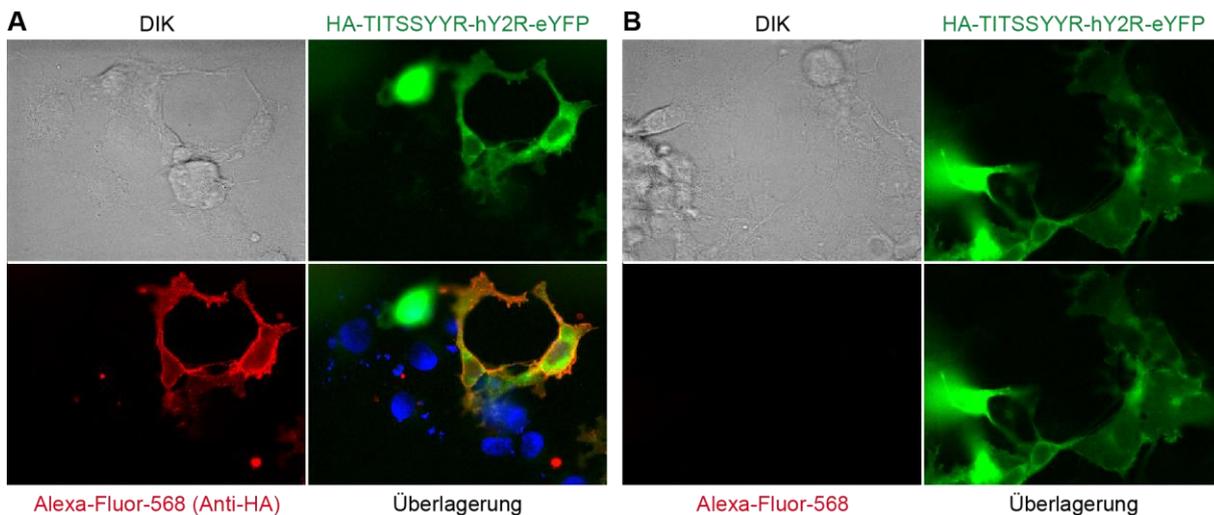


Abbildung 21 Extrazelluläre Zugänglichkeit des HA-Epitops von HA-TITSSYYR-hY2R-eYFP. Cos-7-Zellen wurden transient mit HA-TITSSYYR-hY2R-eYFP transfiziert und nach 16 h mit 4 % Formaldehyd fixiert. **(A)** Färbung fixierter Zellen mit einem Primärantikörper gegen das HA-Epitop (1:1000) und einem Alexa-Fluor-568-gekoppelten Sekundärantikörper (1:1000). **(B)** Inkubation fixierter Zellen mit dem Alexa-Fluor-568-gekoppelten Sekundärantikörper (1:1000) ohne vorherige Zugabe des primären HA-Antikörpers. Die Fluoreszenz von eYFP (grün) und Alexa-Fluor-568 (rot) wurde durch fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen analysiert. Zellkerne sind mit DAPI (blau) gefärbt. Von analysierten Zellen wurde zusätzlich eine lichtmikroskopische DIK-Aufnahme erstellt.

Nachdem verifiziert werden konnte, dass der N-Terminus des GPCR-Konstrukts extrazellulär zugänglich ist, sollte die AnkX-vermittelte Markierung des Rezeptors mit der Cy5-Sonde getestet werden. Dazu wurden Cos-7-Zellen mit HA-TITSSYYR-hY2R-eYFP transfiziert und anschließend mit CDP-Cholin-PEG₄-Sulfo-Cy5 (100 µM) und AnkX₁₋₈₀₀ (2 µM) für 3 h inkubiert. Danach wurden die Zellen mit 4 % Formaldehyd fixiert und auf Kolokalisation zwischen der grünen eYFP-Fluoreszenz des Rezeptors und der rot fluoreszierenden Cy5-Sonde untersucht (Abbildung 22a).

Im grünen Kanal lassen sich diesmal einige Einschlüsse fehlgefalteter Rezeptoren beobachten. Es sind jedoch auch Zellen vorhanden, bei denen der GPCR korrekt in die Plasmamembran eingebaut werden konnte. Jedoch lässt sich für diese Zellen keine Kolokalisation zwischen dem membranständigen Rezeptor und der rot fluoreszierenden Cy5-Sonde beobachten. Vielmehr scheint sich CDP-Cholin-PEG₄-Sulfo-Cy5 unspezifisch an transfizierte und nicht-transfizierte Zellen anzulagern. Sogar im Inneren von Zellen kann die rote Fluoreszenz der Cy5-Sonde beobachtet werden. Die Lokalisation von CDP-Cholin-PEG₄-Sulfo-Cy5 im Zellinneren ist überraschend, da die Überquerung der hydrophoben Plasmamembran für CDP-Cholin-Derivate auf Grund der negativ geladenen Phosphatgruppen erschwert sein sollte. Die an CDP-Cholin konjugierte Sulfo-Cy5-Gruppe besitzt zwei weitere negative Ladungen. Damit sollte die Diffusion von CDP-Cholin-PEG₄-Sulfo-Cy5 durch die hydrophobe Plasmamembran zusätzlich gehemmt sein.

In einem Kontrollexperiment wurden Cos-7-Zellen mit HA-TITSSYYR-hY2R-eYFP transfiziert und in Abwesenheit von AnkX₁₋₈₀₀ für 3 h mit CDP-Cholin-PEG₄-Sulfo-Cy5 (100 µM) inkubiert

und anschließend fixiert (Abbildung 22b). Auch in Abwesenheit von AnkX lässt sich die unspezifische Anlagerung von CDP-Cholin-PEG₄-Sulfo-Cy5 an bzw. in transfizierte und nicht-transfizierte Zellen beobachten. Die Detektion spezifischer Kolokalisation zwischen der eYFP-Fluoreszenz und potenzieller Cy5-Markierung des Rezeptors ist durch die unspezifische Anlagerung des CDP-Cholin-Derivats an die Zellmembran daher allgemein erschwert.

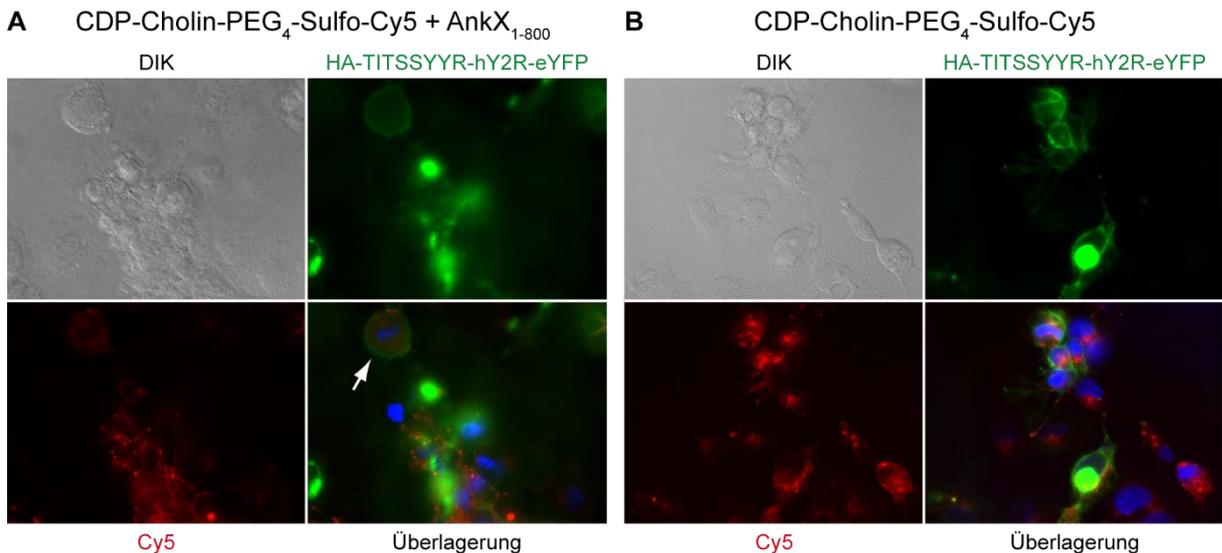


Abbildung 22 Modifizierung von HA-TITSSYYR-hY2R mit CDP-Cholin-PEG₄-Sulfo-Cy5. Cos-7-Zellen wurden transient mit HA-TITSSYYR-hY2R-eYFP transfiziert und für 16 h inkubiert. **(A)** Lebende Zellen wurden mit CDP-Cholin-PEG₄-Sulfo-Cy5 (100 µM) und AnkX₁₋₈₀₀ (2 µM) für 3 h inkubiert. **(B)** Lebende Zellen wurden in Abwesenheit von AnkX₁₋₈₀₀ mit CDP-Cholin-PEG₄-Sulfo-Cy5 (100 µM) für 3 h inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen mit 4 % Formaldehyd fixiert. Die Fluoreszenz von eYFP (grün) und Cy5 (rot) wurde durch fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen analysiert. Zellkerne sind mit DAPI (blau) gefärbt. Von analysierten Zellen wurde zusätzlich eine lichtmikroskopische DIK-Aufnahme erstellt. Der weiße Pfeil in Teilabbildung **(A)** zeigt eine Zelle, in die CDP-Cholin-PEG₄-Sulfo-Cy5 aufgenommen wurde.

Bevor weitere Experimente mit CDP-Cholin-PEG₄-Sulfo-Cy5 unternommen wurden, sollte getestet werden, ob AnkX in der Lage ist, den Rezeptor mit Hilfe des natürlichen Cosubstrats CDP-Cholin zu modifizieren. Die Übertragung der PC-Gruppe sollte dabei durch Immunfluoreszenz mit einem PC-Antikörper überprüft werden. Zu diesem Zweck wurden Cos-7-Zellen mit HA-TITSSYYR-hY2R-eYFP transfiziert und mit CDP-Cholin (1 mM) und AnkX₁₋₈₀₀ (2 µM) für 3 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 4 % Formaldehyd fixiert und mit einem primären PC-Antikörper und einem Alexa-Fluor-647-gekoppelten Sekundärantikörper gefärbt (Abbildung 23a).

Im grünen Kanal lassen sich durch die eYFP-Fluoreszenz sowohl intrazelluläre Einschlüsse fehlgefalteter Rezeptoren als auch korrekt in die Zellmembran eingebaute GPCRs beobachten. Die Antikörperfärbung der PC-Gruppe wurde im roten Kanal verfolgt. Dabei lässt sich tatsächlich rote Fluoreszenz detektieren, die hauptsächlich in der Zellmembran lokalisiert zu sein scheint. Allerdings ist das PC-Immunfluoreszenzsignal nicht spezifisch für transfizierte

Zellen, sondern kann auch in der Plasmamembran nicht-transfizierter Zellen beobachtet werden. Dies deutet darauf hin, dass es sich bei dem roten Fluoreszenzsignal nicht um eine spezifische Phosphocholinierung des transfizierten Rezeptors handelt.

Um zu untersuchen, ob das Auftreten der PC-Immunfluoreszenz von der Anwesenheit von AnkX₁₋₈₀₀ abhängt, wurden Cos-7-Zellen mit HA-TITSSYYR-hY2R-eYFP transfiziert und in Abwesenheit von AnkX₁₋₈₀₀ für 3 h mit CDP-Cholin (1 mM) inkubiert. Die Zellen wurden anschließend mit 4 % Formaldehyd fixiert und mit einem primären PC-Antikörper und einem Alexa-Fluor-647-gekoppelten Sekundärantikörper gefärbt (Abbildung 23b).

In Abwesenheit von AnkX₁₋₈₀₀ ist das membranständige rote Fluoreszenzsignal nicht mehr zu beobachten. Dies deutet darauf hin, dass die PC-Immunfluoreszenz nicht durch PC-enthaltende Bestandteile der Zellmembran verursacht wird, sondern mit der Anwesenheit von AnkX₁₋₈₀₀ in Verbindung steht. Dabei sind unterschiedliche Szenarien denkbar, wie AnkX₁₋₈₀₀ mit dem Auftreten der PC-Immunfluoreszenz in Zusammenhang stehen könnte: Zum einen wäre denkbar, dass bei Zugabe von AnkX₁₋₈₀₀ membranständige Proteine der Plasmamembran phosphocholiniert werden und die PC-Immunfluoreszenz auslösen. Zum anderen ist bekannt, dass AnkX₁₋₈₀₀ mit S521_{AnkX} und T620_{AnkX} mindestens zwei Aminosäurepositionen besitzt, an denen sich das Enzym mit PC automodifiziert.³⁶ Daher wäre ebenfalls denkbar, dass sich autophosphocholiniertes AnkX₁₋₈₀₀ (AnkX₁₋₈₀₀-PC) an die Zellmembran anlagert und dadurch die PC-Immunfluoreszenz auslöst.

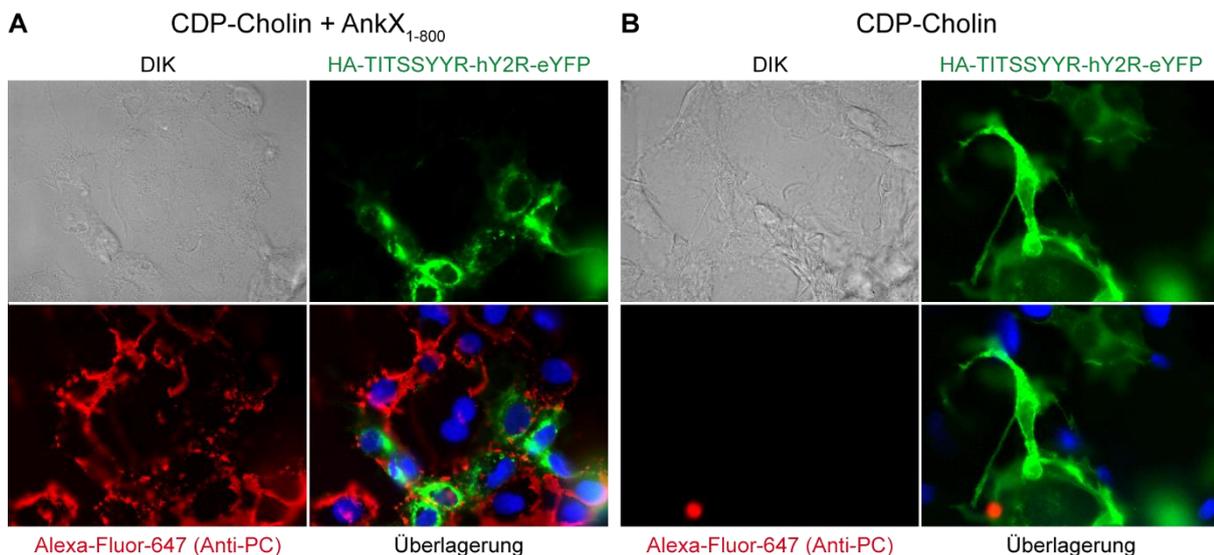


Abbildung 23 Modifizierung von HA-TITSSYYR-hY2R mit CDP-Cholin. Cos-7-Zellen wurden transient mit HA-TITSSYYR-hY2R-eYFP transfiziert und für 16 h inkubiert. **(A)** Lebende Zellen wurden mit CDP-Cholin (1 mM) und AnkX₁₋₈₀₀ (2 µM) für 3 h inkubiert. **(B)** Lebende Zellen wurden in Abwesenheit von AnkX₁₋₈₀₀ für 3 h mit CDP-Cholin (1 mM) inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen mit 4 % Formaldehyd fixiert und mit einem primären PC-Antikörper (1:1000) und einem Alexa-Fluor-647-gekoppelten Sekundärantikörper (1:1000) gefärbt. Die Fluoreszenz von eYFP (grün) und Alexa-Fluor-647 (rot) wurde durch fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen analysiert. Zellkerne sind mit DAPI (blau) gefärbt. Von analysierten Zellen wurde zusätzlich eine lichtmikroskopische DIK-Aufnahme erstellt.

Um zu überprüfen, ob die beobachtete PC-Immunfluoreszenz durch die Phosphocholinierung extrazellulärer Membranproteine durch AnkX₁₋₈₀₀ oder durch die Anlagerung von AnkX₁₋₈₀₀-PC an die Plasmamembran ausgelöst wird, wurden Kontrollexperimente mit nicht-transfizierten Cos-7-Zellen durchgeführt. Zunächst wurden nicht-transfizierte Cos-7-Zellen mit präparativ hergestelltem AnkX₁₋₈₀₀-PC (2 µM) für 3 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 4 % Formaldehyd fixiert und mit einem primären PC-Antikörper und einem Alexa-Fluor-647-gekoppelten Sekundärantikörper gefärbt (Abbildung 24a).

Im roten Kanal kann erneut membranständige PC-Immunfluoreszenz beobachtet werden. Diese ist jedoch schwächer als im vorangegangenen Experiment. Aufgrund der Abwesenheit von CDP-Cholin ist die Phosphocholinierung membranassoziierter Proteine im vorliegenden Experiment ausgeschlossen. Es ist daher anzunehmen, dass die beobachtete PC-Immunfluoreszenz durch die Anlagerung von AnkX₁₋₈₀₀-PC an die Zellmembran verursacht wird.

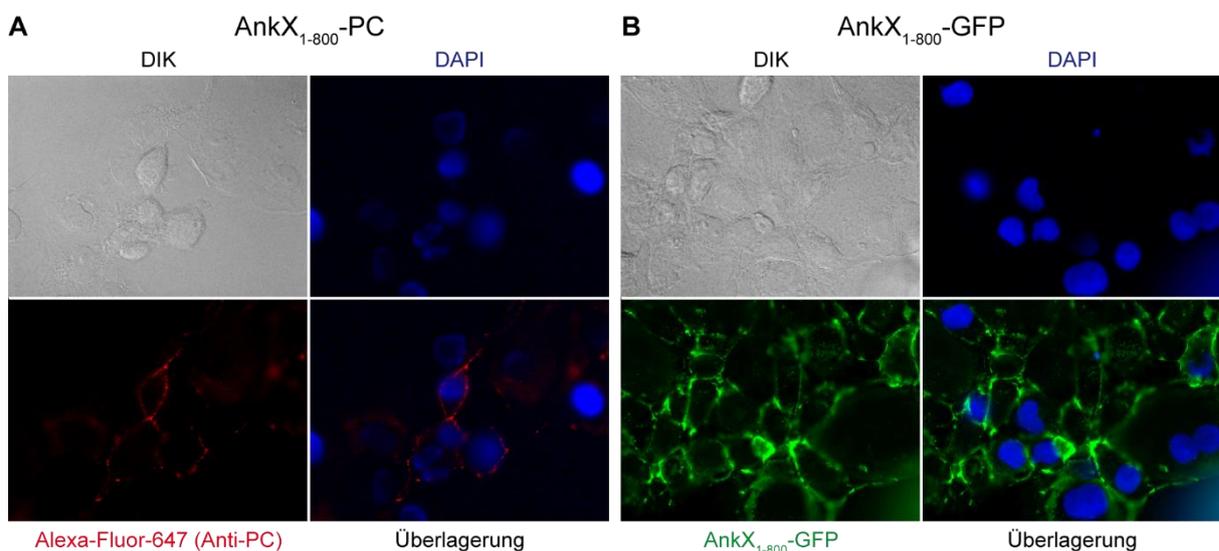


Abbildung 24 Unspezifische Anlagerung von AnkX₁₋₈₀₀ an die Plasmamembran von Cos-7-Zellen. **(A)** Nicht-transfizierte Cos-7-Zellen wurden mit präparativ autophosphocholinisiertem AnkX₁₋₈₀₀ (AnkX₁₋₈₀₀-PC, 2 µM) für 3 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 4 % Formaldehyd fixiert und mit einem primären PC-Antikörper (1:1000) und einem Alexa-Fluor-647-gekoppelten Sekundärantikörper (1:1000) gefärbt. **(B)** Nicht-transfizierte Cos-7-Zellen wurden mit AnkX₁₋₈₀₀-GFP (2 µM) für 3 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 4 % Formaldehyd fixiert. Die Fluoreszenz von Alexa-Fluor-647 (rot) und GFP (grün) wurde durch fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen analysiert. Zellkerne sind mit DAPI (blau) gefärbt. Von analysierten Zellen wurde zusätzlich eine lichtmikroskopische DIC-Aufnahme erstellt.

In einem zweiten Kontrollexperiment wurden nicht-transfizierte Cos-7-Zellen für 3 h mit AnkX₁₋₈₀₀-GFP (2 µM) inkubiert und anschließend mit 4 % Formaldehyd fixiert (Abbildung 24b). Auf diese Weise konnte die Lokalisation des AnkX₁₋₈₀₀-Fusionskonstrukts direkt über die Fluoreszenz von GFP im grünen Kanal verfolgt werden. Dabei lässt sich intensive GFP-Fluoreszenz beobachten, die auf der Plasmamembran der analysierten Zellen lokalisiert ist und auf eine unspezifische Anlagerung von AnkX₁₋₈₀₀-GFP an die Zellen hindeutet. Dies

lässt vermuten, dass die membranständige PC-Immunfluoreszenz bei der vorangegangenen Modifizierung transfizierter Cos-7-Zellen mit CDP-Cholin und AnkX₁₋₈₀₀ durch die Anlagerung von AnkX₁₋₈₀₀-PC an die Plasmamembran ausgelöst wurde. Die unspezifische Anlagerung von AnkX₁₋₈₀₀-PC an die Zellmembran erschwert die Detektion potenzieller Phosphocholinierung des GPCR-Konstrukts enorm.

Da die Anlagerung von AnkX₁₋₈₀₀-PC an die Plasmamembran auch durch intensive Waschschriffe vor der Formaldehyd-Fixierung nicht unterbunden werden konnte, sollte stattdessen versucht werden, die Autophosphocholinierung von AnkX₁₋₈₀₀ zu unterbinden. Dazu wurden die beiden Automodifikationsstellen S521_{AnkX} und T620_{AnkX} zu Alanin mutiert. Da über Western Blot mit einem PC-Antikörper für AnkX_{1-800_S521A_T620A} ähnliche Autophosphocholinierung wie für AnkX₁₋₈₀₀ beobachtet wurde (Anhang Abbildung 43), eignet sich diese AnkX-Variante jedoch ebenfalls nicht für die geplanten *in vivo* Experimente. AnkX₁₋₈₀₀ besitzt demnach neben S521_{AnkX} und T620_{AnkX} weitere AS-Positionen, an denen eine Autophosphocholinierung erfolgen kann.

Da sich die Autophosphocholinierung von AnkX nicht durch die Mutation der bekannten Automodifikationsstellen unterbinden lässt, sollte in der Folge das verkürzte AnkX₁₋₄₈₄ verwendet werden, welches sich nicht autophosphocholinieren kann.³⁶ Aufgrund der mangelnden Fähigkeit zur Automodifikation wurde angenommen, dass AnkX₁₋₄₈₄ keine störenden PC-Immunfluoreszenzsignale auslöst. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden nicht-transfizierte Cos-7-Zellen mit CDP-Cholin (1 mM) und AnkX₁₋₄₈₄ (2 µM) für 3 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 4 % Formaldehyd fixiert und mit einem primären PC-Antikörper und einem Alexa-Fluor-647-gekoppelten Sekundärantikörper gefärbt (Abbildung 25a). Tatsächlich lässt sich bei Verwendung des verkürzten AnkX₁₋₄₈₄ im roten Kanal keine PC-Immunfluoreszenz beobachten. Somit lässt sich die störende PC-Immunfluoreszenz durch den Einsatz von AnkX₁₋₄₈₄ vollständig unterbinden.

In einem nächsten Schritt sollte getestet werden, ob AnkX₁₋₄₈₄ in der Lage ist, das GPCR-Konstrukt an seiner N-terminalen AnkX-Erkennungssequenz mit einer PC-Gruppe auszustatten. Dazu wurden Cos-7-Zellen mit HA-TITSSYYR-hY2R-eYFP transfiziert und mit CDP-Cholin (1 mM) und AnkX₁₋₄₈₄ (2 µM) für 3 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 4 % Formaldehyd fixiert und mit einem primären PC-Antikörper und einem Alexa-Fluor-647-gekoppelten Sekundärantikörper gefärbt (Abbildung 25b).

Über die eYFP-Fluoreszenz im grünen Kanal lässt sich beobachten, dass der Rezeptor größtenteils korrekt in die Membran der Zellen eingebaut ist. Im roten Kanal ist jedoch keine PC-Immunfluoreszenz zu detektieren, was bedeutet, dass der Rezeptor unter den gegebenen Bedingungen nicht von AnkX₁₋₄₈₄ phosphocholinieren werden kann. Dies könnte entweder daran liegen, dass das hergestellte GPCR-Konstrukt generell kein Substratprotein für die AnkX-vermittelte Phosphocholinierung ist, oder daran, dass die enzymatische Aktivität des

verkürzten AnkX₁₋₄₈₄ zu gering ist, um Modellproteine wie das GPCR-Konstrukt unter den gegebenen Bedingungen nachweisbar zu modifizieren.

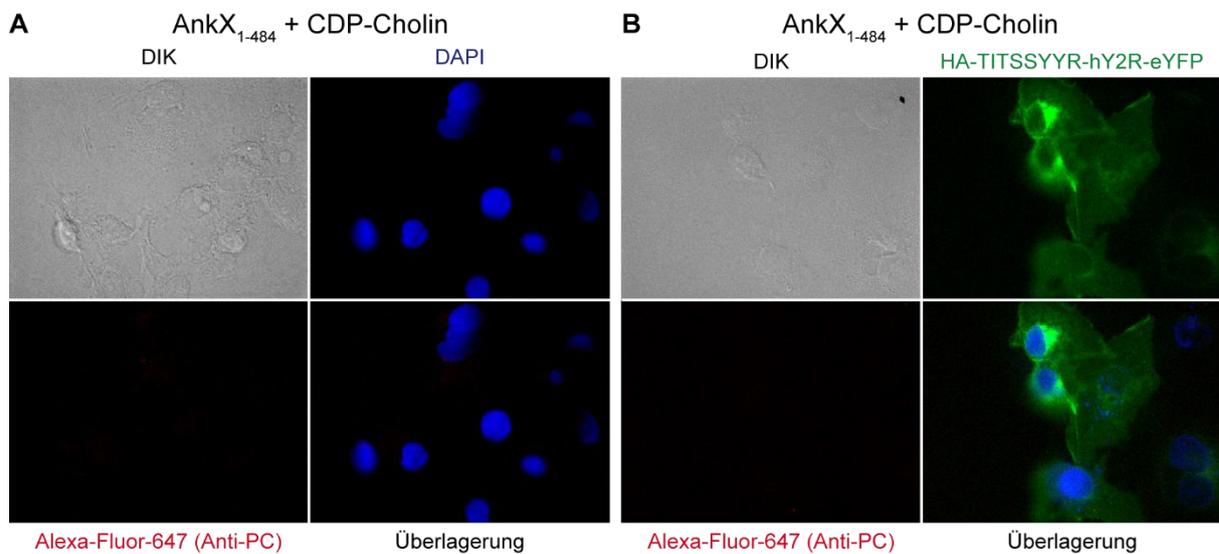


Abbildung 25 Einsatz von AnkX₁₋₄₈₄ für die Modifizierung von HA-TITSSYYR-hY2R. **(A)** Um die Kompatibilität von AnkX₁₋₄₈₄ mit der PC-Antikörperfärbung zu testen, wurden nicht-transfizierte Cos-7-Zellen mit AnkX₁₋₄₈₄ (2 µM) und CDP-Cholin (1 mM) für 3 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 4 % Formaldehyd fixiert und mit einem primären PC-Antikörper (1:1000) und einem Alexa-Fluor-647-gekoppelten Sekundäntikörper (1:1000) gefärbt. **(B)** Cos-7-Zellen wurden transient mit HA-TITSSYYR-hY2R-eYFP transfiziert und für 16 h inkubiert. Lebende Zellen wurden mit CDP-Cholin (1 mM) und AnkX₁₋₄₈₄ (2 µM) für 3 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 4 % Formaldehyd fixiert und mit einem primären PC-Antikörper (1:1000) und einem Alexa-Fluor-647-gekoppelten Sekundäntikörper (1:1000) gefärbt. Die Fluoreszenz von eYFP (grün) und Alexa-Fluor-647 (rot) wurde durch fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen analysiert. Zellkerne sind mit DAPI (blau) gefärbt. Von analysierten Zellen wurde zusätzlich eine lichtmikroskopische DIK-Aufnahme erstellt.

Um zu überprüfen, ob ein Zeitraum von 3 h möglicherweise zu kurz ist, um den GPCR durch AnkX₁₋₄₈₄ zu markieren, sollte die Modifizierung transfizierter Cos-7-Zellen mit CDP-Cholin und CDP-Cholin-PEG₄-Sulfo-Cy5 bei längerer Inkubation über Nacht ausgeführt werden. Für das Experiment zur Modifizierung mit CDP-Cholin-PEG₄-Sulfo-Cy5 musste zunächst die optimale Konzentration an Derivat bestimmt werden, bei der kein störendes Fluoreszenzsignal durch die unspezifische Anlagerung des Derivats an die Cos-7-Zellen auftritt. Dazu wurden nicht-transfizierte Cos-7-Zellen für 3 h mit unterschiedlichen Konzentrationen an CDP-Cholin-PEG₄-Sulfo-Cy5 (3-100 µM) inkubiert und anschließend mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert (Anhang Abbildung 44). Auf diese Weise konnte festgestellt werden, dass die Konzentration an CDP-Cholin-PEG₄-Sulfo-Cy5 auf ca. 10 µM reduziert werden muss, um Störsignale durch die unspezifische Anlagerung des Derivats an die Cos-7-Zellen zu unterbinden.

Um die Markierung des GPCR-Konstrukts bei längerer Inkubationsdauer und mit der optimierten Nukleotidkonzentration zu testen, wurden Cos-7-Zellen mit HA-TITSSYYR-hY2R-eYFP transfiziert und mit CDP-Cholin-PEG₄-Sulfo-Cy5 (10 µM) und AnkX₁₋₄₈₄ (100 nM) über

Nacht inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 4 % Formaldehyd fixiert und auf Kolokalisation von eYFP- und Cy5-Fluoreszenz untersucht (Abbildung 26a).

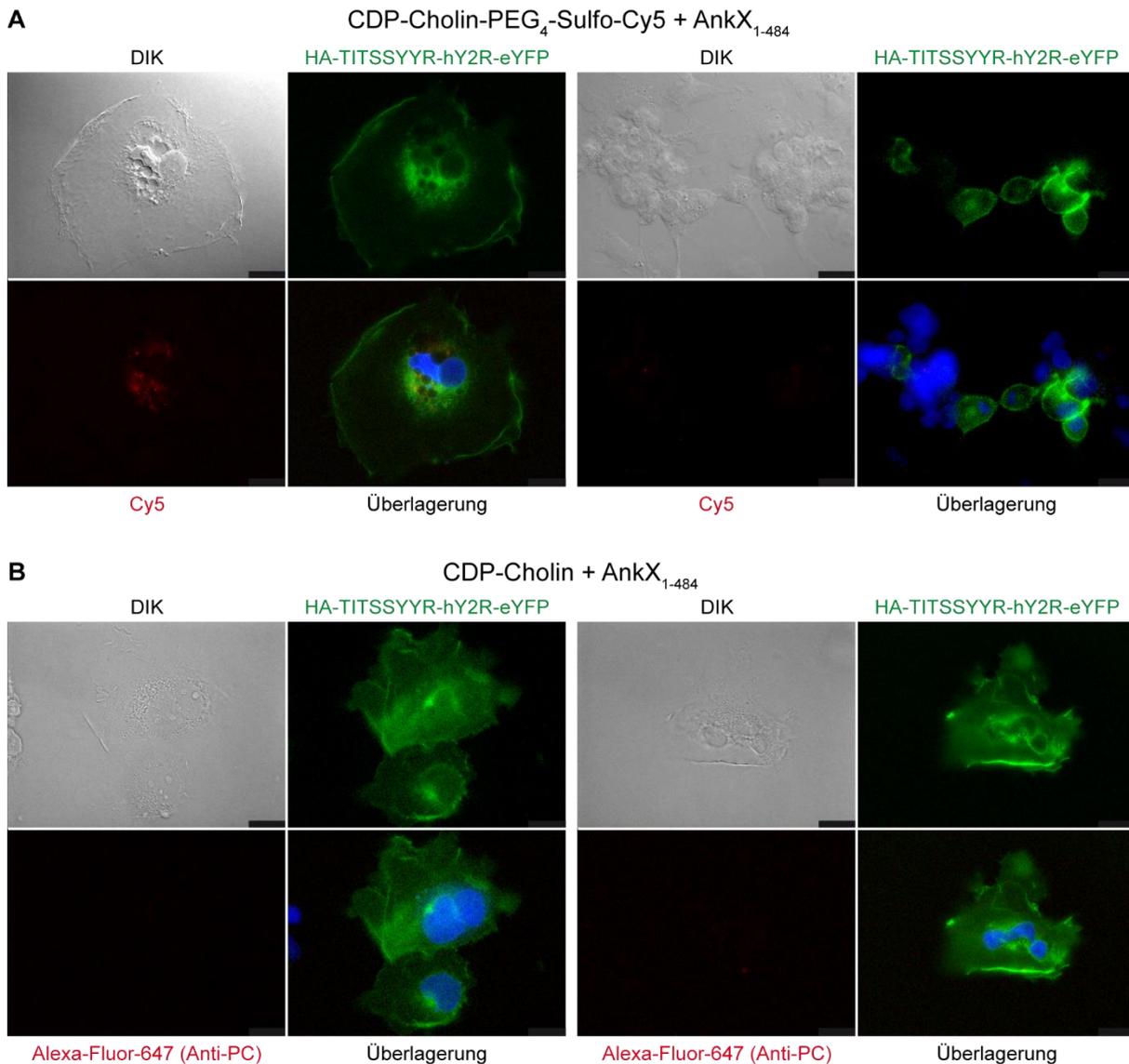


Abbildung 26 Modifizierung von HA-TITSSYYR-hY2R-eYFP mit CDP-Cholin-PEG₄-Sulfo-Cy5 und CDP-Cholin unter optimierten Reaktionsbedingungen. Cos-7-Zellen wurden transient transfiziert mit HA-TITSSYYR-hY2R-eYFP und für 16 h inkubiert. **(A)** Lebende Zellen wurden mit CDP-Cholin-PEG₄-Sulfo-Cy5 (10 µM) und AnkX₁₋₄₈₄ (100 nM) über Nacht inkubiert und anschließend mit 4 % Formaldehyd fixiert. **(B)** Lebende Zellen wurden mit CDP-Cholin (1 mM) und AnkX₁₋₄₈₄ (2 µM) über Nacht inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 4 % Formaldehyd fixiert und mit einem primären PC-Antikörper (1:1000) und einem Alexa-Fluor-647-gekoppelten Sekundäntikörper (1:1000) gefärbt. Die Fluoreszenz von eYFP (grün) und Alexa-Fluor-647 (rot) bzw. Cy5 (rot) wurde durch fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen analysiert. Zellkerne sind mit DAPI (blau) gefärbt. Von analysierten Zellen wurde zusätzlich eine lichtmikroskopische DIK-Aufnahme erstellt.

Über die eYFP-Fluoreszenz im grünen Kanal lässt sich beobachten, dass der GPCR größtenteils korrekt in die Plasmamembran transfizierter Zellen eingebaut ist. Im roten Kanal ist unter den optimierten Bedingungen keine membranständige Cy5-Fluoreszenz und somit keine Kolokalisation mit dem Rezeptor zu beobachten. Dies zeigt, dass unter den optimierten

Bedingungen die unspezifische Anlagerung von CDP-Cholin-PEG₄-Sulfo-Cy5 an die Plasmamembran unterbunden werden kann. Die Markierung des Rezeptors mit der Cy5-Sonde ist jedoch nicht möglich. Interessanterweise ist erneut die Aufnahme von CDP-Cholin-PEG₄-Sulfo-Cy5 ins Innere der Cos-7-Zellen zu beobachten. Dies deutet darauf hin, dass CDP-Cholin-PEG₄-Sulfo-Cy5 trotz seiner hohen negativen Ladung in gewissem Maße zellpermeabel ist.

Um zu testen, ob bei längerer Inkubationsdauer der Transfer der natürlichen PC-Gruppe auf den GPCR möglich ist, wurden Cos-7-Zellen mit HA-TITSSYYR-hY2R-eYFP transfiziert und mit CDP-Cholin (1 mM) und AnkX₁₋₄₈₄ (2 µM) über Nacht inkubiert (Abbildung 26b). Anschließend wurden die Zellen mit 4 % Formaldehyd fixiert und mit einem primären PC-Antikörper und einem Alexa-Fluor-647-gekoppelten Sekundärintikörper gefärbt. Über die eYFP-Fluoreszenz im grünen Kanal lässt sich beobachten, dass der Rezeptor größtenteils korrekt in die Zellmembran transfizierter Zellen eingebaut ist. Im roten Kanal kann jedoch keine PC-Immunfluoreszenz detektiert werden. Dies deutet darauf hin, dass das GPCR-Konstrukt auch bei längerer Inkubation nicht durch AnkX₁₋₄₈₄ phosphocholinieren werden kann.

Um abschließend zu testen, ob die AnkX-vermittelte Phosphocholinierung unter den gewählten Bedingungen generell möglich ist, sollte überprüft werden, ob Rab1b in Zellkulturüberstand von Cos-7-Zellen stabil phosphocholinieren werden kann. Dazu wurde Rab1b (10 µM) in Zellkulturüberstand sowie in Kulturmedium von Cos-7-Zellen mit CDP-Cholin (1 mM) und unterschiedlichen AnkX-Varianten (AnkX₁₋₈₀₀, AnkX₁₋₈₀₀-PC oder AnkX₁₋₄₈₄) inkubiert (Abbildung 27). Dabei wurden die gleichen Inkubationszeiten (3 h oder über Nacht) und die gleichen Enzymkonzentrationen (100 nM oder 2 µM) wie in den *in vivo* Experimenten eingesetzt. Anschließend wurde die Phosphocholinierung von Rab1b über Western Blot mit einem PC-Antikörper analysiert.

Rab1b-PC kann nach dreistündiger Inkubation mit AnkX₁₋₈₀₀ (100 nM), AnkX₁₋₈₀₀-PC (100 nM) und AnkX₁₋₄₈₄ (2 µM) detektiert werden, nicht jedoch mit AnkX₁₋₄₈₄ (100 nM) (Abbildung 27a). Die Phosphocholinierung von Rab1b findet dabei in Kulturmedium sowie in Zellkulturüberstand von Cos-7-Zellen in gleichen Ausmaß statt. Bekanntermaßen läuft die Phosphocholinierung von Rab1b durch AnkX₁₋₈₀₀ relativ schnell ab, während das verkürzte AnkX₁₋₄₈₄ die kleine GTPase wesentlich langsamer modifiziert. Der Aktivitätsunterschied der beiden AnkX-Konstrukte zeigt sich auch im vorliegenden Experiment: Das verkürzte AnkX₁₋₄₈₄ muss in höheren Konzentrationen eingesetzt werden als AnkX₁₋₈₀₀ (2 µM anstatt 100 nM), um im gleichen Zeitraum eine vergleichbare Phosphocholinierung zu erzielen.

Setzt man die Reaktion über Nacht fort, kann beim Einsatz von AnkX₁₋₄₈₄ (100 nM) ebenfalls in geringem Ausmaß Rab1b-PC beobachtet werden, sofern die Phosphocholinierung in Zellkulturüberstand durchgeführt wird (Abbildung 27b). Bei Durchführung der Reaktion in Kulturmedium kann hingegen kein Rab1b-PC detektiert werden. Interessanterweise lässt sich

Rab1b-PC in den Ansätzen mit den anderen AnkX-Varianten ebenfalls nur noch in Zellkulturüberstand nachweisen, nicht jedoch in Kulturmedium. Präparativ hergestelltes Rab1b-PC, welches als Positivkontrolle der Western Blots eingesetzt wurde, lässt sich nach Inkubation über Nacht ebenfalls nur noch in Zellkulturüberstand detektieren, nicht jedoch in Zellkulturmedium. Das Chemilumineszenz-Signal von Rab1b-PC in Zellkulturüberstand scheint allerdings nach Inkubation über Nacht deutlich schwächer zu sein als nach Inkubation für 3 h. Die PC-Modifikation scheint demnach weder in Zellkulturmedium noch in Zellkulturüberstand unbegrenzt stabil zu sein.

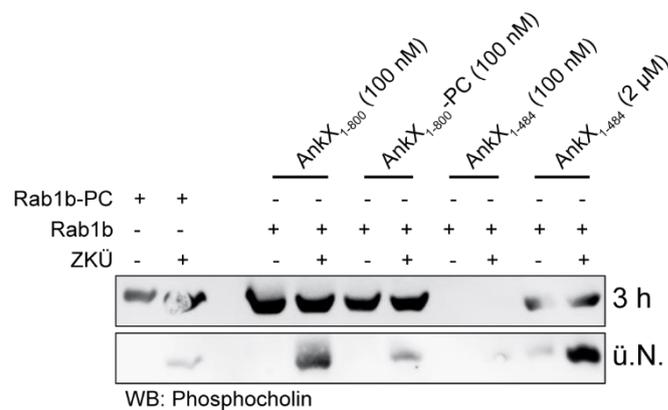


Abbildung 27 Phosphocholinierung von Rab1b in Zellkulturüberstand von Cos-7-Zellen. Rab1b (10 µM) wurde mit CDP-Cholin (1 mM) und unterschiedlichen AnkX-Varianten (100 nM oder 2 µM) in Zellkulturüberstand (ZKÜ +) oder Zellkulturmedium (ZKÜ -) inkubiert. Nach 3 h und nach Inkubation über Nacht (ü. N.) wurden Proben (500 ng Protein) über SDS-PAGE aufgetrennt und über Western Blot mit einem PC-Antikörper auf die Phosphocholinierung von Rab1b untersucht.

Insgesamt zeigen diese Beobachtungen, dass unter den gewählten Bedingungen der *in vivo* Experimente die AnkX-vermittelte Phosphocholinierung generell nachgewiesen werden kann, sofern ausreichend Enzym eingesetzt wird. Es muss jedoch bedacht werden, dass AnkX₁₋₈₀₀ ab einer Konzentration von 250 nM die Detektion von potenziell modifiziertem GPCR durch das Störsignal seiner Automodifikation stark erschwert (Anhang Abbildung 45). Aus diesem Grund muss das verkürzte und damit zur Automodifikation unfähige AnkX₁₋₄₈₄ verwendet werden. AnkX₁₋₄₈₄ modifiziert das natürliche Substratprotein Rab1b jedoch deutlich langsamer als AnkX₁₋₈₀₀.

Die Ergebnisse aus Kapitel 3.1.2 legen nahe, dass AnkX₁₋₄₈₄ Modellproteine ebenfalls langsamer modifiziert als AnkX₁₋₈₀₀. Es ist daher unklar, ob der mit der AnkX-Erkennungssequenz ausgestattete GPCR generell kein Substratprotein für die AnkX-vermittelte Phosphocholinierung ist, oder ob die Modifizierung durch AnkX₁₋₄₈₄ unter den gewählten Bedingungen zu langsam abläuft, um nachgewiesen werden zu können. Die allgemeine Instabilität der PC-Modifikation im extrazellulären Milieu, verglichen mit der hohen Stabilität in wässrigen Pufferlösungen, erschwert die Detektion von potenziell

phosphocholiniertem GPCR zusätzlich. Die Markierungsstrategie sollte daher *in vivo* noch einmal evaluiert werden, sobald ein Enzym zur Verfügung steht, welches für die Modifizierung von Modellproteinen eine möglichst hohe katalytische Effizienz besitzt und gleichzeitig nicht in der Lage ist, sich selbst zu modifizieren.

3.5 Untersuchung der Interaktion zwischen AnkX und Rab1b

In den bisherigen Abschnitten konnte gezeigt werden, dass AnkX ein breites Spektrum an Cosubstraten besitzt, die für die Markierung von Rab1b oder Modellproteinen eingesetzt werden können. Vor allem kleine bioorthogonale PC-Konjugate werden dabei mit einer hohen katalytischen Effizienz übertragen, die lediglich eine Größenordnung unter der katalytischen Effizienz des Transfers der natürlichen PC-Gruppe liegt. Bei der Anwendung der AnkX-basierten Markierungsstrategie *in vitro* und *in vivo* wurde deutlich, dass die größte Einschränkung der Methode aktuell darin liegt, dass Modellproteine deutlich langsamer phosphocholiniert werden als das natürliche Substratprotein Rab1b. Um die Modifizierung von Modellproteinen effizienter gestalten zu können, ist es notwendig zu verstehen, wie die Interaktion zwischen AnkX und seinen Substratproteinen auf molekularer Ebene abläuft. Um Einblicke in dieses Verständnis zu erlangen, wurde der Komplex zwischen AnkX und seinem natürlichen Substratprotein Rab1b kovalent stabilisiert und die Enzym-Substrat-Interaktion durch Röntgenkristallographie aufgelöst. Dieses wird im Folgenden dargelegt.

3.5.1 Bildung eines kovalenten Komplexes zwischen AnkX und Rab1b

Die präparative Herstellung des AnkX:Rab1b-Komplexes wird dadurch erschwert, dass die Affinität zwischen Enzym und Substratprotein sehr gering ist ($K_D = 122 \pm 23 \mu\text{M}$).³¹ Daher sollte Rab1b mit Hilfe von thiolreaktiven CDP-Cholin-Derivaten kovalent mit AnkX-Varianten verknüpft werden, in die an geeigneter Position ein Cystein eingeführt wurde (AnkX_{Cys}). Prinzipiell sind zwei unterschiedliche Strategien denkbar, wie dabei der kovalente Komplex zwischen AnkX und Rab1b gebildet werden kann: Im sogenannten direkten Ansatz wird zunächst AnkX_{Cys} an das thiolreaktive CDP-Cholin-Derivat konjugiert (Abbildung 28a). Anschließend wird das entstandene binäre Addukt genutzt, um Rab1b zu phosphocholinieren. Da AnkX_{Cys} im binären Addukt kovalent mit der zu übertragenden PC-Gruppe verknüpft ist, wird durch die Phosphocholinierung von Rab1b ein ternärer Komplex zwischen den beiden Proteinen und dem PC-Part des synthetischen Cosubstrats gebildet (AnkX_{Cys}:PC:Rab1b).

Alternativ wird im indirekten Ansatz zunächst das thiolreaktive CDP-Cholin-Analogon durch Einsatz katalytischer Mengen an AnkX_{WT} auf Rab1b übertragen (Abbildung 28b). Anschließend wird Rab1b-PC, welches nun mit der thiolreaktiven Funktionalität ausgestattet ist, stöchiometrisch mit AnkX_{Cys} inkubiert, um den kovalenten AnkX_{Cys}:PC:Rab1b-Komplex zu

bilden. Durch die in Kapitel 3.2.1 eingeführte Synthesestrategie kann CDP-Cholin über einen kurzen C3- oder C4-Linker mit einer moderat reaktiven Chloracetamidgruppe oder einer hoch reaktiven Bromacetamidgruppe verknüpft werden. Auf diese Weise wurden die drei thiolreaktiven Derivate CDP-Cholin-C3-Chloracetamid, CDP-Cholin-C4-Chloracetamid und CDP-Cholin-C4-Bromacetamid hergestellt (Abbildung 28c). Diese Analoga werden im Folgenden mit C3-Cl, C4-Cl und C4-Br bezeichnet.

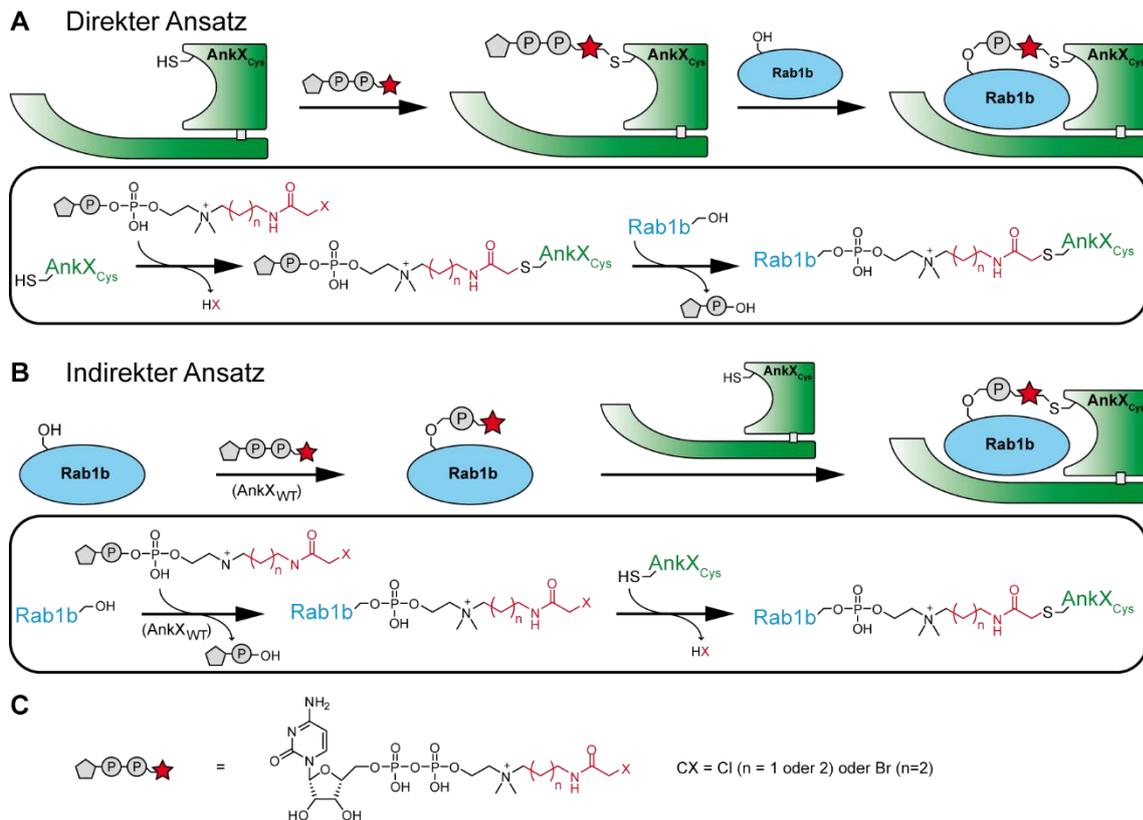


Abbildung 28 Strategie zur Herstellung eines kovalent verknüpften AnkX_{Cys}:PC:Rab1b-Komplexes. **(A)** Im direkten Ansatz wird zunächst eine AnkX-Variante mit strategisch eingeführtem Cystein (AnkX_{Cys}) mit einem thiolreaktiven CDP-Cholin-Derivat umgesetzt. Das entstandene binäre Addukt wird anschließend genutzt, um Rab1b zu phosphocholinieren, wodurch der ternäre AnkX_{Cys}:PC:Rab1b-Komplex entsteht. **(B)** Im indirekten Ansatz wird Rab1b durch katalytische Mengen an AnkX_{WT} mit einem thiolreaktiven CDP-Cholin-Analogen modifiziert. Rab1b-PC, welches nun mit einer thiolreaktiven Funktionalität ausgestattet ist, wird anschließend stöchiometrisch mit AnkX_{Cys} inkubiert, um den AnkX_{Cys}:PC:Rab1b-Komplex zu bilden. **(C)** Die thiolreaktiven CDP-Cholin-Derivate wurden hergestellt, indem eine Chlor- oder Bromacetamidgruppe über einen kurzen C3- oder C4-Linker an die Kopfgruppe von CDP-Cholin angebracht wurde. Das natürliche CDP-Cholin ist in schwarz dargestellt, der angebrachte Linker und die Halogenacetamidgruppe sind in rot dargestellt. Die Synthesen wurden von den Kooperationspartnern Prof. Dr. Christian Hedberg und Dr. Philipp Ochtrop ausgeführt.

Zunächst wurde qualitativ getestet, ob es sich bei den hergestellten thiolreaktiven CDP-Cholin-Derivaten um Cosubstrate für die AnkX-vermittelte Phosphocholinierung handelt. Dazu wurde Rab1b (50 µM) mit dem jeweiligen Derivat (500 µM) und katalytischen Mengen an AnkX_{WT} (500 nM) über Nacht inkubiert und anschließend das Ausmaß der Modifizierung von Rab1b über Massenspektrometrie überprüft (Abbildung 29). Dabei konnte festgestellt werden, dass

alle drei Derivate (C3-Cl, C4-Cl und C4-Br) zu einer quantitativen Modifizierung von Rab1b führen. Es muss jedoch beachtet werden, dass bei Inkubation mit dem C4-Br-Derivat neben der erwarteten Masse von Rab1b-PC-C4-Br zwei weitere Massen detektiert wurden, deren Herkunft nicht geklärt werden konnte. Die Entstehung dieser beiden unbekannt Nebenprodukte könnte mit der hohen Reaktivität des C4-Br-Derivats zusammenhängen. Bei Inkubation mit den Chloracetamid-Derivaten wurde ausschließlich Rab1b-PC-Konjugat mit der erwarteten Masse detektiert.

Da das strategisch eingeführte Cystein von AnkX_{Cys} für die geplante Reaktion mit der Halogenacetamidgruppe in reduziertem Zustand gehalten werden muss, wurde stellvertretend die Kompatibilität des C3-Cl-Derivats mit verschiedenen Reduktionsmitteln getestet. Dazu wurde Rab1b (50 µM) mit dem C3-Cl-Derivat (500 µM) und katalytischen Mengen an AnkX_{WT} (500 nM) in Anwesenheit unterschiedlicher Reduktionsmittel (1 mM) über Nacht inkubiert und anschließend mittels Massenspektrometrie analysiert (Abbildung 29). Als Reduktionsmittel wurden β-Mercaptoethanol (β-Me), 1,3-Dithiothreitol (DTT), und Tris-(2-carboxyethyl)-phosphin (TCEP) eingesetzt. Dabei wurde beobachtet, dass lediglich β-Me vollständig kompatibel mit dem C3-Cl-Derivat ist und zur spezifischen Entstehung von Rab1b-PC-C3-Cl ohne weitere Nebenprodukte führt. In Anwesenheit von DTT und TCEP lässt sich neben dem erwarteten Rab1b-PC-Konjugat jeweils ein weiteres Nebenprodukt detektieren, dessen Größenzunahme der Anlagerung von DTT bzw. TCEP an Rab1b-PC-C3-Cl entspricht. Somit kreuzreagiert auch das Phosphin-haltige Reduktionsmittel TCEP mit dem thiolreaktiven C3-Cl-Derivat. Eine derartige Reaktion zwischen TCEP und Halogenacetamiden konnte bereits von Shafer et al. beobachtet werden.²¹⁰ Da β-Me als einziges Reduktionsmittel vollständig kompatibel mit der Chloracetamidfunktionalität ist, wurden die folgenden Experimente in Gegenwart von β-Me durchgeführt.

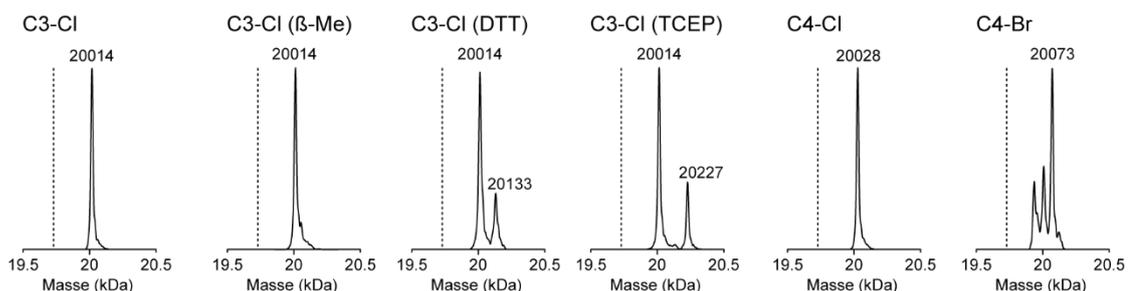


Abbildung 29 Eignung thiolreaktiver CDP-Cholin Derivate als Cosubstrate für die AnkX-vermittelte Phosphocholinierung und ihre Kompatibilität mit unterschiedlichen Reduktionsmitteln. Rab1b (50 µM) wurde mit einem thiolreaktiven CDP-Cholin-Derivat (500 µM) und katalytischen Mengen an AnkX_{WT} (500 nM) über Nacht bei RT inkubiert. Bei Inkubation mit dem C3-Cl-Derivat wurden zusätzlich unterschiedliche Reduktionsmittel eingesetzt (β-Me, DTT oder TCEP, 1 mM). Anschließend wurde die Modifizierung von Rab1b mittels Massenspektrometrie überprüft. Die gestrichelte schwarze Linie gibt die Masse von unmodifiziertem Rab1b an (19729 Da). Die erwarteten Massen für die Modifizierung von Rab1b sind: 20014 Da (Rab1b-PC-C3-Cl), 20028 Da (Rab1b-PC-C4-Cl) und 20073 Da (Rab1b-PC-C4-Br). Die Massen von 20133 und 20227 entsprechen einer Anlagerung von DTT bzw. TCEP an Rab1b-PC-C3-Cl.

Als nächstes sollten Aminosäuren in AnkX identifiziert werden, die für eine Mutation zu Cystein und die anschließende kovalente Reaktion mit den thiolreaktiven CDP-Cholin-Derivaten geeignet sind. Auf Grundlage der Kristallstruktur von AnkX₁₋₄₈₄ im Komplex mit CDP-Cholin (PDB-Eintrag: 4BET)³⁸ wurden neun Aminosäuren für die Mutation zu Cystein ausgewählt (Abbildung 30). Die ausgewählten Aminosäuren befinden sich dabei in einem Abstand zur Cholin Kopfgruppe, der von dem kurzen Kohlenstoff-Linker und der Halogenacetamidgruppe der thiolreaktiven Derivate potenziell überbrückt werden könnte.

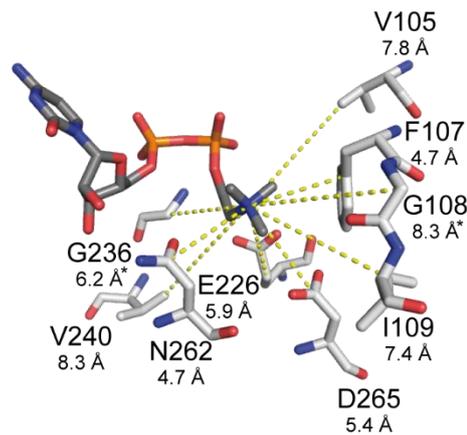


Abbildung 30 Auswahl an Aminosäuren von AnkX für die Mutagenese zu Cystein. Die Distanz zwischen der Cholin Kopfgruppe von CDP-Cholin und dem γ -Kohlenstoff der jeweiligen Aminosäure ist in Å angegeben (PDB-Eintrag: 4BET).³⁸ Die mit einem Stern (*) markierten Distanzen wurden vom α -Kohlenstoff von Glycin-Resten gemessen.

Zunächst sollte die Fähigkeit der generierten AnkX_{Cys}-Varianten zur Bildung des ternären Komplexes mit Rab1b und den unterschiedlichen thiolreaktiven CDP-Cholin-Derivaten im direkten Ansatz getestet werden. Dazu wurden die AnkX_{Cys}-Varianten (50 μ M) zuerst über Nacht mit einem der drei zur Verfügung stehenden CDP-Cholin-Analoga (1 mM) inkubiert und anschließend über Nacht mit Rab1b (100 μ M) umgesetzt. Anschließend wurde die ternäre Komplexbildung über die Bandenverschiebung in SDS-PAGE-Gelen untersucht (Abbildung 31).

Dabei sind unerwarteterweise sowohl für alle AnkX_{Cys}-Varianten als auch für AnkX_{WT} mehrere höhermolekulare Banden zu beobachten. Dies deutet auf Nebenreaktionen der Halogenacetamidgruppe mit einem oder mehreren der acht endogenen Cysteine von AnkX hin. Diese Komplexe werden im Folgenden als unspezifische AnkX_{Cys}:PC:Rab1b Komplexe bezeichnet. Bei den AnkX_{Cys}-Varianten V105C, F107C, G108C, E226C, G236C, N262C und D265C kann jedoch auch eine spezifische Bande beobachtet werden, die bei der Reaktion von AnkX_{WT} nicht auftritt. Das Auftreten dieser zusätzlichen Bande ist außerdem abhängig von der Länge und der Art der thiolreaktiven Gruppe des eingesetzten CDP-Cholin-Derivats. Daher

wurde angenommen, dass es sich bei dieser Bande um den AnkX_{Cys}:PC:Rab1b Komplex handelt, welcher über das rekombinant eingeführte Cystein verknüpft ist. Dieser Komplex wird im Folgenden als spezifischer AnkX_{Cys}:PC:Rab1b Komplex bezeichnet. Die stärkste spezifische Komplexbande kann für die AnkX_{Cys}-Variante D265C in Kombination mit dem C3-Cl-Derivat detektiert werden.

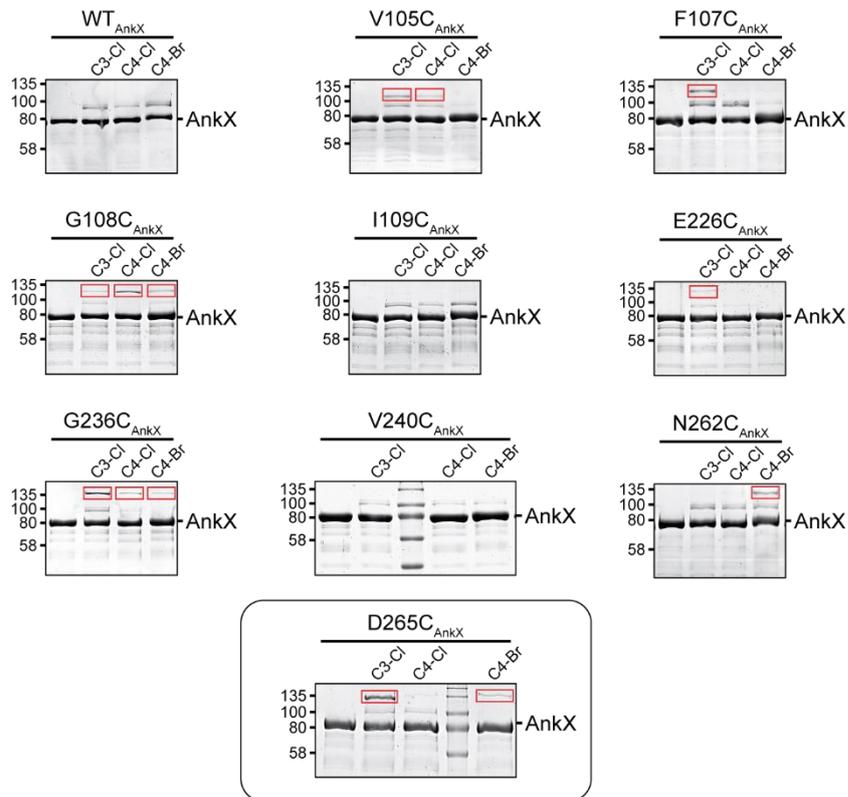


Abbildung 31 Analytische Bildung des AnkX_{Cys}:PC:Rab1b-Komplexes im direkten Ansatz. AnkX_{Cys} (50 µM) wurde zunächst mit einem thiolreaktiven CDP-Cholin-Derivat (C3-Cl, C4-Cl oder C4-Br, 1 mM) über Nacht bei RT inkubiert und anschließend mit Rab1b (100 µM) über Nacht bei RT umgesetzt. Die Bildung des ternären Komplexes wurde über die Bandenverschiebung in SDS-PAGE-Gelen analysiert. Spezifische AnkX_{Cys}:PC:Rab1b-Komplexe sind mit einem roten Rechteck gekennzeichnet. Die Laufhöhe spezifischer bzw. unspezifischer Komplexe variiert dabei in Abhängigkeit des rekombinant eingeführten bzw. endogenen Cysteins, welches die kovalente Verknüpfung zu Rab1b ausbildet. Die Experimente wurden von Marietta Kaspers unter Anleitung im Rahmen ihrer Masterarbeit durchgeführt.

Als Nächstes wurde getestet, wie sich die AnkX_{Cys}-Varianten im indirekten Ansatz verhalten. Dazu wurde Rab1b zunächst durch katalytische Mengen an AnkX_{WT} präparativ mit den thiolreaktiven CDP-Cholin-Derivaten modifiziert. Anschließend wurde das Rab1b-PC-Konjugat (50 µM) mit AnkX_{Cys} (200 µM) über Nacht inkubiert und die ternäre Komplexbildung über die Bandenverschiebung in SDS-PAGE-Gelen analysiert (Abbildung 32).

Ebenso wie im direkten Ansatz lassen sich für alle AnkX_{Cys}-Varianten unspezifische Komplexe beobachten. Im Gegensatz zum direkten Ansatz kann lediglich für die beiden AnkX_{Cys}-Varianten G108C und G236C der spezifische AnkX_{Cys}:PC:Rab1b-Komplex nachgewiesen

werden. Die stärkste spezifische Komplexbande ergibt sich für die AnkX_{Cys}-Variante G108C in Kombination mit dem C3-Cl-Derivat.

Sowohl beim direkten als auch beim indirekten Ansatz wird abhängig von der eingesetzten AnkX_{Cys}-Variante meistens eines der drei thiolreaktiven CDP-Cholin-Derivate gegenüber den anderen beiden Derivaten für die Bildung des spezifischen AnkX_{Cys}:PC:Rab1b-Komplexes bevorzugt wird. Generell ist dabei die Präferenz für den C3-Linker und die Chloracetamidgruppe stärker als für den C4-Linker und die hochreaktive Bromacetamidgruppe.

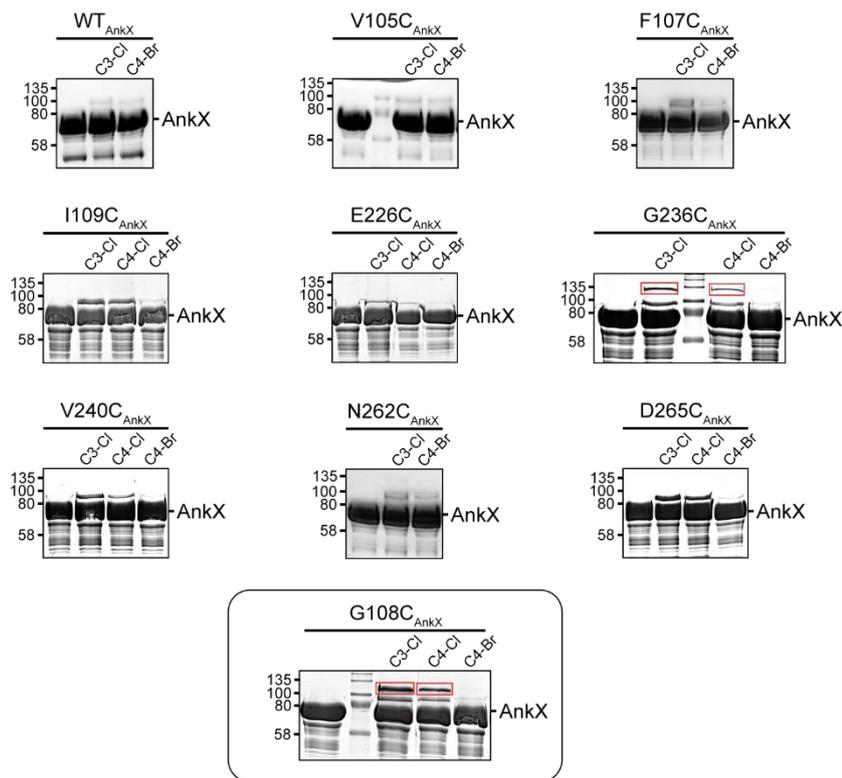


Abbildung 32 Analytische Bildung des AnkX_{Cys}:PC:Rab1b-Komplexes im indirekten Ansatz. Rab1b wurde zunächst durch katalytische Mengen an AnkX_{WT} präparativ mit den thiolreaktiven CDP-Cholin-Derivaten (C3-Cl, C4-Cl oder C4-Br) modifiziert. Anschließend wurde das Rab1b-PC-Konjugat (50 µM) mit AnkX_{Cys} (200 µM) über Nacht bei RT inkubiert. Die Bildung des ternären Komplexes wurde über die Bandenverschiebung in SDS-PAGE-Gelen analysiert. Spezifische AnkX_{Cys}:PC:Rab1b-Komplexe sind mit einem roten Rechteck gekennzeichnet. Die Laufhöhe spezifischer bzw. unspezifischer Komplexe variiert dabei in Abhängigkeit des rekombinant eingeführten bzw. endogenen Cysteins, welches die kovalente Verknüpfung zu Rab1b ausbildet. Die Experimente wurden von Marietta Kaspers unter Anleitung im Rahmen ihrer Masterarbeit durchgeführt.

Die initialen Versuche konnten zeigen, dass es möglich ist, den spezifischen AnkX_{Cys}:PC:Rab1b-Komplex durch den Einsatz der thiolreaktiven CDP-Cholin-Derivate zu bilden. Daher sollte in Kombination mit dem C3-Cl-Derivat der direkte Ansatz für AnkX_{D265C} und der indirekte Ansatz für AnkX_{G108C} optimiert werden. Das Ziel war dabei einerseits die Ausbeute des spezifischen Komplexes zu steigern und andererseits die Ausbildung unspezifischer Komplexe zu unterbinden.

Zunächst sollte die binäre Adduktbildung des direkten Ansatzes hinsichtlich Reaktionsdauer und Reaktionstemperatur optimiert werden. Außerdem sollte überprüft werden, ob es durch einen zusätzlichen Reinigungsschritt nach der binären Adduktbildung möglich ist, die Ausbildung unspezifischer Komplexe zu unterbinden. Dazu wurde AnkX_{D265C} (50 µM) mit dem C3-Cl-Derivat (1 mM) bei unterschiedlichen Temperaturen (20 °C, 25 °C, 30 °C oder 37 °C) inkubiert. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten (12 h, 24 h, 48 h und 72 h) wurden Proben der Reaktionsansätze genommen und durch Puffertausch von überschüssigem C3-Cl-Derivat gereinigt. Anschließend wurde das aufgereinigte binäre Addukt (50 µM) mit Rab1b (100 µM) bei 20 °C für 24 h inkubiert und die ternäre Komplexbildung über die Bandenverschiebung in SDS-PAGE-Gelen analysiert (Abbildung 33).

Da die ternäre Komplexbildung für alle Ansätze gleich lang durchgeführt wurde, ist die Menge an entstandenem ternären Komplex proportional zur Menge an vorhandenem binären Addukt. Die Menge an vorhandenem binären Addukt und somit die Menge an gebildetem ternären Komplex nimmt mit steigender Temperatur und zunehmender Inkubationszeit kontinuierlich zu. Die maximale Ausbeute des ternären Komplexes beträgt dabei ca. 50 % und wird erzielt, wenn die binäre Adduktbildung bei 37 °C für 72 h durchgeführt wird. Es ist gilt zu beachten, dass bei einer Inkubationstemperatur von 37 °C jedoch verhältnismäßig viel Protein präzipitiert. Da in keinem Fall eine quantitative Umsetzung zum ternären Komplex beobachtet werden konnte, wird vermutet, dass die binäre Adduktbildung selbst bei Inkubationszeiten von 72 h nicht quantitativ abläuft.

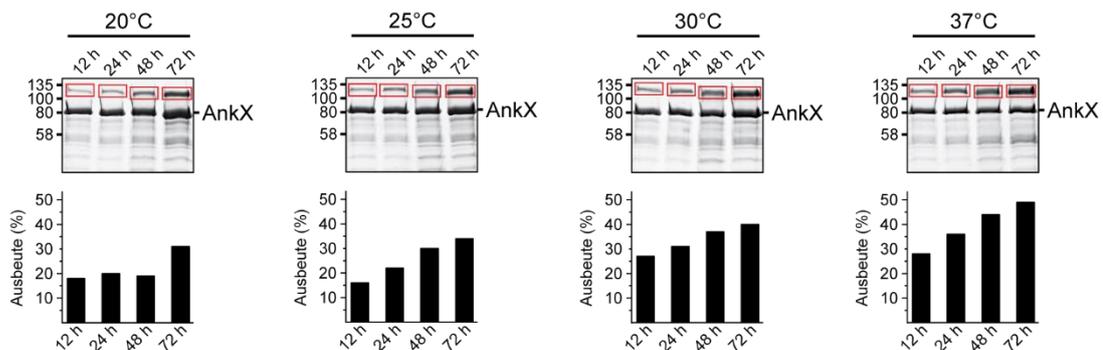


Abbildung 33 Optimierung der binären Adduktbildung im direkten Ansatz. AnkX_{D265C} (50 µM) wurde mit dem C3-Cl-Derivat (1 mM) bei unterschiedlichen Temperaturen inkubiert. Das binäre Addukt wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten durch Puffertausch von überschüssigem C3-Cl-Derivat gereinigt. Anschließend wurde das aufgereinigte binäre Addukt (50 µM) mit Rab1b (100 µM) bei 20 °C für 24 h inkubiert und die ternäre Komplexbildung über die Bandenverschiebung in SDS-PAGE-Gelen untersucht. Durch die Aufreinigung des binären Addukts konnte die Bildung unspezifischer Komplexe unterbunden werden. Spezifische AnkX_{D265C}:PC:Rab1b-Komplexe sind mit einem roten Rechteck gekennzeichnet. Die Ausbeute der ternären Komplexbildung wurde densitometrisch bestimmt (siehe Anhang Tabelle 29). Die Experimente wurden von Marietta Kaspers unter Anleitung im Rahmen ihrer Masterarbeit durchgeführt.

Interessanterweise lassen sich für keinen der Ansätze unspezifische Komplexbanden detektieren. Die Ausbildung unspezifischer Komplexe kann im direkten Ansatz folglich

unterbunden werden, indem das binäre Addukt vor der Umsetzung mit Rab1b von überschüssigem Derivat befreit wird. Dies legt nahe, dass die unspezifischen Reaktionen im direkten Ansatz erst dann ablaufen, wenn Rab1b dem Ansatz zugesetzt wird.

Anschließend wurde die Temperatur- und Zeitabhängigkeit der ternären Komplexbildung untersucht. Dazu wurde zunächst binäres Addukt aus AnkX_{265C} (50 µM) und dem C3-CI-Derivat (1 mM) bei 37 °C für 48 h gebildet. Überschüssiges C3-CI-Derivat wurde durch Puffertausch entfernt. Danach wurde das aufgereinigte binäre Addukt (50 µM) mit Rab1b (100 µM) bei unterschiedlichen Temperaturen (20 °C, 25 °C, 30 °C oder 37 °C) inkubiert und die ternäre Komplexbildung zu unterschiedlichen Zeitpunkten (2 h, 4 h, 6 h und 24 h) über die Bandenverschiebung in SDS-PAGE-Gelen verfolgt (Abbildung 34).

Unabhängig von der Temperatur beträgt die Ausbeute an ternärem Komplex bereits nach 2 h ca. 40 % und steigt im Anschluss nicht mehr nennenswert an. Somit scheint bereits nach 2 h die komplette Menge an vorhandenem binärem Addukt umgesetzt zu sein. Der limitierende Schritt des direkten Ansatzes ist demnach die Formierung des binären Addukts zwischen AnkX_{Cys} und dem thiolreaktiven CDP-Cholin-Derivat. Die anschließende Phosphocholinierung von Rab1b durch das binäre Addukt läuft hingegen vergleichsweise schnell ab. Durch hohe Temperaturen und lange Inkubationszeiten der binären Adduktbildung kann eine akzeptable Ausbeute des AnkX_{265C}:PC:Rab1b-Komplexes erzielt werden.

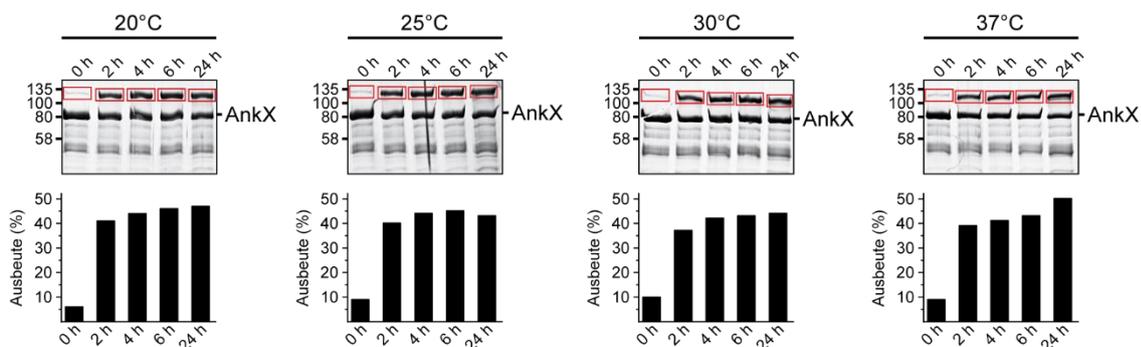


Abbildung 34 Optimierung der ternären Komplexbildung im direkten Ansatz. Zunächst wurde das binäre Addukt aus AnkX_{265C} (50 µM) und dem C3-CI-Derivat (1 mM) bei 37 °C für 48 h gebildet. Überschüssiges C3-CI-Derivat wurde durch Puffertausch entfernt. Anschließend wurde das aufgereinigte binäre Addukt (50 µM) mit Rab1b (100 µM) bei unterschiedlichen Temperaturen inkubiert und die ternäre Komplexbildung zeitabhängig über die Bandenverschiebung in SDS-PAGE-Gelen untersucht. Spezifische AnkX_{D265C}:PC:Rab1b-Komplexe sind mit einem roten Rechteck gekennzeichnet. Die Ausbeute der ternären Komplexbildung wurde densitometrisch bestimmt (siehe Anhang Tabelle 30). Die Experimente wurden von Marietta Kaspers unter Anleitung im Rahmen ihrer Masterarbeit durchgeführt.

Ähnlich zum direkten Ansatz sollte der indirekte Ansatz für AnkX_{G108C} in Kombination mit dem C3-CI-Derivat optimiert werden. Da bereits bekannt war, dass Rab1b über Nacht präparativ mit dem C3-CI-Derivat modifiziert werden kann, musste lediglich die ternäre Komplexbildung von Rab1b-PC-C3-CI mit AnkX_{G108C} optimiert werden. Im indirekten Ansatz bestand im

Gegensatz zum direkten Ansatz jedoch keine Möglichkeit, die Bildung unspezifischer Komplexe durch zusätzliche Reinigungsschritte zu unterbinden. Durch den Einsatz einer AnkX_{G108C}-Variante, in der die drei Cysteine C48_{AnkX}, C84_{AnkX} und C172_{AnkX} durch Serin ersetzt wurden, konnten unspezifische Nebenreaktionen allerdings verhindert werden (Abbildung 35).

Diese AnkX_{G108C}-Variante wurde daher für die Optimierung der ternären Komplexbildung, sowie für alle weiteren Experimente des indirekten Ansatzes verwendet und wird im Folgenden mit AnkX_{G108C} (ohne Angabe der Mutationen C48S_{AnkX}, C84S_{AnkX} und C172S_{AnkX}) bezeichnet.

Um im direkten Ansatz die Bildung des ternären Komplexes zu optimieren, wurde präparativ hergestelltes Rab1b-PC-C3-Cl (50 µM) mit AnkX_{G108C} (200 µM) bei 20 °C inkubiert. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten (1 h, 2 h, 4 h, 8 h, 24 h und 48 h) wurden Proben genommen und über die Bandenverschiebung in einem SDS-PAGE-Gel auf die Bildung des ternären Komplexes untersucht (Abbildung 35).

Nach 1 h beträgt die Ausbeute des ternären Komplexes bereits knapp 30 % und steigt im Anschluss langsam weiter an, bis sie nach 48 h ca. 60 % erreicht. Demnach ist für den indirekten Ansatz die Reaktion zwischen dem Rab1b-PC-Konjugat und AnkX_{G108C} der geschwindigkeitsbestimmende Schritt.

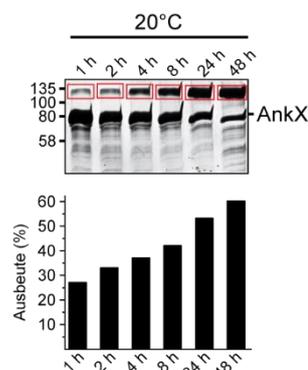


Abbildung 35 Optimierung der ternären Komplexbildung im indirekten Ansatz. Zunächst wurde Rab1b durch katalytische Mengen an AnkX_{WT} präparativ mit dem C3-Cl-Derivat modifiziert. Anschließend wurde das Rab1b-PC-Konjugat (50 µM) mit AnkX_{G108C} (200 µM) bei 20 °C inkubiert und die ternäre Komplexbildung zeitabhängig über die Bandenverschiebung in einem SDS-PAGE-Gel untersucht. Die Bildung unspezifischer Komplexe konnte durch Mutation der Cysteine C48_{AnkX}, C84_{AnkX} und C172_{AnkX} unterbunden werden. Spezifische AnkX_{D265C}:PC:Rab1b-Komplexe sind mit einem roten Rechteck gekennzeichnet. Das Ausmaß der ternären Komplexbildung wurde densitometrisch bestimmt (siehe Anhang Tabelle 31). Die Experimente wurden von Marietta Kaspers unter Anleitung im Rahmen ihrer Masterarbeit durchgeführt.

Durch die Optimierungsexperimente konnten unspezifische Nebenreaktionen bei der Herstellung des AnkX_{Cys}:PC:Rab1b-Komplexes unterbunden werden. Interessanterweise konnte im direkten Ansatz die Bildung unspezifischer Komplexe verhindert werden, indem das binäre Addukt aus AnkX_{Cys} und thiolreaktivem CDP-Cholin-Derivat vor der Umsetzung mit Rab1b von überschüssigem Nukleotid befreit wurde. Im indirekten Ansatz konnten

unspezifische Nebenreaktionen nicht durch die Abtrennung von überschüssigem Nukleotid nach der Bildung des Rab1b-PC-Konjugats unterbunden werden, sondern erst durch die Mutation von drei endogenen Cysteinen (C48_{AnkX}, C84_{AnkX} und C172_{AnkX}) zu Serin. Dies deutet darauf hin, dass die unspezifischen Komplexe in beiden Ansätzen durch eine Reaktion von Rab1b-PC-Konjugat mit den genannten Cysteinen entstehen: Trennt man im direkten Ansatz das thiolreaktive CDP-Cholin-Derivat vor Zugabe von Rab1b nicht ab, so ist freies AnkX_{Cys}, welches nicht zum binären Addukt umgesetzt wurde, in der Lage, Rab1b mit dem überschüssigen Nukleotid zu modifizieren. Auf diese Weise entsteht auch im direkten Ansatz Rab1b-PC-Konjugat, welches analog zum indirekten Ansatz zu Nebenreaktionen mit den endogenen AnkX-Cysteinen führen kann.

Des Weiteren konnte durch die Optimierung der Reaktionsbedingungen die Ausbeute des AnkX_{Cys}:PC:Rab1b-Komplexes gesteigert werden. Beim direkten Ansatz ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt die Bildung des binären Addukts aus AnkX_{D265C} und thiolreaktivem CDP-Cholin-Derivat. Die maximale Ausbeute von ca. 50 % bei minimaler Proteinpräzipitation konnte bei einer Temperatur von 30 °C und einem Inkubationszeitraum von 72 h beobachtet werden. Beim indirekten Ansatz ist die Reaktion von AnkX_{G108C} mit dem Rab1b-PC-Konjugat der limitierende Schritt. Hier konnte die maximale Ausbeute von ca. 60 % bei einer Temperatur von 20 °C und einem Inkubationszeitraum von 48 h erzielt werden. Da der indirekte Ansatz bei schonenderen Temperaturen durchgeführt werden kann als der direkte Ansatz und innerhalb eines kürzeren Zeitraums zu einer höheren Ausbeute führt, wurde der AnkX_{G108C}:PC:Rab1b-Komplex im präparativen Maßstab hergestellt.

Um zu überprüfen, ob durch die kovalente Verknüpfung möglicherweise komplexe Multimere entstehen, die über SDS-PAGE nicht nachzuweisen sind, wurde der präparativ produzierte Komplex mittels analytischer Größenausschlusschromatographie analysiert. Zu diesem Zweck wurden der kovalente AnkX_{G108C}:PC:Rab1b-Komplex (110 kDa) sowie eine 1:1-Mischung aus AnkX_{G108C} (90 kDa) und Rab1b (20 kDa) über eine Superdex 200 10/300 Säule aufgetrennt (Abbildung 36).

Obwohl das Molekulargewicht des ternären Komplexes im Vergleich zu freiem AnkX_{G108C} um 20 kDa zunimmt, ist keine Verschiebung des Elutionsvolumens zu beobachten. Dies könnte darauf hindeuten, dass Rab1b im kovalenten Komplex in einen Hohlraum von AnkX_{G108C} bindet. Die Elution des AnkX_{G108C}:PC:Rab1b-Komplexes in einer einzigen Fraktion und die Abwesenheit höhermolekularer Fraktionen bestätigt die hohe Integrität des hergestellten AnkX_{G108C}:PC:Rab1b-Komplexes.

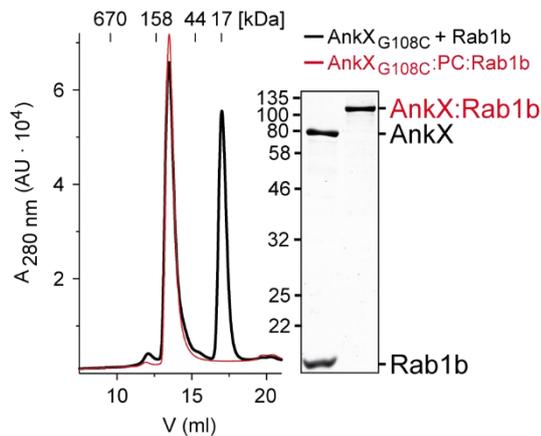


Abbildung 36 Analytische Größenausschlusschromatographie des präparativ hergestellten $\text{AnkX}_{\text{G108C}}:\text{PC}:\text{Rab1b}$ -Komplexes. Eine Probe des $\text{AnkX}_{\text{G108C}}:\text{PC}:\text{Rab1b}$ -Komplexes (110 kDa, 110 ng) sowie eine 1:1-Mischung aus $\text{AnkX}_{\text{G108C}}$ (90 kDa, 90 ng) und Rab1b (20 kDa, 20 ng) wurden über eine Superdex 200 10/300 Säule aufgetrennt und die Absorption bei 280 nm aufgenommen. Die der Größenausschlusschromatographie zugeführten Proben wurden zusätzlich über SDS-PAGE analysiert (500 ng Protein).

3.5.2 Strukturelle und biochemische Analyse der AnkX-Rab1b-Interaktion

In Kooperation mit Prof. Dr. Michael Groll und Felix Ecker (Lehrstuhl für Biochemie, TUM) wurde der präparativ hergestellte $\text{AnkX}_{\text{G108C}}:\text{PC}:\text{Rab1b}:\text{GDP}$ -Komplex kristallisiert und die Struktur mittels Röntgenkristallographie bestimmt. Kristalle des $\text{AnkX}_{\text{G108C}}:\text{PC}:\text{Rab1b}$ -Komplexes beugten mit einer Auflösung von 3,2 Å. Die Kristallstruktur des Komplexes wurde durch molekularen Ersatz mit den Suchmodellen von Rab1b:GppNHp (PDB-Eintrag 3NKV)²⁹ und AnkX_{1-484} (PDB-Eintrag 4BET)³⁸ gelöst (Abbildung 37a). Die gelöste Komplexstruktur wurde unter dem Eintrag 6SKU in der PDB hinterlegt.

AnkX_{1-800} bildet eine sichelförmige Struktur aus, die Rab1b in ihrem Zentrum umschließt. Der Großteil der sichelförmigen Struktur wird dabei von der AS-Region 351-800 gebildet, welche insgesamt 13 Ankyrin-*Repeats* enthält. Während die AR 1-4 wie bereits bekannt zur strukturellen Stabilisierung der FIC-Domäne beitragen,³⁸ bilden die AR 5-13 eine Vielzahl an Interaktionen zu Rab1b aus (Abbildung 37a, b).

Rab1b zeigt die klassische GTPase-Faltung, die aus einem zentralen β -Faltblatt mit sechs Strängen ($\beta 1$ - $\beta 6$) umgeben von fünf α -Helices ($\alpha 1$ - $\alpha 5$) besteht. Im AS-Bereich 68-74, welcher sich in der *Switch II*-Region von Rab1b (AS 64-83) befindet, kann keine Elektronendichte beobachtet werden. $\text{S76}_{\text{Rab1b}}$, welches von AnkX phosphocholiniert wird und die kovalente Verknüpfung ausbildet, zeigt jedoch deutliche Elektronendichte. Für die PC-basierte Verknüpfung zu $\text{G108C}_{\text{AnkX}}$ lässt sich keine Elektronendichte beobachten. Dies deutet darauf hin, dass es sich bei dem verwendeten Linker um ein flexibles Element handelt, welches den $\text{AnkX}_{\text{G108C}}:\text{PC}:\text{Rab1b}:\text{GDP}$ -Komplex in keine vorherbestimmte Konformation drängt. Die Distanz zwischen $\text{S76}_{\text{Rab1b}}$ und $\text{G108C}_{\text{AnkX}}$ liegt mit 14,2 Å in einer Größenordnung, die durch den PC-basierten Linker überbrückt werden kann. Über SDS-PAGE-Analyse konnte gezeigt

werden, dass die kovalente Verknüpfung in Kristallen auch bei längerer Inkubation bei 20 °C intakt bleibt (Anhang Abbildung 46). Somit ist wahrscheinlich, dass die kovalente Verknüpfung auch im vorliegenden Komplex intakt ist und nicht als Folge der Proteinkristallisation gespalten wurde. Ferner gilt zu beachten, dass die *Switch II*-Region inklusive S76_{Rab1b} im vorliegenden Komplex nicht vollständig in das aktive Zentrum von AnkX eindringt. Es ist daher denkbar, dass es sich bei der vorliegenden Struktur um einen Komplex mit post-katalytischen Eigenschaften handelt. Der *Switch I*-Bereich von Rab1b (AS 30-43) besitzt einen deutlich höheren B-Faktor als die restliche G-Domäne, was auf strukturelle Flexibilität in diesem Bereich hindeutet.

Ausgehend von der Kristallstruktur des Komplexes lassen sich drei räumlich abzugrenzende Interaktionsbereiche zwischen AnkX und Rab1b beobachten (Abbildung 37a, c). Eine Region, in der wie zu erwarten Interaktion stattfindet, befindet sich zwischen der katalytischen FIC-Domäne von AnkX und dem *Switch II* von Rab1b, da hier das zu modifizierende S76_{Rab1b} lokalisiert ist. Eine zweite Interaktionsfläche liegt zwischen den AR 5-9 von AnkX und dem *Switch I* von Rab1b, welcher bei GTPasen ebenso wie der *Switch II* typischerweise an der Ausbildung von Wechselwirkungen beteiligt ist. Interessanterweise legt die Struktur des AnkX_{G108C}:PC:Rab1b:GDP-Komplexes ferner nahe, dass die AR 10-13 von AnkX mit dem C-terminalen Bereich der G-Domäne von Rab1b interagieren. Diese Region ist bisher für keine andere GTPase als Interaktionsplattform beschrieben, was einen einzigartigen Bindemodus von AnkX vermuten lässt.

Um die strukturellen Veränderungen zu veranschaulichen, die Rab1b nach der Bindung durch AnkX erfährt, wurde die Struktur von Rab1b aus dem AnkX_{G108C}:PC:Rab1b:GDP-Komplex mit der Kristallstruktur von Rab1b:GppNHp (PDB-Eintrag: 3NKV)²⁹ verglichen. Bei GppNHp (Guanosin-(β,γ)-imidotriphosphat) handelt es sich um ein GTP-Derivat, dessen Bindung zwischen β- und γ-Phosphat nicht hydrolysierbar ist. Da für Rab1b keine Kristallstruktur im GDP-Zustand vorhanden war und da sowohl Rab1b:GDP als auch Rab1b:GTP Substrate für AnkX sind, wurde die Struktur von Rab1b:GppNHp für die Repräsentation der Struktur der kleinen GTPase vor der Bindung durch AnkX gewählt (Abbildung 37d).

Obwohl der C-Terminus und der *Switch I* von Rab1b durch die AR 5-13 von AnkX kontaktiert werden, lassen sich in diesen Regionen bei der Bindung durch AnkX keine strukturellen Änderungen der kleinen GTPase beobachten. Die *Switch II*-Region, in der die PC-Modifikation eingeführt wird, ist in der Komplexstruktur jedoch beträchtlich umgeordnet.

Die postulierten Interaktionsflächen zwischen AnkX und Rab1b sollten anschließend experimentell untersucht werden. Da der B-Faktor der Ankyrin-*Repeats* vergleichsweise hoch ist, war es auf Grundlage des AnkX_{G108C}:PC:Rab1b:GDP-Komplexes nicht möglich, einzelne Aminosäuren von AnkX zu identifizieren, die Interaktionen zu Rab1b ausbilden könnten. Zu Beginn der Arbeit konnte jedoch bereits gezeigt werden, dass die C-terminale Verkürzung von

AnkX auf den AS-Bereich 1-688 die Enzymaktivität auf 2 % der Aktivität von AnkX_{WT} absinken lässt (siehe Abbildung 12a). Der deletierte AS-Bereich 689-800 enthält dabei die AR 11-13 von AnkX. Die experimentellen Beobachtungen und die Struktur des AnkX_{G108C}:PC:Rab1b:GDP-Komplexes deuten demnach darauf hin, dass die Interaktion zwischen den AR 10-13 von AnkX und dem C-terminalen Bereich der G-Domäne von Ra1b von Bedeutung für die AnkX-vermittelte Phosphocholinierung ist.

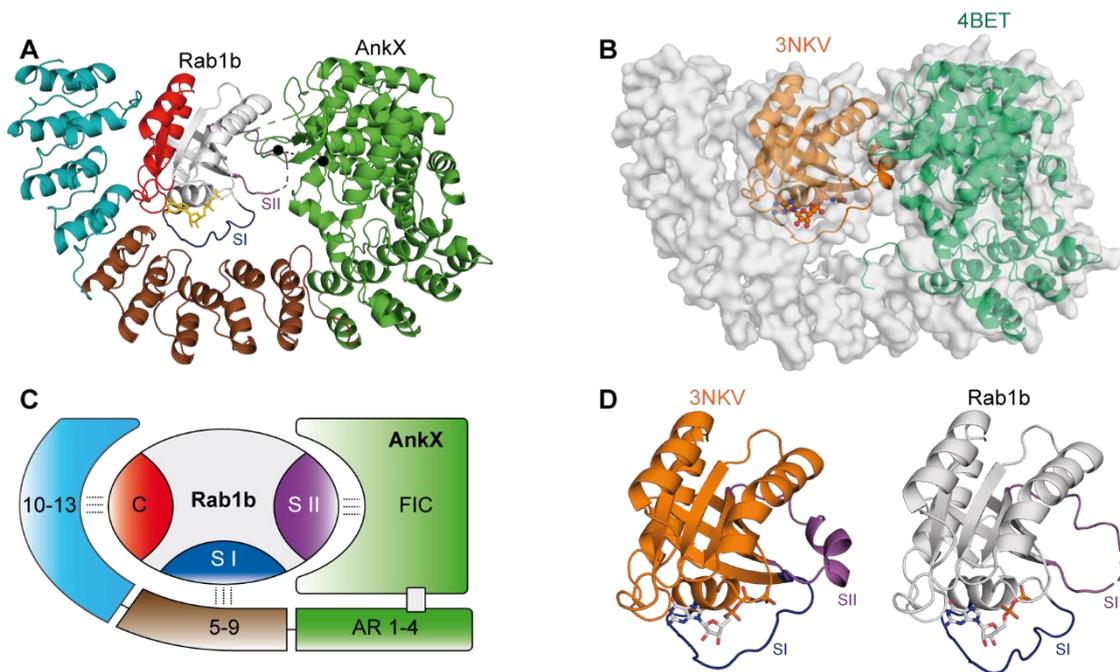


Abbildung 37 Kristallstruktur des AnkX_{G108C}:PC:Rab1b:GDP-Komplexes. **(A)** Bänderdarstellung des AnkX_{G108C}:PC:Rab1b:GDP-Komplexes. AnkX: grün: FIC-Domäne und AR 1-4, braun: AR 5-9, türkis: AR 10-13; Rab1b: blau: *Switch I*-Region, magenta: *Switch II*-Region, rot: C-terminaler Bereich der G-Domäne, goldene Stäbe: GDP; schwarze Kugeln: G108C_{AnkX} und S76_{Rab1b}. Die gestrichelte schwarze Linie deutet die kovalente Verknüpfung zwischen G108C_{AnkX} und S76_{Rab1b} an. **(B)** Oberflächenmodell des AnkX_{G108C}:PC:Rab1b:GDP-Komplexes. Das Oberflächenmodell des AnkX_{G108C}:PC:Rab1b-Komplexes (grau) ist mit den bisher bekannten Strukturen von Rab1b:GppNHp (PDB-Eintrag: 3NKV, orange)²⁹ und AnkX₁₋₄₈₄ (PDB-Eintrag: 4BET, grün)³⁸ überlagert. **(C)** Schematische Darstellung der Interaktionsflächen zwischen AnkX und Rab1b. Auf Basis der Komplexstruktur ergeben sich drei räumlich abgegrenzte Interaktionsflächen zwischen AnkX und Rab1b. Die Interaktionspartner sind dabei die FIC-Domäne und *Switch II* (S II), die AR 5-9 und *Switch I* (S I) sowie die AR 10-13 und der C-terminale Bereich der G-Domäne. **(D)** Strukturelle Änderungen in Rab1b (grau) bei der Bindung durch AnkX. Rab1b:GppNHp (PDB-Eintrag: 3NKV, orange)²⁹ repräsentiert die Struktur der kleinen GTPase vor der Bindung durch AnkX. Blau: *Switch I*-Region, magenta: *Switch II*-Region, graue Stäbe: GDP bzw. GppNHp.

Um die auf Basis der Kristallstruktur vorhergesagten Interaktionsflächen auf der Seite von Rab1b zu untersuchen, wurden repräsentative Aminosäuren in diesen Bereichen zu Alanin mutiert. Diese Rab1b-Alaninvarianten sollten zunächst in einem massenspektrometrischen Ansatz auf reduzierte Phosphocholinierung durch AnkX_{WT} untersucht werden. Dazu wurde Rab1b (1 µM) mit CDP-Cholin (50 µM) und katalytischen Mengen an AnkX_{WT} (3.75 nM) für 1 h

inkubiert. Anschließend wurde über Massenspektrometrie der Grad der Phosphocholinierung bestimmt (Abbildung 38a).

Von 29 untersuchten Rab1b-Alaninvarianten konnten 15 Mutanten identifiziert werden, die im Vergleich zu Rab1b_{WT} zu weniger als 70 % modifiziert werden. Für diese 15 Rab1b-Alaninvarianten wurde der k_{cat}/K_M -Wert für die AnkX-vermittelte Phosphocholinierung über einen Tryptophanfluoreszenz-basierten Ansatz bestimmt (Abbildung 38b). Dabei konnten in allen drei hypothetisierten Interaktionsbereichen Aminosäuren identifiziert werden, deren Mutation zu Alanin mit einer verminderten Phosphocholinierung verbunden ist (Abbildung 38c).

Darunter enthalten sind die ersten drei Aminosäuren der *Switch I*-Region (D30_{Rab1b}, D31_{Rab1b} und T32_{Rab1b}), die bekanntermaßen sowohl im inaktiven GDP-Zustand als auch im aktiven GTP-Zustand strukturell ähnlich geordnet sind und der Kristallstruktur zur Folge mit den AR 8-9 von AnkX interagieren. Ebenfalls enthalten sind Residuen der *Switch II*-Region (T74_{Rab1b}, S75_{Rab1b}, Y77_{Rab1b} und R79_{Rab1b}), welche sich in unmittelbarer Nähe zum modifizierten S76_{Rab1b} befinden, sowie Y109_{Rab1b}, welches in $\alpha 3$ von Rab1b lokalisiert ist. Da der *Switch II* von Rab1b im AnkX_{G108C}:PC:Rab1b:GDP-Komplex nicht bis in das aktive Zentrum von AnkX vordringt, kann auf Grundlage der Kristallstruktur nicht geklärt werden, mit welchen Aminosäuren des katalytischen Zentrums der *Switch II* während der Phosphocholinierung interagiert. Aminosäuren von Rab1b, deren Mutation zu Alanin zu einer verminderten Phosphocholinierung führt, konnten auch im C-terminalen Bereich der G-Domäne identifiziert werden und befinden sich in $\alpha 4$ (D141_{Rab1b}), der Schleife zwischen $\beta 6$ und $\alpha 5$ (K153_{Rab1b} und N154_{Rab1b}) sowie in $\alpha 5$ (N157_{Rab1b}, Q160_{Rab1b} und E168_{Rab1b}). Der Kristallstruktur zur Folge interagieren diese Aminosäuren mit den AR 10-13 von AnkX.

Die Aminosäuren, deren Mutation zu Alanin die Phosphocholinierung der kleinen GTPase am stärksten beeinträchtigt, befinden sich in der *Switch II*-Region von Rab1b. So ist die katalytische Effizienz der Mutanten T74A_{Rab1b} und Y77A_{Rab1b} auf ca. 5 % der katalytischen Effizienz von Rab1b_{WT} reduziert (Abbildung 38b). Es ist daher anzunehmen, dass T74_{Rab1b} und Y77_{Rab1b} eine wichtige Rolle während der Katalyse der AnkX-vermittelten Phosphocholinierung spielen. D31_{Rab1b} und Y109_{Rab1b} scheinen ebenfalls eine wichtige Rolle für die Phosphocholinierung von Rab1b zu spielen, da die katalytische Effizienz der entsprechenden Alaninvarianten auf ca. 15 % der katalytischen Effizienz von Rab1b_{WT} absinkt. Es wäre denkbar, dass D31_{Rab1b} (*Switch I*) bedeutend für die initiale Erkennung von Rab1b ist, während Y109_{Rab1b} ($\alpha 3$), welches in Richtung der FIC-Domäne von AnkX ausgerichtet ist, eine wichtige Rolle bei der anschließenden Phosphocholinierung spielen könnte. Bei den sechs im C-terminalen Bereich der G-Domäne identifizierten Aminosäuren bewirkt die Mutation zu Alanin eine eher moderate Verminderung der katalytischen Effizienz auf ca. 25-70 % der katalytischen Effizienz von Rab1b_{WT}. Dies spricht dafür, dass die Erkennung und Bindung des

C-terminalen Bereichs der G-Domäne durch AnkX weniger von einzelnen Residuen abhängt, sondern kumulativer Natur zu sein scheint.

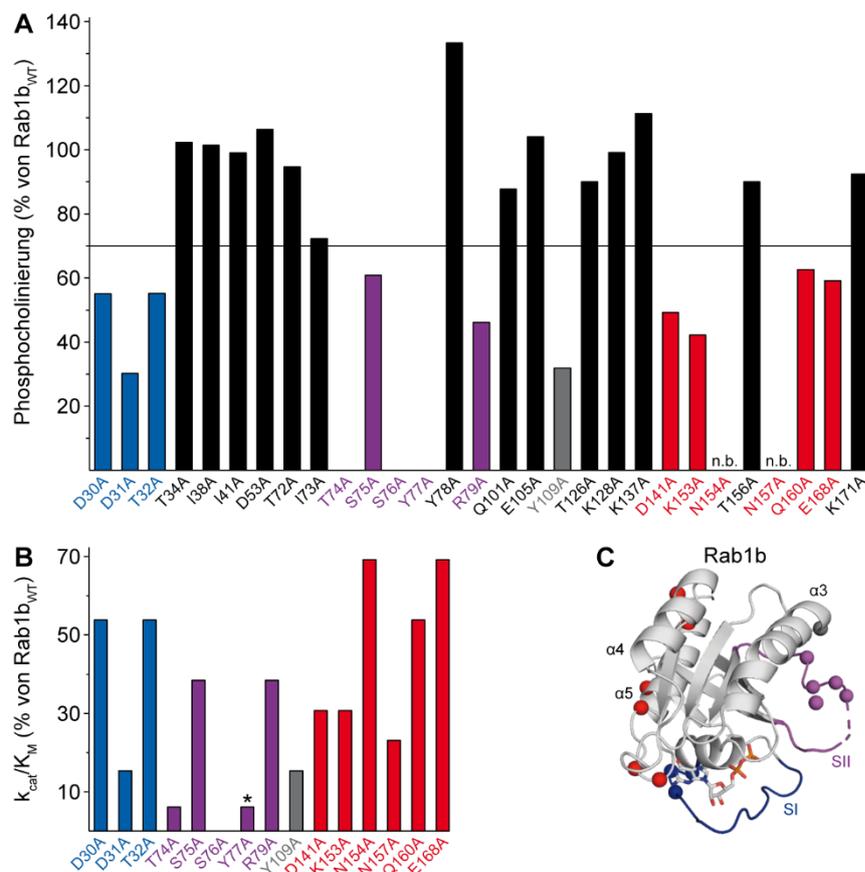


Abbildung 38 Biochemische Validierung der Interaktionsflächen zwischen AnkX und Rab1b. Massenspektrometrische Analyse der Phosphocholinylierung von repräsentativen Rab1b-Alaninvarianten aus den vorhergesagten Interaktionsflächen zwischen AnkX und Rab1b. Die Alaninvarianten wurden in kleinem Maßstab exprimiert und über magnetische Kügelchen aufgereinigt. Die aufgereinigten Alaninmutanten (1 μ M) wurden mit CDP-Cholin (50 μ M) und katalytischen Mengen an AnkX_{WT} (3,75 nM) für 1 h bei RT inkubiert. Das Ausmaß der Phosphocholinylierung wurde über Massenspektrometrie bestimmt und auf die Phosphocholinylierung von Rab1b_{WT} normalisiert. Für Alaninvarianten, die im Vergleich zu Rab1b_{WT} zu weniger als 70 % modifiziert wurden (farbige Kennzeichnung), wurde der k_{cat}/K_M -Wert für die AnkX-vermittelte Phosphocholinylierung bestimmt. Alaninmutanten mit reduzierter Phosphocholinylierung befinden sich in *Switch I* (blau), *Switch II* (magenta), $\alpha 3$ (grau) und im C-terminalen Bereich der G-Domäne von Rab1b. Für die Rab1b-Varianten N154A und N157A konnte bei den massenspektrometrischen Messungen kein Ionenspektrum aufgenommen werden und daher das Ausmaß der Phosphocholinylierung nicht bestimmt werden (n.b.). Die entsprechenden Zahlenwerte sind in Tabelle 32 des Anhangs zu finden. **(B)** Tryptophanfluoreszenzbasierte Bestimmung des k_{cat}/K_M -Werts von Rab1b-Alaninvarianten mit reduzierter Phosphocholinylierung aus Teilabbildung **(A)**. Eine Rab1b-Alaninmutante (5 μ M) und CDP-Cholin (1 mM) wurden in einer Fluoreszenzküvette vorgelegt und der Anstieg der Rab1b-Tryptophan (Trp)-Fluoreszenz nach Zugabe von AnkX (100 nM bzw. 250 nM bei den Rab1b-Varianten T74A, S76A, Y77A und Y109) aufgenommen. Die k_{cat}/K_M -Werte wurden durch die exponentielle Anpassung der aufgenommenen Fluoreszenzkurven ermittelt und auf den k_{cat}/K_M -Wert von Rab1b_{WT} normalisiert. Die entsprechenden Zahlenwerte sind in Tabelle 33 des Anhangs zu finden. Da die Phosphocholinylierung der Rab1b-Variante Y109A nicht mit einer Änderung der Tryptophanfluoreszenz verbunden ist, wurde die katalytische Effizienz dieser Mutante über Massenspektrometrie eingeschätzt (siehe Anhang Abbildung 46). Die Farbgebung ist dieselbe wie in Teilabbildung **(A)**. **(C)** Räumliche Lage der Rab1b-Alaninvarianten mit reduzierter Phosphocholinylierung im AnkX_{G108C}:PC:Rab1b:GDP-Komplex. Die C α -Atome der Rab1b-Alaninvarianten mit reduzierter Phosphocholinylierung sind als Kugeln dargestellt und befinden sich in *Switch I* (blau), *Switch II* (magenta), $\alpha 3$ (grau) und im C-terminalen Bereich der G-Domäne ($\alpha 4$, $\alpha 5$ und Schleife zwischen $\beta 6$ und $\alpha 5$; rot) von Rab1b. Graue Stäbe: GDP.

Insgesamt konnten die drei auf Basis der Kristallstruktur vorhergesagten Interaktionsbereiche zwischen AnkX und Rab1b durch die biochemische Mutations-Funktions-Analyse bestätigt werden. Die beobachteten Interaktionen über den C-terminalen Bereich der G-Domäne sind dabei ungewöhnlich für kleine GTPasen und deuten auf einen neuartigen Bindemodus von AnkX hin. Die Kristallstruktur und die biochemischen Experimente legen nahe, dass Rab1b über seinen *Switch I*-Bereich und den C-terminalen Bereich der G-Domäne initial durch die AR 8-13 von AnkX erkannt wird. Es wäre denkbar, dass die *Switch II*-Region von Rab1b durch diese initiale Bindung so vorpositioniert wird, dass die anschließende Phosphocholinierung von S76_{Rab1b} stattfinden kann.

3.5.3 Strukturelle Einblicke in die AnkX-vermittelte Phosphocholinierung

Nachdem die Bedeutung der Ankyrin-*Repeats* für die Bindung von Rab1b aufgezeigt werden konnte, wurde nun die Rolle der FIC-Domäne bei der AnkX-katalysierten Phosphocholinierung von Rab1b genauer untersucht. Im Gegensatz zu den meisten anderen FIC-Proteinen besitzt AnkX eine zusätzliche Domäne (AS 110-179), die zwischen die konservierte β -Schleife der FIC-Domäne inseriert ist und als Insertionsdomäne bezeichnet wird.³⁸ Diese zusätzliche Domäne enthält drei α -Helices und zwei β -Faltblätter, wobei die Schleife zwischen diesen beiden Faltblättern wie ein Dorn aus dem Enzym herausragt (siehe Abbildung 3). Diese Schleife (AS 141-144) wird im Folgenden als AnkX-Dorn bezeichnet.

In der Kristallstruktur des AnkX_{G108C}:PC:Rab1b:GDP-Komplexes interagiert der AnkX-Dorn mit Rab1b, indem er in den Bereich zwischen *Switch II* und $\alpha 3$ von Rab1b eindringt (Abbildung 39a, c). Das an der Spitze des Dorns lokalisierte F143_{AnkX} bindet auf diese Weise in eine hydrophobe Tasche von Rab1b, welche durch Residuen aus $\beta 1$ (L12_{Rab1b} und I14_{Rab1b}), $\beta 4$ (I84_{Rab1b}) und $\alpha 3$ (I106_{Rab1b}, Y109_{Rab1b} und A110_{Rab1b}) konstituiert wird. Bei der Mutationsanalyse im vorigen Kapitel wurde beobachtet, dass die Rab1b-Alaninvariante Y109A_{Rab1b} stark in der Phosphocholinierung eingeschränkt ist. Y109_{Rab1b} begrenzt das obere Ende der hydrophoben Tasche, in welche der AnkX-Dorn bindet (Abbildung 39c). Es ist daher denkbar, dass Y109_{Rab1b} als eine Art Führungselement fungiert und auf diese Weise die Bindung von F143_{AnkX} in die hydrophobe Tasche lenkt und erleichtert.

Bei Rab1b:GppNHp (PDB-Eintrag: 3NKV)²⁹, welches die Struktur der kleinen GTPase vor der Bindung durch AnkX repräsentiert, ist der Bereich zwischen *Switch II* und $\alpha 3$ von Rab1b für den AnkX-Dorn zunächst nicht frei zugänglich (Abbildung 39b, d). Die hydrophobe Tasche ist vor der Bindung durch AnkX von Y78_{Rab1b} besetzt (Abbildung 39d). Bei der Bindung durch AnkX kann Y78_{Rab1b} jedoch von F143_{AnkX} an der Spitze des AnkX-Dorns aus der hydrophoben Tasche verdrängt werden (Abbildung 39c).

Aus diesen Beobachtungen ergibt sich die Fragestellung, wie die Verdrängung von Y78_{Rab1b} durch F143_{AnkX} am Mechanismus der Phosphocholinierung von S76_{Rab1b} beteiligt sein könnte. Es wäre denkbar, dass S76_{Rab1b} in der kleinen GTPase strukturell fixiert ist und somit nicht spontan in das katalytische Zentrum von AnkX eindringen kann. Es ist bekannt, dass Rab1b im aktiven GTP-gebundenen Zustand ähnlich schnell von AnkX modifiziert wird wie im inaktiven GDP-gebundenen Zustand.³¹ Allgemein ist die *Switch II*-Region im GDP-gebundenen Zustand strukturell deutlich flexibler als im GTP-gebundenen Zustand. Falls die intrinsische strukturelle Flexibilität der *Switch II*-Region der ausschlaggebende Punkt für die Modifizierung von S76_{Rab1b} wäre, wäre zu erwarten gewesen, dass Rab1b im GDP-gebundenen Zustand wesentlich schneller phosphocholiniert wird als im GTP-gebundenen Zustand. Dies ist jedoch nicht der Fall.

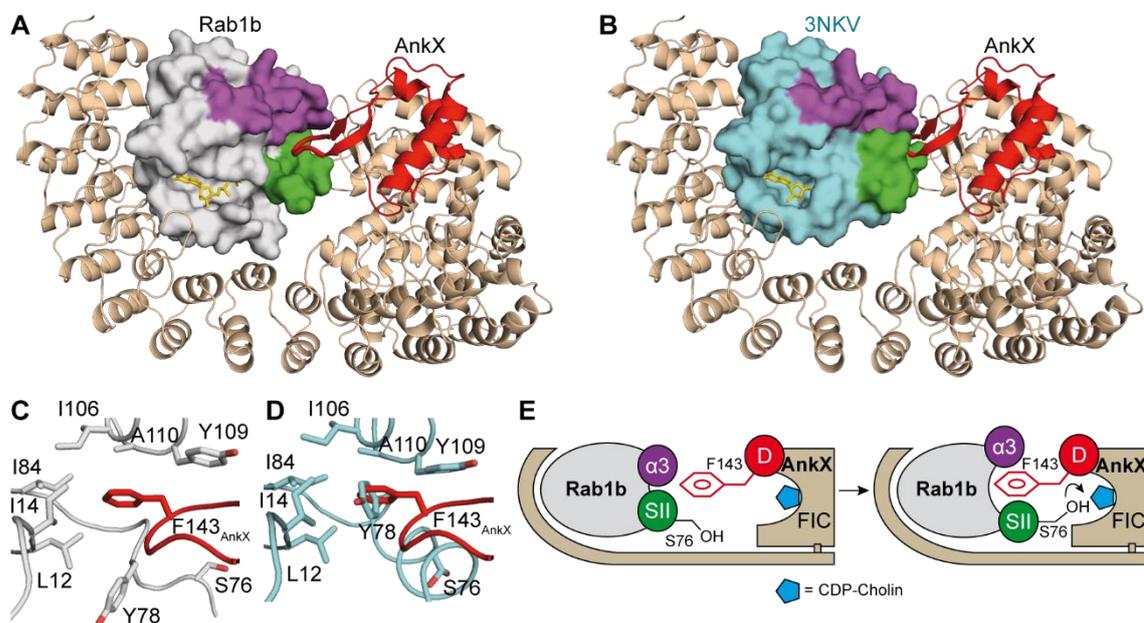


Abbildung 39 Der AnkX-Dorn bindet in eine konservierte hydrophobe Tasche von Rab1b. **(A)** Im AnkX_{G108C}:PC:Rab1b:GDP-Komplex bindet der AnkX-Dorn (AS 141-144) in den Bereich zwischen *Switch II* und $\alpha 3$ von Rab1b. AnkX (beige) ist als Bändermodell dargestellt: rot: Insertionsdomäne. Rab1b (grau) ist als Oberflächenmodell dargestellt: grün: *Switch II*-Region; violett: $\alpha 3$ von Rab1b, goldene Stäbe: GDP. **(B)** Bei Rab1b:GppNHp (PDB-Eintrag: 3NKV)²⁹ ist der Bereich zwischen *Switch II* und $\alpha 3$ von Rab1b zunächst nicht zugänglich für den AnkX-Dorn. Rab1b:GppNHp (türkis) ist als Oberflächenmodell dargestellt und wurde strukturell mit dem AnkX_{G108C}:PC:Rab1b:GDP-Komplex überlagert. Die Farbgebung ist dieselbe wie in Teilabbildung **(A)**. **(C)** Im AnkX_{G108C}:PC:Rab1b:GDP-Komplex bindet das an der Spitze des AnkX-Dorns positionierte F143_{AnkX} (rot) in eine hydrophobe Tasche von Rab1b (grau). Diese hydrophobe Tasche wird von Rab1b durch Residuen aus $\beta 1$ (L12_{Rab1b} und I14_{Rab1b}), $\beta 4$ (I84_{Rab1b}) und $\alpha 3$ (I106_{Rab1b}, Y109_{Rab1b} und A110_{Rab1b}) ausgebildet. Bei dem gezeigten Bildausschnitt handelt es sich um eine Nahaufnahme des Bereichs zwischen *Switch II* und $\alpha 3$ von Rab1b aus Teilabbildung **(A)**. **(D)** Bei Rab1b:GppNHp (PDB-Eintrag: 3NKV)²⁹ ist die Bindung von F143_{AnkX} (rot) in die hydrophobe Tasche von Rab1b (türkis) durch Y78_{Rab1b} blockiert. Bei dem gezeigten Bildausschnitt handelt es sich um eine Nahaufnahme des Bereichs zwischen *Switch II* und $\alpha 3$ von Rab1b aus Teilabbildung **(B)**. **(E)** Schema für die mögliche Rolle des AnkX-Dorns bei der AnkX-vermittelten Phosphocholinierung von Rab1b. Es wird angenommen, dass durch die Bindung des AnkX-Dorns (D) in den Bereich zwischen *Switch II* (S II) und $\alpha 3$ von Rab1b die strukturelle Beweglichkeit von S76_{Rab1b} so weit erhöht wird, dass dieses in das katalytische Zentrum von AnkX eindringen kann.

Die intrinsische strukturelle Flexibilität der *Switch II*-Region scheint nicht der ausschlaggebende Punkt für die Modifizierung von S76_{Rab1b} zu sein. Daher wurde die Hypothese aufgestellt, dass AnkX durch die Bindung von F143_{AnkX} in den Bereich zwischen *Switch II* und $\alpha 3$ von Rab1b den Bewegungsradius von S76_{Rab1b} zusätzlich erhöht, so dass S76_{Rab1b} anschließend in das katalytische Zentrum von AnkX eindringen kann (Abbildung 39e). Es wäre denkbar, dass AnkX die Region um S76_{Rab1b} herum zunächst lokal entfalten muss, damit S76_{Rab1b} ausreichend Spielraum besitzt, um in das enzymatische Zentrum vorzudringen. Diese lokale Entfaltung könnte mit der Verdrängung von Y78_{Rab1b} aus der hydrophoben Tasche von Rab1b zusammenhängen.

Tatsächlich zeigt die Überlagerung von Kristallstrukturen mehrerer Rab-Proteine im inaktiven GDP-gebundenen Zustand, dass die Orientierung und Positionierung von Y78 hoch konserviert ist (PDB-Einträge: 2AJ5 (Rab2b), 2O52 (Rab4b), 2OIL (Rab25), 1Z22 (Rab23), 3DZ8 (Rab3b)): Y78_{Rab1b} und homologe Aminosäuren in anderen Rab-Proteinen zeigen stets in die gleiche hydrophobe Tasche (Abbildung 40a). Aufgrund der konservierten Ausrichtung von Y78_{Rab1b} ist auch das räumlich benachbarte S76_{Rab1b} in seiner strukturellen Beweglichkeit eingeschränkt. Eine lokale Entfaltung dieses Bereichs der *Switch II*-Region durch die F143_{AnkX}-vermittelte Verdrängung von Y78_{Rab1b} aus der hydrophoben Tasche könnte S76_{Rab1b} ausreichend strukturelle Bewegungsfreiheit verschaffen, um in das katalytische Zentrum einzudringen.

Um diese Hypothese zu überprüfen, sollte zunächst die Bedeutung von F143_{AnkX} für die Phosphocholinierung von Rab1b untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde F143_{AnkX} durch unterschiedliche Aminosäuren substituiert. Der Effekt der Substitution auf die katalytische Aktivität des Enzyms wurde anschließend mit Hilfe eines Tryptophanfluoreszenz-basierten Ansatzes quantifiziert (Abbildung 40b).

Bei den durchgeführten Messungen sind lediglich F143_{AnkX}-Varianten mit hydrophoben Substitutionen (Tryptophan oder Alanin) in der Lage, Rab1b quantitativ zu phosphocholinieren. Die katalytische Effizienz dieser Mutanten ist jedoch auf 12 % (F143W_{AnkX}) bzw. 1 % (F143A_{AnkX}) der katalytischen Effizienz von AnkX_{WT} reduziert (Abbildung 40c). Die Mutation von F143_{AnkX} zu Glycin oder polaren Aminosäuren (Glutamat oder Arginin) sowie die Deletion des AnkX-Dorns (AS 141-144, bezeichnet als Δ F143_{AnkX}) führt zu einem derart starken Einbruch der enzymatischen Aktivität, dass die katalytischen Effizienz nicht mehr über den Tryptophanfluoreszenz-basierten Ansatz bestimmt werden kann. Massenspektrometrische Daten zeigen jedoch, dass die Mutanten F143G_{AnkX}, F143E_{AnkX} und F143R_{AnkX} nach 8 h in der Lage sind, Rab1b teilweise phosphocholinieren. Im Fall der Mutante Δ F143_{AnkX} kann im gleichen Zeitraum keine Modifizierung von Rab1b festgestellt werden. (Anhang Abbildung 48).

Diese Experimente deuten auf eine hohe Relevanz des AnkX-Dorns und insbesondere von F143_{AnkX} für die AnkX-vermittelte Phosphocholinierung von Rab1b hin. Die katalytische Effizienz des Enzyms ist bei der Substitution von F143_{AnkX} mit hydrophoben Aminosäuren deutlich reduziert und sinkt beim Austausch mit polaren Aminosäuren noch weiter ab. Diese Beobachtung kann durch den hydrophoben Charakter der Rab1b-Tasche erklärt werden, in die der AnkX-Dorn eindringt, um Y78_{Rab1b} zu verdrängen. Polaren Aminosäuren ist der Eintritt in die hydrophobe Tasche und damit die Verdrängung von Y78_{Rab1b} stark erschwert. Dies äußert sich in einer stark verminderten katalytischen Aktivität der entsprechenden F143_{AnkX}-Varianten. Bei vollständiger Entfernung des AnkX-Dorns scheint das Enzym keine nennenswerte Aktivität mehr aufzuweisen.

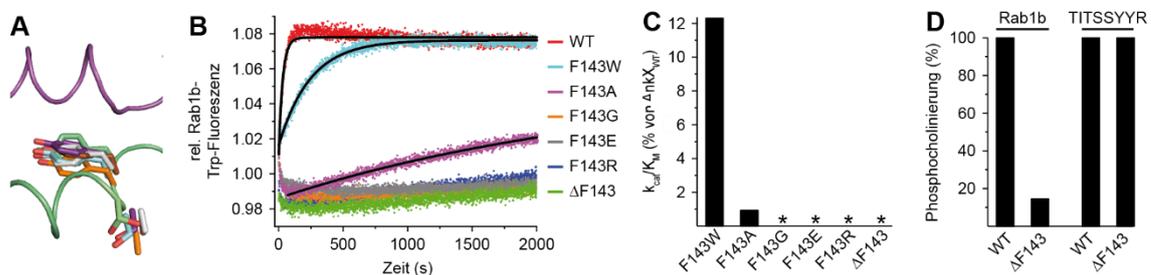


Abbildung 40 AnkX vermittelt die Phosphocholinierung von Rab1b durch eine lokale Entfaltung der *Switch II*-Region. **(A)** Strukturelle Überlagerung von Rab1b:GppNHP (PDB-Eintrag: 3NKV)²⁹ mit Rab-Proteinen im GDP-Zustand: Rab2b (PDB-Eintrag: 2A5J, magenta), Rab3b (PDB-Eintrag: 3DZ8, grau), Rab4b (PDB-Eintrag: 2O52, türkis), Rab23 (PDB-Eintrag: 1Z22, orange) und Rab25 (PDB-Eintrag: 2OIL, braun). Da die Positionierung von Y78_{Rab1b} und homologen Aminosäuren hoch konserviert ist, ist die strukturelle Beweglichkeit des räumlich benachbarten S76_{Rab1b} und homologer Aminosäuren stark eingeschränkt. Die *Switch II*-Region (grün) und α3 (magenta) von Rab1b sind als Bändermodell dargestellt. **(B)** Auswirkung unterschiedlicher F143_{AnkX}-Substitutionen auf die katalytische Aktivität von AnkX. Rab1b (5 μM) und CDP-Cholin (1 mM) wurden in einer Fluoreszenzküvette vorgelegt und der Anstieg der Rab1b-Tryptophan (Trp)-Fluoreszenz nach Zugabe von AnkX (250 nM) aufgenommen. Durch die exponentielle Anpassung der Fluoreszenzkurven (schwarze Linien) wurde die beobachtete Geschwindigkeitskonstante (k_{obs}) ermittelt. Die AnkX-Varianten F143_G_{AnkX}, F143_E_{AnkX}, F143_R_{AnkX} und ΔF143_{AnkX} sind derart stark in ihrer enzymatischen Aktivität eingeschränkt, dass unter den gegebenen Bedingungen eine Ermittlung von k_{obs} nicht möglich ist. **(C)** Die k_{cat}/K_M -Werte der F143_{AnkX}-Varianten wurden berechnet, indem k_{obs} aus Teilabbildung (B) durch die eingesetzte Enzymkonzentration (250 nM) geteilt wurde. Anschließend wurden die k_{cat}/K_M -Werte auf den k_{cat}/K_M -Wert von AnkX_{WT} normalisiert. Die mit einem Stern (*) markierten F143_{AnkX}-Varianten sind derart stark in ihrer katalytischen Aktivität eingeschränkt, dass k_{obs} nicht ermittelt werden kann und somit die Berechnung der k_{cat}/K_M -Werte nicht möglich ist. **(D)** Bedeutung des AnkX-Dorns für die lokale Entfaltung von Rab1b bei der AnkX-vermittelten Phosphocholinierung. Gefaltetes Rab1b-Protein (50 μM) oder ungefaltetes Octapeptid (50 μM) wurden mit CDP-Cholin (5 mM) und AnkX_{WT} (5 μM) oder ΔF143_{AnkX} (5 μM) für 4 Tage bei 25 °C inkubiert. Anschließend wurde das Ausmaß der Phosphocholinierung über Massenspektrometrie bestimmt. Während das ungefaltete Peptid durch die ΔF143_{AnkX}-Mutante quantitativ phosphocholinieren wird, ist das gefaltete Rab1b-Protein zu weniger als 15 % modifiziert.

Um zu testen, ob die Funktion des AnkX-Dorns tatsächlich in der lokalen Entfaltung der *Switch II*-Region um S76_{Rab1b} herum besteht, wurde die Aktivität der Δ F143_{AnkX}-Mutante gegenüber dem gefalteten Rab1b-Protein und dem ungefalteten Octapeptid TITSSYYR aus der *Switch II*-Region von Rab1b getestet. Dazu wurden Rab1b (50 μ M) oder das Octapeptid (50 μ M) mit CDP-Cholin (5 mM) und der Δ F143_{AnkX}-Variante (5 μ M) für 4 Tage inkubiert. Anschließend wurde der Grad der Phosphocholinierung über Massenspektrometrie bestimmt (Abbildung 40d). Während im beobachteten Zeitraum von 4 Tagen das ungefaltete Peptid quantitativ phosphocholinert wird, liegt das gefaltete Rab1b-Protein zu weniger als 15 % modifiziert vor.

Diese Beobachtung belegt, dass F143_{AnkX} nicht direkt an der Katalyse der Phosphocholinierung beteiligt ist. Stattdessen leitet F143_{AnkX} die Phosphocholinierung von Rab1b durch die lokale Entfaltung der kleinen GTPase ein. Dabei wird der *Switch II*-Bereich um S76_{Rab1b} herum entfaltet, indem F143_{AnkX} das strukturell hoch konservierte Y78_{Rab1b} aus einer hydrophoben Tasche zwischen *Switch II* und α 3 von Rab1b verdrängt. Durch diese lokale Entfaltung erhält S76_{Rab1b} ausreichend Bewegungsfreiheit, um in das katalytische Zentrum von AnkX vorzudringen, so dass dort die enzymatische Reaktion der Phosphocholinierung ablaufen kann.

4. Diskussion

4.1 Die Interaktion zwischen den AnkX-Ankyrin-Repeats und Rab1b

Mit Hilfe thiolreaktiver CDP-Cholin-Derivate ist es gelungen, den schwach affinen Komplex zwischen der Phosphocholintransferase AnkX und seinem Substratprotein Rab1b kovalent zu stabilisieren. Der kovalente AnkX_{G108C}:PC:Rab1b:GDP-Komplex konnte in präparativem Maßstab hergestellt und die Struktur des Komplexes mittels Röntgenkristallographie bestimmt werden. Die Komplexstruktur offenbarte, dass die FIC-Domäne und die Ankyrin-*Repeats* von AnkX eine sichelförmige Struktur ausbilden, in deren Mitte Rab1b eingeschlossen wird. Während die AR 1-4 wie bereits bekannt die katalytische FIC-Domäne stabilisieren,³⁸ bilden die C-terminalen Ankyrin-*Repeats* zahlreiche Interaktionen zu Rab1b aus. Die AR 8-9 wechselwirken mit den ersten drei Aminosäuren der *Switch I*-Region. Interessanterweise interagieren die AR 10-13 mit Aminosäuren in $\alpha 4$ und $\alpha 5$ von Rab1b, welche sich im C-terminalen Bereich der G-Domäne befinden.

Der C-terminale Bereich der G-Domäne ist bisher für keine andere GTPase als Interaktionsplattform beschrieben. Dies deutet auf einen einzigartigen Bindemodus von Rab1b während der AnkX-vermittelten Phosphocholinierung hin. Es ist denkbar, dass die Bindung und Phosphocholinierung von Rab1b in einem zweistufigen Prozess abläuft: Zunächst erkennt AnkX mit Hilfe der C-terminalen Ankyrin-*Repeats* die kleine GTPase und richtet sie durch die Bindung von *Switch I* und der C-terminalen Region der G-Domäne in einer bestimmten Orientierung aus. In dieser Vororientierung kann anschließend die Phosphocholinierung von S76_{Rab1b} durch das katalytische Zentrum von AnkX erfolgen. Die Annahme dieses zweistufigen Ablaufs aus initialer Erkennung und anschließender Phosphocholinierung bildet die Grundlage für die folgenden Überlegungen und wird in diesem und im nächsten Kapitel mehrmals aufgegriffen.

Typischerweise interagieren Effektoren mit GTPasen über eine Interaktionsfläche zwischen *Switch I*, *Interswitch* und *Switch II*, welche in Abhängigkeit des Nukleotidzustands ausgeprägte strukturelle Änderungen erfahren kann.²² Die unterschiedliche Konformation dieser Bindefläche in Abhängigkeit des gebundenen Nukleotids bildet die Grundlage dafür, dass Effektoren im Regelfall einen der beiden Beladungszustände einer GTPase hoch spezifisch erkennen. Der von AnkX kontaktierte C-terminale Bereich der G-Domäne liegt hingegen auf der gegenüberliegenden Seite dieser üblichen Interaktionsfläche und erfährt im Gegensatz zu dieser keine strukturellen Änderungen, wenn das Nukleotid der kleinen GTPase ausgetauscht wird. Ebenso wie der C-terminale Bereich der G-Domäne erfahren auch die ersten drei Aminosäuren aus der *Switch I*-Region, die von AnkX kontaktiert werden, keine nennenswerten strukturellen Änderungen in Abhängigkeit des Nukleotidzustands. Somit besitzt der gesamte Bereich, über den die initiale Erkennung von Rab1b stattfindet, sowohl im GDP- als auch im GTP-gebundenen Zustand eine ähnliche Konformation. AnkX sollte demnach beide

Nukleotidzustände von Rab1b ähnlich gut erkennen. Tatsächlich besitzt AnkX bei der Phosphocholinierung von Rab1b keine ausgeprägte Präferenz für einen der beiden Nukleotidzustände.³¹

Neben der Interaktion von Rab1b mit dem bakteriellen Effektor AnkX sind auch Beispiele von Rab-Proteinen bekannt, die mit Ankyrin-*Repeats* zellulärer Effektoren interagieren. So binden Rab32 und Rab38 auf Transportvesikeln, welche Enzyme für die Melaninsynthese enthalten, an die Ankyrin-*Repeats* von Varp (*VPS9-ankyrin-repeat protein*).^{211,212} Auf späten Endosomen und Lysosomen interagiert Rab7 mit den Ankyrin-*Repeats* von ORP1L, einem Mitglied der Familie Oxysterol-bindender Proteine.²¹³ Rab35, ebenfalls Mitglied der Rab1-Familie, bindet während des Auswuchses von Neuriten in neuronalen Zellen an die Ankyrin-*Repeats* von Centaurin- β 2.²¹⁴ Für diese Rab-Effektor-Interaktionen existieren bislang jedoch keine strukturellen Daten. Durch Mutations-Funktions-Analysen konnte gezeigt werden, dass die Ankyrin-*Repeats* von Varp und Centaurin- β 2 die kleinen GTPasen Rab32, Rab35 und Rab38 über die typische Interaktionsfläche des *Switch II*-Bereichs kontaktieren.^{215,216} Diese Beobachtungen unterstreichen die einzigartige Interaktion zwischen den Ankyrin-*Repeats* von AnkX und der C-terminalen Region der G-Domäne von Rab1b.

Es kann lediglich spekuliert werden, weshalb AnkX diesen einzigartigen Bindemodus entwickelt hat. Itzen et al. konnten zeigen, dass AnkX selbst dann in der Lage ist, Rab1b zu phosphocholinieren, wenn dieses an GDI gebunden vorliegt.²¹⁷ Diese Beobachtung ist überraschend, da sich das zu modifizierende S76_{Rab1b} in der Interaktionsfläche zwischen Rab1b und GDI befindet und somit zunächst für die Interaktion mit AnkX nicht zur Verfügung steht.²¹⁸ Der C-terminale Bereich der G-Domäne von Rab1b wird von GDI jedoch nicht kontaktiert. Daher könnte AnkX über diesen Bereich eine initiale Bindung zu Rab1b aufbauen, während die kleine GTPase weiterhin an GDI gebunden ist. Bei der spontanen Dissoziation von Rab1b und GDI wäre AnkX somit bereits vor Ort, um die kleine GTPase zu phosphocholinieren. Die eingeführte Phosphocholinierung in Rab1b verhindert in der Folge, dass GDI erneut an Rab1b binden kann.³¹

Allgood et al. konnten zeigen, dass die AS-Region 491-949 von AnkX die Fähigkeit besitzt, an die Plasmamembran zu binden, wo AnkX mit den Lipiden Phosphatidylinositol-3-phosphat (PI(3)P) und Phosphatidylinositol-4-phosphat (PI(4)P) interagieren kann.³⁵ Durch den in der vorliegenden Arbeit untersuchten AnkX_{G108C}:PC:Rab1b:GDP-Komplex lässt sich die Lokalisation der Lipidbindedomäne von AnkX weiter eingrenzen: Da der AS-Bereich 491-800 von AnkX mit Rab1b interagiert, ist es wahrscheinlich, dass die Bindung der Lipide PI(3)P und PI(4)P im AS-Bereich 801-949 von AnkX stattfindet. Allgood et al. konnten ebenfalls zeigen, dass die AS-Region 688-949 von AnkX, welche die postulierte Lipidbindedomäne enthält, nicht in der Lage ist, an die Plasmamembran zu binden.³⁵ Dies deutet darauf hin, dass die Lipidbindung von AnkX alleine nicht ausreicht, um das Enzym stabil in der Plasmamembran

zu verankern. Es ist daher denkbar, dass für die Membranbindung von AnkX neben der Bindung von PI(3)P oder PI(4)P auch die Assoziation mit membrangebundenem Rab1b notwendig ist.

4.2 Die Interaktion zwischen der AnkX-FIC-Domäne und Rab1b

Die Struktur des untersuchten AnkX_{G108C}:PC:Rab1b:GDP-Komplexes konnte zeigen, dass der AnkX-Dorn, der auf der Oberfläche der FIC-Domäne aus dem Enzym herausragt, ein essenzielles Element der AnkX-vermittelten Phosphocholinierung ist. Da das konservierte β -Faltblatt der FIC-Domäne, welches in anderen FIC-Proteinen an der Substratproteinbindung beteiligt ist, vom AnkX-Dorn verdeckt wird, war bisher fraglich, auf welche Weise AnkX seine Substratproteine bindet.⁴⁰ Aus der Komplexstruktur geht hervor, dass sich der AnkX-Dorn in eine hydrophobe Tasche zwischen dem *Switch II* und $\alpha 3$ von Rab1b schiebt und dadurch der *Switch II* in die Nähe des konservierten β -Faltblatts gelangt. Erst durch diese strukturelle Umordnung wird eine Interaktion zwischen dem *Switch II* und dem konservierten β -Faltblatt möglich, so dass S76_{Rab1b} in das aktive Zentrum von AnkX eintreten und dort phosphocholiniert werden kann.

Typischerweise haben Interaktionspartner von Rab1b eine deutliche Präferenz für einen der beiden Nukleotidzustände. So bevorzugt zum Beispiel die AMPylierungsdomäne von DrrA den aktiven GTP-gebundenen Zustand um den Faktor 300, während GDI den inaktiven GDP-gebundenen Zustand um den Faktor 100-1000 bevorzugt.^{29,219} AnkX hingegen besitzt keine ausgeprägte Präferenz für einen der beiden Nukleotidzustände und bevorzugt mit einem Faktor von 2 lediglich leicht den GDP-gebundenen Zustand der kleinen GTPase.³¹ Bedenkt man die strukturelle Umordnung, die nötig ist, um den Kontakt zwischen dem *Switch II* von Rab1b und dem konservierten β -Faltblatt der FIC-Domäne herzustellen, wäre zu erwarten gewesen, dass der GDP-gebundene Zustand aufgrund seiner intrinsisch höheren strukturellen Flexibilität deutlich stärker bevorzugt wird.

Die strukturelle Überlagerung mehrerer Kristallstrukturen von Rab-Proteinen im GDP-gebundenen Zustand konnte zeigen, dass die Ausrichtung von Y78_{Rab1b} und dem räumlich benachbarten S76_{Rab1b} hoch konserviert und sehr ähnlich zur Positionierung im GTP-gebundenen Zustand ist. Folglich ist dieser Bereich des *Switch II* im GDP-gebundenen Zustand ähnlich wenig flexibel wie im GTP-gebundenen Zustand. Daher muss diese Region in beiden Nukleotidzuständen lokal entfaltet werden, um das Eindringen von S76_{Rab1b} in das katalytische Zentrum von AnkX zu ermöglichen. Mit Hilfe der strukturellen und biochemischen Daten der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass das an der Spitze des AnkX-Dorns lokalisierte F143_{AnkX} maßgeblich an diesem Vorgang beteiligt ist. Bei der Bindung des AnkX-Dorns in die hydrophobe Tasche zwischen $\alpha 3$ und *Switch II* von Rab1b verdrängt F143_{AnkX} das

hoch konservierte Y78_{Rab1b} aus seiner Position. Durch diese lokale Proteinfaltung wird auch das benachbarte S76_{Rab1b} aus seiner ursprünglich fixierten Position gelöst und somit verfügbar für die AnkX-vermittelte Phosphocholinierung.

Der Mechanismus der lokalen Proteinfaltung kleiner GTPasen konnte ebenfalls für die Interaktion zwischen dem Transportprotein Rab8 und dem zellulären GEF MSS4 beobachtet werden.²²⁰ MSS4 bildet über einen rigiden β -Strang eine Vielzahl an Wechselwirkungen zu der *Switch I*- und *Interswitch*-Region von Rab8 aus. Als Folge der von MSS4 ausgebildeten Interaktionen wird die konservierte Nukleotidbindetasche von Rab8 lokal entfaltet. Bei dieser lokalen Entfaltung werden AS-Reste von Rab8, die an der Nukleotidbindung beteiligt sind, so aus ihrer konservierten Position verdrängt, so dass das Nukleotid nicht mehr gebunden werden kann. Auf diese Weise bewirkt MSS4 die Freisetzung von GDP und leitet damit den Nukleotidaustausch zu GTP ein. Andere GEFs ordnen die Nukleotidbindetasche ihrer Substratproteine zwar ebenfalls um, jedoch werden die Nukleotidbindemotive dabei nicht entfaltet, sondern lediglich in eine Konformation gedrängt die der GTP-gebundenen Form der kleinen GTPase ähnelt. Der Mechanismus von MSS4 stellt somit einen Sonderfall unter den GEFs dar. Dieses Beispiel zeigt, dass die lokale Proteinfaltung ein Prozess ist, der bei der Interaktion zwischen kleinen GTPasen und ihren Bindepartnern Anwendung findet: Während der GEF MSS4 die Nukleotidbindetasche von Rab8 lokal entfaltet, um das gebundene GDP freizusetzen, nutzt der Effektor AnkX den Mechanismus der lokalen Proteinfaltung, um die Phosphocholinierung des *Switch II*-Bereichs von Rab1b einzuleiten.

Der vorliegende AnkX_{G108C}:PC:Rab1b:GDP-Komplex liefert somit wichtige Einblicke in die initiale Erkennung von Rab1b und die Einleitung der Phosphocholinierung durch den AnkX-Dorn. Da in der Kristallstruktur des AnkX_{G108C}:PC:Rab1b:GDP-Komplexes der *Switch II* von Rab1b jedoch nicht vollständig in das aktive Zentrum eindringt, lässt sich die Interaktion zwischen dem *Switch II* von Rab1b und dem katalytischen Zentrum von AnkX während der enzymatischen Reaktion der Phosphocholinierung nicht beobachten. Der katalytische Mechanismus der AnkX-vermittelten Phosphocholinierung kann somit nicht geklärt werden. Durch Mutations-Funktions-Analysen konnte jedoch gezeigt werden, dass insbesondere T74_{Rab1b} und Y77_{Rab1b} eine bedeutende Rolle während der Katalyse der Phosphocholinierung spielen könnten, da die Alaninsubstitution dieser Reste die Geschwindigkeit der enzymatischen Reaktion erheblich herabsetzt.

Da sich die *Switch II*-Region von Rab1b nicht im katalytischen Zentrum von AnkX befindet, scheint der vorliegende AnkX_{G108C}:PC:Rab1b:GDP-Komplex post-katalytischer Natur zu sein. Es muss bedacht werden, dass der vorliegende Komplex durch die Strategie des indirekten Ansatzes gebildet wurde. Dies bedeutet, dass präparativ hergestelltes Rab1b-PC-Konjugat mit der G108C_{AnkX}-Variante kovalent verknüpft wurde. Da die katalytische Phosphocholinierung somit zu Beginn der Komplexbildung bereits abgeschlossen war, wäre es möglich, dass der

phosphocholinierte *Switch II* während der Komplexbildung nicht in die katalytische Tasche von AnkX eindringt. Eine Auflösung der Interaktion zwischen dem *Switch II* von Rab1b und der katalytischen Tasche von AnkX wäre somit durch die Strategie des indirekten Ansatzes nicht möglich.

In der vorliegenden Arbeit wurde daher zusätzlich der AnkX_{F107C}:PC:Rab1b:GDP-Komplex im direkten Ansatz gebildet, indem das binäre Addukt der F107C_{AnkX}-Variante und dem C3-Cl-Derivat zur Phosphocholinierung von Rab1b genutzt wurde. Da bei dieser Strategie Rab1b während der Komplexbildung von AnkX phosphocholiniert wird, bestand die Hoffnung, dass die Interaktion zwischen dem *Switch II* von Rab1b und der katalytischen Tasche von AnkX auf diese Weise aufgelöst werden kann. Da die Kristalle des AnkX_{F107C}:PC:Rab1b:GDP-Komplexes jedoch nur mit einer Auflösung von knapp 4 Å beugten, wurde der Kristalldatensatz nicht vollständig ausgewertet und die entsprechende Kristallstruktur nicht in die vorliegende Arbeit aufgenommen. Der molekulare Ersatz mit dem Suchmodell von Rab1b:GppNHp (PDB-Eintrag: 3NKV)²⁹ zeigte jedoch, dass Rab1b in diesem Komplex nahezu identisch an AnkX gebunden vorliegt, wie im AnkX_{G108C}:PC:Rab1b:GDP-Komplex des indirekten Ansatzes: Die *Switch II*-Region von Rab1b ist im AnkX_{F107C}:PC:Rab1b:GDP-Komplex ebenfalls außerhalb des katalytischen Zentrums von AnkX lokalisiert.

Die Interaktion zwischen dem *Switch II* von Rab1b und dem katalytischen Zentrum von AnkX lässt sich daher auch nicht auflösen, wenn der Komplex über die Strategie des direkten Ansatzes gebildet wird. Dies lässt vermuten, dass der *Switch II* die katalytische Tasche unmittelbar nach der Phosphocholinierung von S76_{Rab1b} wieder verlässt. Eine Momentaufnahme der Interaktion zwischen *Switch II* und dem katalytischen Zentrum kann nur erstellt werden, wenn der *Switch II* möglichst lange im aktiven Zentrum von AnkX zurückgehalten wird. Dies könnte durch den Einsatz der katalytisch inaktiven H229A_{AnkX}-Variante bewerkstelligt werden. Wird die inaktive H229A_{AnkX}-Mutante verwendet, wäre denkbar, dass der *Switch II* von Rab1b dauerhaft in der katalytischen Tasche von AnkX verweilt, da die mit der Phosphocholinierung von S76_{Rab1b} verbundene Freisetzung aus dem aktiven Zentrum ausbleibt. Die Verwendung der inaktiven H229A_{AnkX}-Variante ist mit der Strategie des direkten Ansatzes jedoch nicht kompatibel, da ein aktives Enzym zur Bildung der kovalenten Verknüpfung benötigt wird.

Eine Möglichkeit, wie der Komplex zwischen der inaktiven H229A_{AnkX}-Variante und Rab1b kovalent stabilisiert werden könnte, besteht in der ortsspezifischen Verknüpfung mit Hilfe unnatürlicher thiolreaktiver Aminosäuren.²²¹ Bei dieser Strategie wird einer der beiden Interaktionspartner durch die Erweiterung des genetischen Codes mit einer unnatürlichen thiolreaktiven Aminosäure ausgestattet, während in den anderen Partner eine strategisch platzierte Cysteinmutation eingeführt wird. Falls sich die thiolreaktive Aminosäure und das eingeführte Cystein bei der Interaktion der beiden Proteine nahe genug kommen, werden die

Interaktionspartner ortsspezifisch miteinander verknüpft. Auf diese Weise konnte bereits der schwach affine Komplex zwischen der GEF-Domäne von DrrA und der GDP-gebundenen Form von Rab1b kovalent stabilisiert werden.²²² Diese Strategie der kovalenten Verknüpfung läuft besonders effizient ab, wenn für den Einbau der unnatürlichen Aminosäure und für die rekombinante Einführung des Cysteins AS-Positionen gewählt werden, die zueinander Salzbrücken ausbilden.

Aufgrund der strukturellen und biochemischen Daten der vorliegenden Arbeit sind die Aminosäuren, die auf der Seite von Rab1b mit AnkX interagieren bekannt. An deren Position könnte eine unnatürliche thiolreaktive Aminosäure eingebracht werden, um den Enzym-Protein-Komplex zu stabilisieren. Dazu würden sich besonders die negativ geladenen Aminosäuren D30_{Rab1b} und D31_{Rab1b} anbieten, da diese Salzbrücken zu den AR 8-9 von AnkX ausbilden. Ferner befinden sich die Aminosäuren D30_{Rab1b} und D31_{Rab1b} in der *Switch I-Region* der kleinen GTPase und besitzen somit eine gewisse strukturelle Flexibilität für die kovalente Verknüpfung mit einer entsprechenden AnkX_{Cys}-Variante. Da auf der Seite von AnkX die Aminosäuren, die mit D30_{Rab1b} und D31_{Rab1b} interagieren, nicht bekannt sind, müssten in den AR 8-9 verschiedene Aminosäuren zu Cystein mutiert werden. Anschließend müsste getestet werden, ob die erzeugten AnkX_{Cys}-Varianten in der Lage sind, mit der in Rab1b eingeführten unnatürlichen Aminosäure eine kovalente Verknüpfung einzugehen.

Diese Strategie der kovalenten Verknüpfung ist unabhängig vom Aktivitätszustand des Enzyms und könnte somit auch mit der inaktiven H229A_{AnkX}-Variante durchgeführt werden. Durch dieses Vorgehen könnte es möglich sein, einen stabilen Komplex zu bilden, der die Interaktion zwischen dem *Switch II* von Rab1b und dem katalytischen Zentrum von AnkX auflösen kann.

4.3 CDP-Cholin-Derivate für die AnkX-vermittelte Proteinmarkierung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden diverse CDP-Cholin-Derivate synthetisiert und auf ihre Eignung als Cosubstrate für die AnkX-vermittelte Proteinmarkierung getestet. Während bei Derivaten für die Ein-Schritt-Markierung die Sonde über einen PEG₄-Linker an die Cholin Kopfgruppe von CDP-Cholin angebracht wurde, wurden bioorthogonale Analoga für die modulare Zwei-Schritt-Markierung sowohl mit einem PEG₄-Linker als auch mit einem kurzen C1-/C3-Linker synthetisiert. Alle hergestellten CDP-Cholin-Derivate eignen sich als Cosubstrate für die AnkX-katalysierte Phosphocholinierung, so dass ein breites Spektrum an Sonden (TAMRA, Cumarin, NBD, Fluorescein, Sulfo-Cy5 und Biotin) und bioorthogonalen Gruppen (Alkin, Azid, DBCO, TCO und Tetrazin) für die AnkX-vermittelte Proteinmarkierung zur Verfügung gestellt werden konnte. Die eingeführten Modifikationen können zudem alle von Lem3 entfernt werden und sind somit spurlos reversibel.

Bei der Ermittlung der katalytischen Effizienz für die AnkX-katalysierte Übertragung der PC-Konjugate auf Rab1b konnte festgestellt werden, dass alle CDP-Cholin-Derivate mit PEG₄-Linker die gleiche katalytische Effizienz aufweisen. Diese liegt bei ca. 1 % der katalytischen Effizienz von CDP-Cholin. Nimmt man diese Einbuße in Kauf, so scheint es durch den Einsatz von CDP-Cholin-Analoga mit PEG₄-Linker möglich zu sein, jede beliebige Sonde auf Zielproteine zu übertragen. Da der PEG₄-Linker relativ lang ist, stellt die Übertragung von PC-PEG₄-Konjugaten jedoch einen relativ starken Eingriff in das Zielprotein dar. Bei CDP-Cholin-Derivaten mit kurzem C1-/C3-Linker ist die Übertragungsgeschwindigkeit abhängig von der zu übertragenden Gruppe. Während das C3-TCO- und das C3-Tetrazin-Derivat eine ähnliche katalytische Effizienz besitzen wie die entsprechenden Analoga mit PEG₄-Linker, liegen die katalytischen Effizienzen des C1-Alkin-, C3-Azid- und C3-DBCO-Derivats bei 14 %, 9 % und 6 % der katalytischen Effizienz von CDP-Cholin. Somit konnten für die AnkX-basierte Proteinmarkierung drei bioorthogonale CDP-Cholin-Derivate zur Verfügung gestellt werden, deren Übertragung lediglich eine Größenordnung langsamer abläuft als die natürliche Phosphocholinierung.

Der Transfer des PC-C1-Alkin-Konjugats läuft dabei am schnellsten ab. Allerdings kann das eingeführte terminale Alkin ausschließlich durch CuAAC adressiert werden und ist daher nicht für *in vivo* Anwendungen geeignet. Die Übertragung des PC-C3-Azid-Konjugats läuft zwar geringfügig langsamer ab, jedoch kann das eingeführte Azid anschließend sowohl durch CuAAC als auch durch SPAAC adressiert werden. Für Anwendungen *in vivo* ist daher das C3-Azid-Derivat am besten geeignet. Da drei CDP-Cholin-Analoga zur Verfügung gestellt werden konnten, die die schnelle Übertragung bioorthogonaler Gruppen für die modulare Zwei-Schritt-Markierung von Zielproteinen erlauben, besteht für die Cosubstrate der AnkX-vermittelten Markierungsstrategie kein weiterer Optimierungsbedarf.

Im Rahmen der *in vivo* Experimente wurde überraschenderweise festgestellt, dass Cos-7-Zellen sowohl das PEG₄-TAMRA-Derivat (Daten in dieser Arbeit nicht gezeigt) als auch das PEG₄-Sulfo-Cy5-Derivat ins Zellinnere aufnehmen können. Aufgrund der negativen Ladung der CDP-Cholin-Derivate wurde ursprünglich angenommen, dass diese die Zellmembran nicht überqueren können. Da dies entgegen den Erwartungen jedoch möglich ist, ist es für die Proteinmarkierung im Inneren von Zellen nicht nötig, spezielle CDP-Cholin-Derivate herzustellen, bei denen die negativen Ladungen maskiert sind. Stattdessen kann auf die bereits zur Verfügung stehenden CDP-Cholin-Derivate zurückgegriffen werden.

4.4 Anwendung der AnkX-vermittelten Proteinmarkierung

Durch den Einsatz des Löslichkeitsfaktors GFP ist es gelungen, die Ausbeute der Proteinreinigung von AnkX um mehr als das 6fache zu steigern. Die katalytische Effizienz des

Enzyms konnte im Vergleich zur Expression ohne Löslichkeitsfaktor ebenfalls gesteigert werden (Faktor 1,3). Mit dem Löslichkeitsfaktor GFP exprimiertes AnkX ist nach der Reinigung ebenfalls sehr stabil, so dass im Rahmen der kovalenten Komplexbildung mit Rab1b mehrtägige Inkubationszeiten bei Temperaturen bis zu 30 °C möglich sind, ohne dass das Enzym präzipitiert. Durch die Optimierung der Expression und Aufreinigung von AnkX konnte somit ein stabiles und hoch aktives Enzym erzeugt werden, welches sich in großen Mengen herstellen lässt.

Der k_{cat}/K_M -Wert für die AnkX-vermittelte Hydrolyse von CDP-Cholin konnte mit $1,3 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ bestimmt werden und ist damit lediglich um einen Faktor von 100 langsamer als der PC-Transfer auf Rab1b. Bei der Phosphocholinierung von Modellproteinen, die deutlich langsamer abläuft als die Phosphocholinierung des natürlichen Substratproteins Rab1b, muss somit darauf geachtet werden, dass der Reaktion ausreichend Cosubstrat zur Verfügung gestellt wird.

Zu Beginn der Arbeit war bereits bekannt, dass Zielproteine durch rekombinante Ausstattung mit der AnkX-Erkennungssequenz TITSSYYR (S-Sequenz) in Substratproteine für die AnkX-katalysierte Phosphocholinierung umgewandelt werden können.⁴¹ In der vorliegenden Arbeit konnte zusätzlich gezeigt werden, dass Zielproteine, die mit der leicht abgewandelten Sequenz TITSSIYR (T-Sequenz) ausgestattet sind, ebenfalls durch AnkX modifiziert werden können. Im Gegensatz zur S-Sequenz ist bei der T-Sequenz die anschließende Demodifizierung durch Lem3 jedoch nicht möglich. Ein MBP-Rab1b-Fusionskonstrukt, das mit beiden Sequenzen ausgestattet war, konnte durch den abwechselnden Einsatz von AnkX und Lem3 in Kombination mit zwei unterschiedlichen CDP-Cholin-Derivaten ortsspezifisch mit zwei unterschiedlichen Sonden ausgestattet werden. In Kombination mit Lem3 bietet die AnkX-vermittelte Phosphocholinierung demnach die Möglichkeit zur ortsspezifischen Zweifach-Markierung von Zielproteinen. Es muss jedoch erwähnt werden, dass lediglich die S-Sequenz (der *Switch II* von Rab1b in seiner natürlichen Proteinumgebung) quantitativ markiert werden konnte. Die T-Sequenz, die rekombinant am N-Terminus von MBP platziert war, konnte hingegen nicht quantitativ markiert werden. Diese unvollständige Markierung verdeutlicht, dass Modellproteine wesentlich langsamer von AnkX modifiziert werden als das natürliche Substratprotein Rab1b.

In vivo war es nicht möglich, das Rezeptorkonstrukt HA-TITSSYR-hY2R-eYFP auf der Oberfläche von Cos-7-Zellen AnkX-vermittelt mit einer Cy5-Sonde zu markieren. Die natürliche Phosphocholinierung des Rezeptors konnte ebenfalls nicht nachgewiesen werden, obwohl durch Immunfluoreszenz mit einem HA-Antikörper gezeigt werden konnte, dass das HA-Epitop des membranständigen Rezeptors extrazellulär zugänglich war. Die Detektion spezifischer Phosphocholinierung des Rezeptors wurde dabei durch die Anlagerung von autophosphocholinierem AnkX₁₋₈₀₀ an die Zellmembran erschwert. Durch den Einsatz des

verkürzten AnkX₁₋₄₈₄, welches die Fähigkeit zur Automodifikation nicht mehr besitzt, konnten die Störsignale der Autophosphocholinierung unterbunden werden. Jedoch konnte in den Experimenten mit AnkX₁₋₄₈₄ weder nach 3 h noch nach Inkubation über Nacht die Phosphocholinierung des Rezeptors nachgewiesen werden. Kontrollexperimente ergaben, dass AnkX₁₋₄₈₄ nach 3 h in der Lage ist, Rab1b sowohl in Zellkulturmedium als auch in Zellkulturüberstand zu modifizieren. Die AnkX-vermittelte Phosphocholinierung ist daher unter Zellkulturbedingungen generell möglich. Somit stellt sich die Frage, weshalb die Phosphocholinierung des Rezeptors *in vivo* bisher nicht nachgewiesen werden konnte. Eine mögliche Erklärung wäre, dass der Rezeptor stets so in die Zellmembran eingebaut wurde, dass am N-Terminus zwar das HA-Epitop extrazellulär zugänglich war, die AnkX-Erkennungssequenz jedoch nicht exponiert genug war, um von AnkX erkannt und modifiziert zu werden. Eventuell könnte ein zusätzlicher Linker zwischen der AnkX-Erkennungssequenz und dem N-terminalen Ende des Rezeptors die Erkennungssequenz ausreichend exponieren, um die Phosphocholinierung durch AnkX zu ermöglichen.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass Modellproteine aktuell deutlich langsamer phosphocholinieren werden, als das natürliche Substratprotein Rab1b. Die Struktur des AnkX_{G108C}:PC:Rab1b:GDP-Komplexes liefert hierfür eine Erklärung: AnkX erkennt Rab1b zu Beginn der Phosphocholinierung spezifisch mit Hilfe der C-terminalen Ankyrin-*Repeats*. Experimente mit C-terminalen AnkX-Verkürzungsvarianten konnten zeigen, dass die Enzymaktivität gegenüber Rab1b stark vermindert ist, wenn diese spezifischen Interaktionen nicht mehr stattfinden können. Bei der Phosphocholinierung von Modellproteinen ergibt sich eine ähnliche Situation: Die AnkX-Variante AnkX₁₋₈₀₀, die für den Großteil der Markierungsexperimente eingesetzt wurde, besitzt alle Ankyrin-*Repeats* und damit maximale Aktivität gegenüber Rab1b. Da AnkX₁₋₈₀₀ die Rab1b-spezifischen Interaktionen zu Modellproteinen jedoch nicht aufbauen kann, ist die Phosphocholinierung von Modellproteinen durch AnkX₁₋₈₀₀ in ähnlichem Umfang reduziert wie die Phosphocholinierung von Rab1b durch C-terminale AnkX-Verkürzungskonstrukte.

Da die Ankyrin-*Repeats* von AnkX keine spezifischen Interaktionen zu Modellproteinen aufbauen können, werden Modellproteine sowohl durch AnkX₁₋₈₀₀ als auch durch das verkürzte AnkX₁₋₄₈₄ mit ähnlicher Geschwindigkeit modifiziert. Aufgrund der ähnlichen Effizienz gegenüber Modellproteinen scheint der Einsatz des verkürzten AnkX₁₋₄₈₄ für die Markierung von Modellproteinen sinnvoller: Zum einen kann durch den Einsatz des verkürzten AnkX₁₋₄₈₄ die Autophosphocholinierung des Enzyms, welche vor allem bei der fluoreszenzmikroskopischen Analyse Störsignale auslöst, unterbunden werden. Zum anderen ist es denkbar, dass die sichelförmig ausgebildeten Ankyrin-*Repeats* die Bindung und Phosphocholinierung großer Modellproteine sogar negativ beeinflussen könnten.

4.5 Vergleich der AnkX-vermittelten Proteinmarkierung mit anderen enzymatischen Markierungsmethoden

Abschließend sollen die Chancen und Grenzen der AnkX-vermittelten Proteinmarkierung im Vergleich zu anderen enzymatischen Markierungsmethoden eingeordnet werden. Aktuell ist eine Vielzahl an Enzymen und damit verbundenen Methoden für die enzymatische Markierung von Proteinen beschrieben. Die AnkX-vermittelte Proteinmarkierung wird nachfolgend hauptsächlich mit Methoden verglichen, die bereits etabliert sind und auf vielfältige Weise angewandt werden können (SrtA, LplA und PPTase, siehe Kapitel 1.7). Dabei gilt zu beachten, dass für diese Methoden bereits das Enzym und/oder die Erkennungssequenz des Enzyms zielgerichtet optimiert wurden.

Im Zuge der vorliegenden Arbeit konnten zahlreiche CDP-Cholin-Derivate für die Ein- und Zwei-Schritt-Markierung von Proteinen hergestellt werden. AnkX akzeptiert dabei sowohl alle Analoga mit PEG₄-Linker als auch alle Derivate mit C1-/C3-Linker als Cosubstrate, ohne dass die CDP-Cholin-Bindetasche von AnkX durch Mutation verändert werden musste. Es muss jedoch erwähnt werden, dass beim Einsatz des langen PEG₄-Linkers ein wesentlicher Vorteil der AnkX-basierten Markierungsmethode, welcher in der geringen Größe der übertragenen PC-Gruppe besteht, verloren geht. Zudem läuft die AnkX-vermittelte Übertragung von PC-PEG₄-Konjugaten mit einer katalytischen Effizienz von 1 % im Vergleich zur katalytischen Effizienz der natürlichen Phosphocholinierung relativ langsam ab. CDP-Cholin-Analoga mit kurzem C1-/C3-Linker und einer bioorthogonalen Gruppe können in Abhängigkeit der funktionellen Gruppe höhere katalytische Effizienzen für die AnkX-vermittelte Phosphocholinierung erzielen. Das Analogon mit der höchsten katalytischen Effizienz im Vergleich zur katalytischen Effizienz der natürlichen Phosphocholinierung ist das C1-Alkin-Derivat ($k_{\text{cat}}/K_{\text{M}} = 14 \%$). Dieses Derivat besitzt gleichzeitig minimalen sterischen Anspruch.

Für andere enzymatische Markierungsmethoden existieren ebenfalls eine Reihe an bioorthogonal funktionalisierten Cosubstraten. Jedoch wurde bei deren Charakterisierung oftmals keine detaillierte Bestimmung kinetischer Parameter durchgeführt. Für LplA hingegen wurden Liponsäure-Analoga unterschiedlicher Länge mit einer Azidgruppe ausgestattet und die kinetischen Parameter für die Liponsäure-Ligation mit einem natürlichen LplA-Substratprotein bestimmt. Dabei erzielte das effizienteste Liponsäure-Azid-Derivat einen $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ -Wert von $8,7 \cdot 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.¹⁹⁶ In der genannten Arbeit fand jedoch keine Bestimmung der kinetischen Parameter für die natürliche Liponsäure-Ligation statt. Stattdessen verglichen Fernández-Suárez et al. ihre ermittelten Werte mit den Werten aus zwei weiteren Arbeiten ($k_{\text{cat}}/K_{\text{M}} = 5,6 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ und $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}} = 1,5 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$).^{223,224} Verglichen mit der natürlichen Liponsäure-Ligation ergibt sich aus diesen Werten für die Liponsäure-Ligation des effizientesten Liponsäure-Azid-Derivats ein normalisierter $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ -Wert von ca. 1 %. Dieser

Wert liegt eine Größenordnung unter der normalisierten katalytischen Effizienz des C1-Alkin-Derivats für die AnkX-vermittelte Phosphocholinierung ($k_{cat}/K_M = 14 \%$).

Diese Zahlenwerte verdeutlichen, dass die bioorthogonalen Derivate der AnkX-basierten Markierungsmethode im Vergleich zu anderen Methoden relativ schnell übertragen werden. Theoretisch könnte der Versuch unternommen werden, die CDP-Cholin-Analoga weiter zu optimieren. Dazu könnte die Position variiert werden, an der die Cholin Kopfgruppe von CDP-Cholin funktionalisiert wird. Statt an der Ammoniumgruppe könnten funktionelle Gruppen auch an der Ethylengruppe oder am β -Phosphat angebracht werden. Die normalisierten katalytischen Effizienzen der bioorthogonalen CDP-Cholin-Analoga mit kurzem C1-/C3-Linker sind jedoch bereits relativ hoch einzuordnen. Es scheint daher unwahrscheinlich, die Effizienz der AnkX-basierten Markierungsmethode durch eine weitere Optimierung der CDP-Cholin-Derivate signifikant steigern zu können.

Der k_{cat}/K_M -Wert für die AnkX-katalysierte Phosphocholinierung des effizientesten Modellproteins ist im Vergleich zum natürlichen Substratprotein Rab1b um den Faktor 50 reduziert.⁴¹ Legt man für die Phosphocholinierung von Rab1b die in der vorliegenden Arbeit optimierte katalytische Effizienz von $1,3 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ zu Grunde, ergibt sich für die Phosphocholinierung des effizientesten Modellproteins eine katalytische Effizienz von $2,6 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Die katalytischen Effizienzen etablierter Enzyme für die Modifizierung der Erkennungspeptide mit dem natürlichen Cosubstrat sind dabei etwa um eine Größenordnung höher: $2,8 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (SrtA),¹⁴⁵ $1,7 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (LpIA)¹⁹⁷ und $3,2 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (PPTase).²⁰⁴ Im Fall der PPTase gilt der k_{cat}/K_M -Wert nicht für das natürliche Cosubstrat, sondern für ein Biotin-funktionalisiertes Cosubstrat.

Wie eingangs erwähnt, muss jedoch bedacht werden, dass bei den etablierten Markierungsmethoden bereits eine zielgerichtete Optimierung des Enzyms und/oder der Erkennungssequenz vorgenommen wurde. So konnte für die SrtA-basierte Proteinmarkierung ein mutiertes Enzym hergestellt werden, das um den Faktor 140 aktiver ist als der SrtA-Wildtyp.¹⁴⁵ Für die LpIA-vermittelte Proteinmarkierung konnte durch zielgerichtete Evolution eine Peptidsequenz generiert werden, deren k_{cat}/K_M -Wert für die Liponsäure-Ligation um einen Faktor von 70 höher ist, als der k_{cat}/K_M -Wert der zuvor verwendeten Erkennungssequenz.¹⁹⁷ Würde sich der k_{cat}/K_M -Wert der AnkX-Erkennungssequenz um einen ähnlichen Faktor erhöhen lassen, wäre es möglich, die katalytische Effizienz der AnkX-vermittelten Proteinmarkierung in den Bereich etablierter Methoden anzuheben.

Es muss jedoch bedacht werden, dass die zielgerichtete Enzym- bzw. Peptid evolution im Fall der etablierten Enzyme durch Peptidselektion auf der Oberfläche von Phagen oder Hefezellen durchgeführt wurde. Für AnkX konnte die Oberflächenmarkierung von Säugerzellen bisher nicht durchgeführt werden. Daher könnte die AnkX-vermittelte Peptidmarkierung und -selektion auf der Oberfläche von Phagen oder Hefezellen ebenfalls erschwert sein. Im

Fall von AnkX könnte die Suche nach einer effizienteren AnkX-Erkennungssequenz stattdessen auf einem *Microarray* durchgeführt werden, auf dem eine Vielzahl an Peptiden positionsgenau immobilisiert ist.²²⁵ Nach der Inkubation des *Microarrays* mit AnkX und CDP-Cholin könnten phosphocholinierte Peptide über einen Fluorophor-gekoppelten PC-Antikörper ausgelesen werden. Anschließend könnte für die Treffer dieser Auslese der k_{cat}/K_M -Wert für die AnkX-katalysierte Phosphocholinierung bestimmt werden und auf diese Weise möglicherweise eine effizientere AnkX-Erkennungssequenz identifiziert werden.

Durch die Verwendung zweier unterschiedlicher AnkX-Erkennungssequenzen in Kombination mit dem abwechselnden Einsatz von AnkX und Lem3 ist es prinzipiell möglich, Zielproteine ortsspezifisch mit zwei unterschiedlichen Funktionalitäten zu markieren. Prinzipiell kann die ortsspezifische Zweifach-Markierung von Zielproteinen auch durch die Kombination von zwei verschiedenen enzymatischen Markierungsmethoden, die zueinander orthogonal sind, durchgeführt werden. Die AnkX/Lem3-basierte Zweifachmarkierung bietet in der Praxis jedoch den Vorteil, dass nicht zwei verschiedene Klassen von Cosubstraten synthetisiert werden müssen. Stattdessen ist eine einzige Klasse von Cosubstraten (CDP-Cholin-Analoga) ausreichend. Aktuell existiert lediglich eine weitere enzymatische Markierungsmethode, die die Zweifach-Markierung von Zielproteinen ohne die Kombination mit anderen Methoden erlaubt: Für die PPTase-basierte Proteinmarkierung konnten durch zielgerichtete Evolution zwei Erkennungssequenzen identifiziert werden, die in orthogonaler Weise von zwei unterschiedlichen PPTasen erkannt und modifiziert werden.²⁰⁴ Durch die Ausstattung eines Zielproteins mit den orthogonalen Erkennungssequenzen und durch den sequenziellen Einsatz der PPTasen kann eine ortsspezifische Zweifach-Markierung erzielt werden.²²⁶ Die PPTase-basierte Proteinmarkierung ist zugleich die einzig weitere Methode die neben der AnkX-vermittelten Proteinmarkierung spurlos reversibel ist.

Ein entscheidendes Manko der AnkX-basierten Proteinmarkierung besteht darin, dass bisher die Markierung von Proteinen auf der Oberfläche von Zellen nicht nachgewiesen werden konnte. Für die meisten anderen enzymatischen Markierungsmethoden konnte die Markierung von Proteinen auf der Zelloberfläche oder im Inneren von Zellen bereits demonstriert werden. Sollte sich herausstellen, dass die AnkX-basierte Proteinmarkierung *in vivo* möglich ist, wäre ein Vorteil, dass CDP-Cholin-Derivate trotz ihrer negativen Ladung die Zellmembran überqueren können. Die aufwendige Entwicklung spezieller zellpermeabler Cosubstrate bliebe für die AnkX-vermittelte Proteinmarkierung somit erspart.

Ebenfalls von Vorteil für die Anwendung der Markierungsmethode *in vivo* wäre die Tatsache, dass die AnkX-Variante $\Delta F143_{AnkX}$ zwar in der Lage ist, die ungefaltete AnkX-Erkennungssequenz zu phosphocholinieren, jedoch Rab1b nicht mehr lokal entfalten und modifizieren kann. Bei der Markierung von Proteinen im Inneren von Säugerzellen könnte durch den Einsatz der $\Delta F143_{AnkX}$ -Variante verhindert werden, dass neben dem Zielprotein

auch die zellulären Proteine der Rab1-Familie markiert werden. Die Modifizierung des natürlichen Substratproteins könnte bei der AnkX-vermittelten Proteinmarkierung demnach verhindert werden, ohne dass eine Erkennungssequenz identifiziert werden muss, die orthogonal zur natürlichen Erkennungssequenz des Enzyms ist.

5. Ausblick

Die in der vorliegenden Arbeit gelöste Komplexstruktur zwischen AnkX und Rab1b offenbart die Bedeutung der Ankyrin-*Repeats* für die Bindung von Rab1b und zeigt auf, wie durch lokale Proteinfaltung sowohl der aktive als auch der inaktive Zustand der kleinen GTPase phosphocholiniert werden kann. Die Interaktion zwischen dem *Switch II*-Bereich von Rab1b und dem katalytischen Zentrum von AnkX sowie der molekulare Mechanismus der Phosphocholinierung konnten jedoch nicht aufgelöst werden. Um die Interaktion zwischen der *Switch II*-Region von Rab1b und dem aktiven Zentrum von AnkX im Moment der Phosphocholinierung (bzw. unmittelbar davor) festhalten zu können, scheint der Einsatz der inaktiven AnkX-Variante H229A_{AnkX} notwendig. Die Strategie der kovalenten Komplexstabilisierung zwischen AnkX und Rab1b über thiolreaktive CDP-Cholin-Derivate ist mit einer inaktiven AnkX-Variante jedoch nicht kompatibel. Stattdessen könnte der Komplex zwischen der inaktiven AnkX-Variante und Rab1b mit Hilfe der Erweiterung des genetischen Codes und dem Einbau unnatürlicher thiolreaktiver Aminosäuren in Rab1b kovalent stabilisiert werden. Die in der vorliegenden Arbeit gelöste Kristallstruktur und die durchgeführten Mutations-Funktions-Analysen deuten an, dass dabei der Einbau einer thiolreaktiven Aminosäure in die AS-Position 30 oder 31 von Rab1b vielversprechend sein könnte.

Die thiolreaktiven CDP-Cholin-Derivate könnten zusätzlich zur Identifikation weiterer Zielproteine genutzt werden, die durch AnkX in Säugerzellen phosphocholiniert werden. Zu diesem Zweck könnte das binäre Addukt aus einer AnkX_{Cys}-Variante und einem thiolreaktiven CDP-Cholin-Derivat für *Pulldown*-Experimente mit Lysaten von Säugerzellen genutzt werden. Dabei würde es sich außerdem anbieten, den Dorn von AnkX_{Cys} zu deletieren. Auf diese Weise könnte verhindert werden, dass die bereits bekannten Zielproteine der Rab1-Familie phosphocholiniert werden und als Treffer der *Pulldown*-Experimente auftreten. Dies würde die Identifikation potenzieller Zielproteine erleichtern, welche durch AnkX deutlich schwächer modifiziert werden als die Substratproteine der Rab1-Familie.

Um AnkX als effizientes Werkzeug für die Markierung von Proteinen einsetzen zu können, muss die katalytische Effizienz für die Modifizierung von Modellproteinen verbessert werden. Hierfür gibt es drei mögliche Ansatzpunkte: Prinzipiell könnte die Modifizierung von Modellsubstraten effizienter gestaltet werden, indem der k_{cat}/K_M -Wert der CDP-Cholin-Derivate, der AnkX-Erkennungssequenz oder des Enzyms selbst erhöht wird. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass einige bioorthogonale CDP-Cholin-Derivate bereits relativ hohe Übertragungseffizienzen aufweisen und dass AnkX ein breites Spektrum an Cosubstraten toleriert, ohne dass die katalytische Tasche des Enzyms verändert werden muss. Daher steckt das meiste Potential wohl in der Optimierung der katalytischen Effizienz der AnkX-Erkennungssequenz. Zu diesem Zweck könnte eine Vielzahl an unterschiedlichen Peptiden positionsgenau auf einem *Microarray* immobilisiert werden und mit AnkX und

CDP-Cholin inkubiert werden. Die Auslese potenzieller AnkX-Erkennungspeptide könnte mit einem fluorophorgekoppelten PC-Antikörper erfolgen. Anschließend könnten die k_{cat}/K_M -Werte der AnkX-katalysierten Phosphocholinierung für die Treffer dieser Auslese bestimmt werden.

Ein weiterer notwendiger Schritt, um die AnkX-vermittelte Proteinmarkierung möglichst attraktiv zu gestalten, ist der Nachweis, dass die Strategie auch *in vivo* angewandt werden kann. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die AnkX-katalysierte Phosphocholinierung unter Zellkulturbedingungen ausgeführt und nachgewiesen werden kann. Die Phosphocholinierung von Zelloberflächenrezeptoren, die rekombinant mit der AnkX-Erkennungssequenz ausgestattet sind, sollte somit grundsätzlich möglich sein, sofern die Erkennungssequenz für das Enzym zugänglich ist. Daher sollten Rezeptorkonstrukte mit unterschiedlich langen Linkern zur AnkX-Erkennungssequenz hergestellt und als Modellproteine für die AnkX vermittelte-Phosphocholinierung auf der Oberfläche von Cos-7-Zellen getestet werden.

6. Material und Methoden

6.1 Material

Tabelle 1 Quellen und Hersteller der verwendeten Materialien.

Quelle/Hersteller	
AG Itzen, UKE Hamburg, D	Kern, Balingen, D
AG Hedberg, Umea University, SE	Labnet, Edison, USA
AG Groll, TU München, D	Leica, Wetzlar, D
Agilent, Waldbronn, D	Leybold, Köln, D
Alfa Aesar, Karlsruhe, D	Lonza, Basel, CH
AppliChem, Darmstadt, D	Merck Millipore, Cork, IRL
Beckman Coulter, Brea, USA	neoLab, Heidelberg, D
BioRad, München, D	New Brunswick, Hamburg, D
Bischoff Chromatographie, Leonberg, D	New England Biolabs (NEB), Ipswich, USA
Brand, Wertheim, D	Pharmacia, Uppsala, S
Braun, Melsungen, D	Phenomenex, Aschaffenburg, D
Carbosynth, Berkshire, UK	Promega, Mannheim, D
Carl Roth, Karlsruhe, D	Rex Leuchtplatten, Blaustein, D
Cell Signaling, Boston, USA	Sarstedt, Nümbrecht, D
Constant systems, Low March, UK	Scie-Plas, Cambridge, UK
Eppendorf, Hamburg, D	Serva, Heidelberg, D
Fisher Scientific, Carlsbad, USA	Shimadzu, Tokio, J
Fluka, Steinheim, D	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
GE Healthcare, Freiburg, D	Sigma Laborzentrifugen, Osterode am Harz, D
Heidolph, Schwabach, D	StarLab, Hamburg, D
Hellma, Müllheim, D	Systec, Linden, D
Heraeus, Hanau, D	Techno Plastic Products (TPP), Trasadingen, CH
Horiba Jobin Yvon, Fukuoka, J	Thermo Scientific, Wilmington, USA
Ibidi, Gräfelfing, D	VWR, Ohio, USA

6.1.1 Chemikalien

Tabelle 2 Verwendete Chemikalien.

Chemikalie	Hersteller
Acetonitril	VWR
Acrylamid	Serva
Agarose	Serva
Ammoniumpersulfat (APS)	VWR
β -Mercaptoethanol (β -Me)	VWR
BSA (steril)	Sigma Aldrich
Bromphenolblau	Alfa Aesar
Coffein	Sigma Aldrich

Coomassie Brillant Blau R-250	AppliChem
Cytidin-5'-Diphosphat	Carbosynth
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Sigma Aldrich
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Fluka
Dithiothreitol (DTT)	Carl Roth
DMEM	Sigma Aldrich
Eindeckmedium	Ibidi
Essigsäure	VWR
Ethanol (<i>biology grade</i>)	VWR
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	AppliChem
Fetals Kälberserum (FBS)	Sigma Aldrich
GelStar	Lonza
Glukose	Carl Roth
L-Glutathion (GSH)	Carl Roth
Glycerol	Carl Roth
Glycin	Carl Roth
Guanidiniumchlorid	VWR
Guanosin-5'-diphosphat	Carbosynth
Guanosin-5'-triphosphat	Carbosynth
Hefeextrakt	Serva
HEPES	Carbosynth
Imidazol	Alfa Aeser
Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Carbosynth
Isopropanol (<i>biology grade</i>)	VWR
Kaliumchlorid	VWR
Kaliumdihydrogenphosphat	Carl Roth
Kaliumhydrogenphosphat	VWR
Kupfersulfat	Sigma Aldrich
LB-Medium	Carl Roth
Maltose	Sigma Aldrich
Magnesiumchlorid	VWR
Methanol	Sigma Aldrich
Natrium-L(+)-ascorbat	Carl Roth
Natriumazid	Alfa Aeser
Natriumchlorid	VWR
Natriumdihydrogenphosphat	Carl Roth
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth
Natriumhydrogenphosphat	Carl Roth
Natriumhydroxid	Carl Roth
Nickelsulfat	Carl Roth
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	VWR

Roti-Block	Carl Roth
Salzsäure	VWR
TCEP	Carl Roth
Tetrabutylammoniumbromid (TBABr)	Alfa Aeser
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	VWR
THPTA	Sigma Aldrich
TRIS	Carl Roth
Trypton	Carl Roth
Tween20	Sigma Aldrich
Xylencyanol	AppliChem

6.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 3 Verwendete Materialien.

Material	Hersteller
Amicon Zentrifugen-Filtereinheiten (0,5 ml, 4 ml, 15 ml)	Merck Millipore
Dialyseschlauch (MWCO 12-14 kDa)	Serva
Kanülen	Braun
Küvetten (UV-Vis)	Sarstedt
Membranfilter (0,22 µm, 0,45 µm)	Merck Millipore
Nitrocellulosemembran	Carl Roth
Objektträger (<i>µ-Slide 8 Well</i>)	Ibidi
Pasteurpipetten	Sarstedt
PCR-Reaktionsgefäße (0,2 ml)	Sarstedt
Petrischalen	Sarstedt
Reaktionsgefäße (1,5 ml)	Ratiolab
Reaktionsgefäße (2,0 ml)	Lab Logistics Group
Reaktionsgefäße (1,5 ml, braun)	Sarstedt
Reaktionsgefäße (15 ml, 50 ml)	Sarstedt
Serologische Pipetten (2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml)	Sarstedt
Pipettenspitzen (1-10 µl)	StarLab
Pipettenspitzen (10-100 µl)	Sarstedt
Pipettenspitzen (100-1000 µl)	Brand
Spritzen	Braun
Whatman Filterpapier	Carl Roth
Zellkulturschalen	TTP

6.1.3 Geräte

Tabelle 4 Verwendete Geräte.

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Analysewaage	ACJ 120-4M	Kern

Autoklav	VE-65	Systemec
Chemilumineszenz- <i>Imager</i>	Image Quant LAS4000	GE Healthcare
CO ₂ -Inkubator	HERACELL 150i	Thermo Scientific
Elektronische Pipettierhilfe	Easypet	Eppendorf
Elektrophoresekammer	Mini-PROTEAN Tetra Cell, Mini-Sub Cell GT	BioRad
ESI-Massenspektrometer	MS: 6130 Quadrupole LC/MS HPLC: 1260 Infinity LC	Agilent
Feinwaage	EG 2200-2NM	Kern
Fluoreszenzmikroskop	DMi8	Leica
Fluoreszenzscanner	Typhoon	GE Healthcare
Fluoreszenzspektrometer	Fluoromax-4	Horiba Jobin Yvon
FPLC-System	ÄKTAprime plus	GE Healthcare
Gefrierschrank (-80 °C)	U410 Freezer	New Brunswick
Gelscanner	ImageScanner III	GE Healthcare
Heizblock	AccuBlock Digital Dry Bath	Labnet
Homogenisator	Silent Crusher M	Heidolph
HPLC-System	Kommunikationseinheit: CBM 20A Pumpe: LC-20AD Probengeber: SIL-20AV UV-Detektor: SPD-20AV Fraktionierer: FRC-10A	Shimadzu
Inkubationsschüttler	Innova 44	New Brunswick
Lichtmikroskop	DM IL	Leica
MPLC-System	NGC	BioRad
Orbitalschüttler	OmniMax 1000	Heidolph
pH-Meter und pH-Elektrode	pHenomenal und pHenomenal 111	VWR
Pipetten	Research plus	Eppendorf
Stromversorgung	PowerPac Basic, EPS 601	BioRad, Pharmacia
Semi-Dry Blotter	V20-SDB	Scie-Plas
Sterilbank	HERASafe	Heraeus
Thermocycler	T100	BioRad
Thermomixer	Thermomixer comfort	Eppendorf
Tischzentrifuge	5424, 5424R, 5810R	Eppendorf
Transilluminator	Weißlicht: FL-3 LED, Blaulicht: BlueLight Table	Rex Leuchtplatten, Serva
UV-Vis Spektralphotometer	Novaspec II, NanoDrop2000c	Pharmacia, VWR
Überkopfmischer	Intelli-Mixer RM-2L	neoLab
Vakuumpumpe	Divac 2.4L	Leybold
Zellaufschlussmaschine	Constant Cell Disruption Systems	Constant systems

Zentrifuge	Avanti J-26 XP (Rotor JA 25.50), Sigma 8K	Beckmann Coulter, Sigma Aldrich
------------	--	------------------------------------

6.1.4 Chromatographiezubehör

Tabelle 5 Verwendetes Zubehör für die Chromatographie.

Chromatographiezubehör	Bezeichnung	Hersteller
IMAC-Kartuschensäule	Nuvia (5 ml), HiTrap (5 ml)	BioRad, GE Healthcare
GSH-Kartuschensäule	Mini Profinity GST (5 ml)	BioRad
MBP-Kartuschensäule	MBP Trap HP (5 ml)	GE Healthcare
Magnetische Kügelchen	MagStrep "type3" XT beads	Iba
Gelfiltrationssäule	Präparativ: Superdex 75 16/600, Superdex 200 16/600 Analytisch: Superdex 200 10/300	GE Healthcare
Umkehrphasen- Chromatographie-Säule	ProntoSIL C18 (5 µm, 250 x 4,6 mm, 120 Å) Jupiter C4 (5 µm, 150 x 2 mm, 300 Å) Jupiter C18 (5 µm, 150 x 2 mm, 300 Å)	Bischoff, Phenomenex

6.1.5 Kits

Tabelle 6 Verwendete Kits.

Kit	Hersteller
PureYield Plasmid Miniprep System	Promega
PureYield Plasmid Midiprep System	Promega
Monarch DNA Gel Extraction Kit	NEB
Q5 Site-Directed Mutagenesis Kit	NEB

6.1.6 Antibiotika

Tabelle 7 Verwendete Antibiotika.

Antibiotikum	Finale Konzentration	Hersteller
Ampicillin	125 µg/ml	AppliChem
Chloramphenicol	34 µg/ml	AppliChem
Hygromycin	100 µg/ml	AppliChem
<i>Antibiotic Antimycotic Solution (100x, Pen/Strep)</i>	1x	Sigma Aldrich

6.1.7 Größenstandards

Tabelle 8 Verwendete Größenstandards.

Standard	Hersteller
DNA Ladder (100 bp, 1 kb)	NEB
ColorPlus Prestained Protein Marker, Broad Range	NEB
Gelfiltrationsstandard (#1511901)	BioRad

6.1.8 Enzyme

Tabelle 9 Verwendete Enzyme.

Enzym	Hersteller
DNase I	Sigma Aldrich
Lysozym	Carl Roth
Q5 DNA-Polymerase	AG Itzen
T4 DNA-Polymerase	NEB
PreScission Protease	AG Itzen
TEV Protease	AG Itzen

6.1.9 Antikörper

Tabelle 10 Verwendete Antikörper

Antikörper	Epitop	Methode	Hersteller
IgA Kappa TEPC15	PC	Western Blot (1:1000) Immunfluoreszenz (1:1000)	AppliChem
Pierce Streptavidin Poly-HRP	Biotin	Western Blot (1:1000)	Thermo Fisher
Anti-HA Antikörper (#26183)	HA	Immunfluoreszenz (1:1000)	Thermo Fisher
Ziege Anti-Maus IgG, IgA, IgM, HRP-Konjugat	Maus IgG, IgA, IgM	Western Blot (1:10000)	Thermo Fisher
Ziege Anti-Maus IgG, Alexa-Fluor-647	Maus IgG	Immunfluoreszenz (1:1000)	Cell Signaling
Ziege Anti-Kaninchen IgG, Alexa-Fluor-568	Kaninchen IgG	Immunfluoreszenz (1:1500)	Thermo Fisher

6.1.10 Bakterienstämme

Tabelle 11 Verwendete Bakterienstämme.

Bakterienstamm	Genotyp	Hersteller
<i>E. coli</i> Mach1	$\Delta recA1398\ endA1\ fhuA\ \Phi80\Delta(lac)M15$ $\Delta(lac)X74\ hsdR(r_K^-m_K^+)$	Thermo Scientific
<i>E. coli</i> BI21-(DE3)	F ⁻ <i>ompT gal dcm lon hsdS_B(r_B⁻m_B⁻)</i> $\lambda(DE3\ [lacI\ lacUV5-T7p07\ ind1\ sam7\ nin5])\ [malB^+]_{K-12}(\lambda^S)$	Promega
<i>E. coli</i> BI21-(DE3)-RIL	F ⁻ <i>ompT hsdS(rB – mB –) dcm+ Tetr gal</i> $\lambda(DE3)\ endA\ Hte\ [argU\ ileY\ leuW\ Camr]$	Agilent

6.1.11 Zelllinien

Tabelle 12 Verwendete Zelllinien.

Zelllinie	Phänotyp	Quelle
Cos-7	Adhärente Fibroblasten der Niere	ATCC CRL-1651

6.1.12 Lösungen

Tabelle 13 Häufig verwendete Lösungen.

Lösungen für die SDS-PAGE	Sonstige Lösungen
<p>Acrylamid Acrylamid/Bis-Lösung, 37,5:1 (30 % (w/v), 2,6 % Crosslinker)</p> <p>Polymerisationsstarter APS (10 % (w/v), 200x) TEMED (2000x)</p> <p>SDS-PAGE Sammelgelpuffer (4x) Tris (0,5 M), pH 6,8 SDS (0,4 % (w/v))</p> <p>SDS-PAGE Trenngelpuffer (4x) Tris (1,5 M), pH 8,8 SDS (0,4 % (w/v))</p> <p>SDS-PAGE Probenpuffer (2x) Tris (0,1 M), pH 6,8 SDS (4 % (w/v)) Glycerol (20 % (w/v)) β-Me (10 % (v/v)) Bromphenolblau (0,002 % (w/v))</p> <p>SDS-PAGE Laufpuffer (10x) Tris (0,25 M), pH 6,8 Glycin (2 M) SDS (4 % (w/v))</p> <p>SDS-PAGE Färbelösung Essigsäure (12 % (v/v)) Ethanol (44 % (v/v)) Coomassie Brilliant Blau R-250 (0,15 % (w/v))</p> <p>SDS-Entfärbelösung Essigsäure (12 % (v/v))</p>	<p>DNA-Ladepuffer (10x) Glycerol (50 % (v/v)) EDTA (10 mM) Bromphenolblau (0,2 % (w/v)) Xylencyanol (0,2 % (w/v))</p> <p>TAE-Puffer (50x) Tris (1 M), pH 8,0 Essigsäure (2 M) EDTA (0,5 M)</p> <p>PBS (20x) NaCl (2,74 M) KCl (54 mM) Na₂HPO₄ (200 mM) NaH₂PO₄ (36 mM)</p> <p>TBS-T Tris (50 mM) NaCl (150 mM) Tween20 (0.1 % (v/v))</p> <p>Blotting-Puffer Tris (48 mM) Glycin (39 mM) SDS (1,28 mM) Methanol (20 % (v/v)), pH 8,9</p> <p>Blocking-Puffer Roti-Block (1x) in TBS-T</p> <p>Western Blot-Detektionslösung Western Bright ECL-Spray (Advansta)</p>

6.1.13 Pufferlösungen für die Reinigung von Proteinen

Tabelle 14 Pufferlösungen für die Reinigung von Proteinen.

AnkX		
Puffer A	Dialyse-Puffer	Gelfiltrations-Puffer
Tris (50 mM), pH 8,0	Tris (20 mM), pH 8,0	Tris (20 mM), pH 8,0
NaCl (500 mM)	NaCl (300 mM)	NaCl (300 mM)
Glycerol (5 % (w/v))	Glycerol (5 % (w/v))	Glycerol (5 % (w/v))
β -Me (2 mM)	β -Me (2 mM)	DTT ⁺ (1 mM)

+ β -Me, falls AnkX für Reaktionen mit thiolreaktiven Derivaten eingesetzt werden soll

Lem3		
Puffer A	Dialyse-Puffer	Gelfiltrations-Puffer
Tris (50 mM), pH 7,5	Tris (20 mM), pH 7,5	Tris (20 mM), pH 7,5
NaCl (500 mM)	NaCl (100 mM)	NaCl (50 mM)
MgCl ₂ (1 mM)	MgCl ₂ (1 mM)	MgCl ₂ (1 mM)
β -Me (2 mM)	β -Me (2 mM)	DTT (1 mM)

Rab1b		
Puffer A	Dialyse-Puffer	Gelfiltrations-Puffer
Hepes (50 mM), pH 7,5	Hepes (20 mM), pH 7,5	Hepes (20 mM), pH 7,5
NaCl (500 mM)	NaCl (100 mM)	NaCl (50 mM)
MgCl ₂ (1 mM)	GDP (10 μ M)	MgCl ₂ (1 mM)
GDP (10 μ M)	β -Me (2 mM)	GDP (10 μ M)
β -Me (2 mM)		DTT ⁺ (1 mM)

+ β -Me falls Rab1b für Reaktionen mit thiolreaktiven Derivaten eingesetzt werden soll

Zusätzlich zu den aufgelisteten Puffern wurde für die Nickel-basierte Affinitätschromatographie von Proteinen ein Puffer B verwendet, der aus dem jeweiligen Puffer A inklusive Imidazol (500 mM) bestand.

6.1.14 Nährmedien

Tabelle 15 Verwendete Nährmedien.

Nährmedium			
LB-Medium	LB-Agar	SOC-Medium	Cos-7-Kulturmedium
Hefeextrakt (5 g/L)	Hefeextrakt (5 g/L)	Hefeextrakt (5 g/L)	FBS (10 % (v/v))
Trypton (10 g/L)	Trypton (10 g/L)	Trypton (20 g/L)	Pen/Strep (1x)
NaCl (10 g/L)	NaCl (10 g/L)	NaCl (10 mM)	in DMEM
in ddH ₂ O	15 g Agar	KCl (2,5 mM)	
	in ddH ₂ O	MgCl ₂ (10 mM)	
		Glukose (20 mM)	
		in ddH ₂ O	

6.1.15 Plasmide

Tabelle 16 Verwendete Plasmide.

Plasmidnummer und -name	Protein	Hersteller
2142 pMAL Rab1b delta N-C opti	Rab1b	AG Itzen, Dr. K. Heller
M0152 pET28_TITSSYYR-SUMO	TITSSYYR-SUMO	AG Itzen, Dr. K. Heller
M1188_pGATEV_AnkX_1-800	AnkX	AG Itzen, S. Ernst
M1189_pMAL_AnkX_1-800	AnkX	AG Itzen, S. Ernst
M1264_pHAL_AnkX_1-800_V105C	AnkX _{V105C}	AG Itzen, S. Ernst
M1265_pHAL_AnkX_1-800_F107C	AnkX _{F107C}	AG Itzen, S. Ernst
M1268_pHAL_AnkX_1-800_N262C	AnkX _{N262C}	AG Itzen, S. Ernst
M1556_pHAL_AnkX_1-800	AnkX	AG Itzen, S. Ernst
M1558_pHAL_AnkX_1-800_S521A_T620A	AnkX _{S521A T620A}	AG Itzen, S. Ernst
M1777_pHAL_AnkX_1-484	AnkX ₁₋₄₈₄	AG Itzen, S. Ernst
M1778_pHAL_AnkX_1-520	AnkX ₁₋₅₂₀	AG Itzen, S. Ernst
M1779_pHAL_AnkX_1-588	AnkX ₁₋₅₈₈	AG Itzen, S. Ernst
M1780_pHAL_AnkX_1-619	AnkX ₁₋₆₁₉	AG Itzen, S. Ernst
M1781_pHAL_AnkX_1-688	AnkX ₁₋₆₈₈	AG Itzen, S. Ernst
M1782_pHAL_AnkX_1-723	AnkX ₁₋₇₂₃	AG Itzen, S. Ernst
M1783_pHAL_AnkX_1-769	AnkX ₁₋₇₆₉	AG Itzen, S. Ernst
M1799_pMAL_TITSTYYR_Rab1b delta N-C-opti	TITSSYYR-MBP-Rab1b	AG Itzen, S. Ernst
M1801_HA_TITSSYYR_hY2R-eYFP	HA-TITSSYYR-hY2R-eYFP	AG Itzen, S. Ernst
M2026_pMAL_Lem3_1-500	Lem3	AG Itzen, S. Ernst
M2139_pSF421_10xHis_GFP_AnkX_1-800	AnkX	AG Itzen, S. Ernst
M2162_pSF421_10xHis_GFP_AnkX_1-800_G108C	AnkX _{G108C}	AG Itzen, M. Kaspers
M2163_pSF421_10xHis_GFP_AnkX_1-800_I109C	AnkX _{I109C}	AG Itzen, M. Kaspers
M2164_pSF421_10xHis_GFP_AnkX_1-800_E226C	AnkX _{E226C}	AG Itzen, M. Kaspers
M2165_pSF421_10xHis_GFP_AnkX_1-800_G236C	AnkX _{G236C}	AG Itzen, M. Kaspers
M2166_pSF421_10xHis_GFP_AnkX_1-800_V240C	AnkX _{V240C}	AG Itzen, M. Kaspers
M2167_pSF421_10xHis_GFP_AnkX_1-800_D265C	AnkX _{D265C}	AG Itzen, M. Kaspers
M2343 pMAL_10xHis_Prescission_Rab1b 3-174	His ₁₀ -PreScission-Rab1b	AG Itzen, M. Kaspers
M2362_pSF421_10xHis_GFP_AnkX_1-800_G108C_C48S_C84S_C172S	AnkX _{G108C_C48S_C84S_C172S}	AG Itzen, M. Kaspers
M2602_pMAL_StrepTag_Rab1b_3-174	Rab1b	AG Itzen, S. Ernst
M2603_pHAL_StrepTag_AnkX_1-800_F143G	AnkX _{F143G}	AG Itzen, S. Ernst

M2604_pHAL_StrepTag_AnkX_1-800_F143A	AnkX _{F153A}	AG Itzen, S. Ernst
M2605_pHAL_StrepTag_AnkX_1-800_F143W	AnkX _{F143W}	AG Itzen, S. Ernst
M2606_pHAL_StrepTag_AnkX_1-800_F143E	AnkX _{F143E}	AG Itzen, S. Ernst
M2607_pHAL_StrepTag_AnkX_1-800_F143R	AnkX _{F143R}	AG Itzen, S. Ernst
M2608_pHAL_StrepTag_AnkX_1-800 _delta G141-G144	AnkX _{ΔF143}	AG Itzen, S. Ernst
M2640_pMAL_StrepTag_Rab1b_3-174_D30A	Rab1b _{D30A}	AG Itzen, S. Ernst
M2641_pMAL_StrepTag_Rab1b_3-174_D31A	Rab1b _{D31A}	AG Itzen, S. Ernst
M2642_pMAL_StrepTag_Rab1b_3-174_T32A	Rab1b _{T32A}	AG Itzen, S. Ernst
M2643_pMAL_StrepTag_Rab1b_3-174_T34A	Rab1b _{T34A}	AG Itzen, S. Ernst
M2644_pMAL_StrepTag_Rab1b_3-174_E35A	Rab1b _{E35A}	AG Itzen, S. Ernst
M2645_pMAL_StrepTag_Rab1b_3-174_I38A	Rab1b _{I38A}	AG Itzen, S. Ernst
M2646_pMAL_StrepTag_Rab1b_3-174_I41A	Rab1b _{I41A}	AG Itzen, S. Ernst
M2647_pMAL_StrepTag_Rab1b_3-174_D53A	Rab1b _{D53A}	AG Itzen, S. Ernst
M2648_pMAL_StrepTag_Rab1b_3-174_T72A	Rab1b _{T72A}	AG Itzen, S. Ernst
M2649_pMAL_StrepTag_Rab1b_3-174_I73A	Rab1b _{I73A}	AG Itzen, S. Ernst
M2650_pMAL_StrepTag_Rab1b_3-174_T74A	Rab1b _{T74A}	AG Itzen, S. Ernst
M2651_pMAL_StrepTag_Rab1b_3-174_S75A	Rab1b _{S75A}	AG Itzen, S. Ernst
M2652_pMAL_StrepTag_Rab1b_3-174_S76A	Rab1b _{S76A}	AG Itzen, S. Ernst
M2653_pMAL_StrepTag_Rab1b_3-174_Y77A	Rab1b _{Y77A}	AG Itzen, S. Ernst
M2654_pMAL_StrepTag_Rab1b_3-174_Y78A	Rab1b _{Y78A}	AG Itzen, S. Ernst
M2655_pMAL_StrepTag_Rab1b_3-174_R79A	Rab1b _{R79A}	AG Itzen, S. Ernst
M2656_pMAL_StrepTag_Rab1b_3-174_Q101A	Rab1b _{Q101A}	AG Itzen, S. Ernst
M2657_pMAL_StrepTag_Rab1b_3-174_E105A	Rab1b _{E105A}	AG Itzen, S. Ernst
M2658_pMAL_StrepTag_Rab1b_3-174_Y109A	Rab1b _{Y109A}	AG Itzen, S. Ernst
M2659_pMAL_StrepTag_Rab1b_3-174_T126A	Rab1b _{T126A}	AG Itzen, S. Ernst
M2660_pMAL_StrepTag_Rab1b_3-174_K128A	Rab1b _{K128A}	AG Itzen, S. Ernst
M2661_pMAL_StrepTag_Rab1b_3-174_K137A	Rab1b _{K137A}	AG Itzen, S. Ernst
M2662_pMAL_StrepTag_Rab1b_3-174_D141A	Rab1b _{D141A}	AG Itzen, S. Ernst
M2663_pMAL_StrepTag_Rab1b_3-174_K153A	Rab1b _{K153A}	AG Itzen, S. Ernst
M2664_pMAL_StrepTag_Rab1b_3-174_N154A	Rab1b _{N154A}	AG Itzen, S. Ernst
M2665_pMAL_StrepTag_Rab1b_3-174_T156A	Rab1b _{T156A}	AG Itzen, S. Ernst
M2666_pMAL_StrepTag_Rab1b_3-174_N157A	Rab1b _{N157A}	AG Itzen, S. Ernst
M2667_pMAL_StrepTag_Rab1b_3-174_Q160A	Rab1b _{Q160A}	AG Itzen, S. Ernst
M2668_pMAL_StrepTag_Rab1b_3-174_E168A	Rab1b _{E168A}	AG Itzen, S. Ernst
M2669_pMAL_StrepTag_Rab1b_3-174_K171A	Rab1b _{K171A}	AG Itzen, S. Ernst

6.1.16 CDP-Cholin-Derivate

Tabelle 17 Verwendete CDP-Cholin-Derivate.

CDP-Cholin-Derivat	Abkürzung	Hersteller
CDP-Cholin-PEG ₄ -TAMRA	PEG ₄ -TAMRA	AG Hedberg, Dr. P. Ochtrop
CDP-Cholin-PEG ₄ -Cumarin	PEG ₄ -Cumarin	AG Hedberg, Dr. P. Ochtrop
CDP-Cholin-PEG ₄ -NBD	PEG ₄ -NBD	AG Hedberg, Dr. P. Ochtrop
CDP-Cholin-PEG ₄ -Biotin	PEG ₄ -Biotin	AG Hedberg, Dr. P. Ochtrop
CDP-Cholin-PEG ₄ -Fluorescein	PEG ₄ -Fluorescein	AG Hedberg, Dr. P. Ochtrop
CDP-Cholin-PEG ₄ -Sulfo-Cy5	PEG ₄ -Sulfo-Cy5	AG Hedberg, Dr. P. Ochtrop
CDP-Cholin-C1-Alkin	C1-Alkin	AG Hedberg, Dr. P. Ochtrop
CDP-Cholin-C3-Azid	C3-Azid	AG Hedberg, S. Ernst
CDP-Cholin-C3-DBCO	C3-DBCO	AG Hedberg, S. Ernst
CDP-Cholin-PEG ₄ -DBCO	PEG ₄ -DBCO	AG Hedberg, S. Ernst
CDP-Cholin-C3-TCO	C3-TCO	AG Hedberg, S. Ernst
CDP-Cholin-PEG ₄ -TCO	PEG ₄ -TCO	AG Hedberg, S. Ernst
CDP-Cholin-C3-Tetrazin	C3-Tetrazin	AG Hedberg, S. Ernst
CDP-Cholin-PEG ₄ -Tetrazin	PEG ₄ -Tetrazin	AG Hedberg, S. Ernst
CDP-Cholin-C3-Chloracetamid	C3-Cl	AG Hedberg, Dr. P. Ochtrop
CDP-Cholin-C4-Chloracetamid	C4-Cl	AG Hedberg, Dr. P. Ochtrop
CDP-Cholin- C4-Bromacetamid	C4-Br	AG Hedberg, Dr. P. Ochtrop

6.1.17 Fluoreszenzfarbstoffe

Tabelle 18 Verwendete Fluoreszenzfarbstoffe.

Farbstoff	Hersteller
Cy5-Azid	AG Hedberg, Dr. P. Ochtrop
Cy5-DBCO	AG Hedberg, Dr. P. Ochtrop
Cy5-TCO	AG Hedberg, Dr. P. Ochtrop
Cy5-Tetrazin	AG Hedberg, Dr. P. Ochtrop
Rhodamin-Azid	Sigma Aldrich

6.1.18 Peptide

Tabelle 19 Verwendete Peptide.

Peptid	Hersteller
TITSSYYR	AG Hedberg, Dr. P. Ochtrop

6.2 Molekularbiologische Methoden

6.2.1 Polymerasekettenreaktion

Neue Plasmide wurden durch die Methode der sequenz- und ligationsunabhängigen Klonierung (engl. *sequence and ligation independent cloning*, SLIC) erstellt. Dazu musste einerseits die DNA, die in das Plasmid-Rückgrat (Vektor-DNA) eingefügt werden sollte (Insert-DNA), amplifiziert werden und andererseits das entsprechende Plasmid-Rückgrat linearisiert werden. Sowohl die Amplifizierung von Insert-DNA als auch die Linearisierung von Plasmid-DNA wurde durch die Methode der Polymerasekettenreaktion (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) durchgeführt. Bei der PCR handelt es sich um Abfolge von temperaturgesteuerten Zyklen, bei denen eine DNA-Vorlage (Templat-DNA) mit Hilfe von sequenzspezifischen Oligonukleotiden (DNA-*Primer*) und einer hitzestabilen DNA-Polymerase vervielfältigt wird. Der mehrmals wiederholte Zyklus beinhaltet das Aufschmelzen der Templat-DNA (Denaturierung), die Anlagerung der DNA-*Primer* an die Templat-DNA und die enzymatische Synthese (Elongation) der zur Templat-DNA komplementären DNA mittels Deoxyribonukleotiden (dNTPs).

Tabelle 20 Typischer Ansatz einer PCR.

Komponente	Volumen (μ l)
Q5-Reaktionspuffer (5x)	5
DMSO	1,25
dNTPs (10 mM)	0,5
5'- <i>Primer</i> (10 μ M)	0,5
3'- <i>Primer</i> (10 μ M)	0,5
Templat-DNA (10 ng/ μ l)	1
Q5-Polymerase	0,5
zu ddH ₂ O	25

Tabelle 21 Typisches Temperaturprogramm einer PCR. Der Zyklus aus Denaturierung, *Primer*-Anlagerung und Elongation wurde 25-30 Mal wiederholt.

Schritt	Temperatur	Zeit
Initiale Denaturierung	98 °C	30 s
Denaturierung	98 °C	10 s
<i>Primer</i> -Anlagerung	50-72 °C	20 s
Elongation	72 °C	30 s/kb
Finale Elongation	72 °C	5 min
Lagerung	12 °C	∞

6.2.2 Agarose-Gelelektrophorese und DNA-Reinigung

Amplifizierte DNA-Fragmente wurden durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und anschließend gereinigt. Bei der Agarose-Gelelektrophorese wird ausgenutzt, dass die stark negativ geladene DNA in einem elektrischen Feld in Richtung Anode wandert. Durch den Einsatz einer geeigneten Gel-Matrix können DNA-Fragmente auf diese Weise der Größe nach aufgetrennt werden. Für die Auftrennung von DNA-Fragmenten wurden 1 %ige (w/v) Agarosegele mit TAE-Puffer hergestellt. Für die Anfärbung der DNA wurde den Gelen bei der Herstellung GelStar zugesetzt (1:100000). Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte in einer mit TAE-Puffer gefüllten Gelelektrophoresekammer durch Anlegen einer Spannung von 100 V für 30 min. Als Größenstandard wurde eine 1 kb DNA *Ladder* eingesetzt. Aufgetrennte DNA-Fragmente wurden auf einem Blaulichtschirm visualisiert, aus dem Agarosegel ausgeschnitten und nach Angaben des Herstellers mit dem Monarch DNA Gel *Extraction* Kit von der Agarose-Matrix gereinigt.

6.2.3 T4-SLIC-Klonierung

Bei der T4-SLIC-Klonierung werden lineare DNA Fragmente zusammengefügt, die mit einer Länge von 15-20 bp überlappen. Dabei wird die 3'→5'-Exonukleaseaktivität der T4-DNA-Polymerase genutzt, um an den überlappenden DNA-Sequenzen einzelsträngige 5'-Überhänge einzuführen, die zueinander komplementär sind. Diese einzelsträngigen komplementären Überhänge können nach der Transformation in *E. coli* durch die bakterielle Replikationsmaschinerie miteinander verknüpft werden, wodurch intaktes ringförmiges DNA-Plasmid entsteht.

Tabelle 22 Typischer Ansatz einer T4-SLIC-Klonierung. Das Volumen an Insert-DNA (x) wurde so gewählt, dass ein 2facher molarer Überschuss von Insert-DNA zu Vektor-DNA vorlag.

Komponente	Volumen (µl)
NEB 2.1-Puffer (2x)	5
Vektor-DNA (50 ng/µl)	1
Insert-DNA	x
T4-DNA-Polymerase	0,5
zu ddH ₂ O	10

Der Reaktionsansatz einer T4-SLIC-Klonierung wurde 2,5 min bei RT und anschließend 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Reaktionsansatz in kompetente *E. coli* Mach1 Zellen transformiert.

6.2.4 Ortsspezifische Mutagenese

Um in DNA-Plasmide ortsspezifisch Insertionen, Deletionen oder Substitutionen einzuführen, wurde das Q5 *Site-Directed Mutagenesis* Kit verwendet. Durch die Wahl entsprechender DNA-Primer wurden die DNA-Plasmide zunächst mittels PCR linearisiert und mit der gewünschten Sequenzänderung ausgestattet. Das PCR-Produkt wurde mit dem KLD-Enzym-Mix des Kits bei 37 °C für 30 min inkubiert und anschließend in *E. coli* Mach1 Zellen transformiert. Der KLD-Enzym-Mix enthält eine Kinase, eine Ligase und DpnI. Während DpnI die methylierte Templat-DNA verdaut, phosphoryliert die Kinase die Enden der amplifizierten Plasmid-DNA, so dass diese durch die Ligase unter Ausbildung eines intakten ringförmigen DNA-Plasmids zusammengefügt werden können.

Tabelle 23 Typischer Ansatz einer KLD-Reaktion.

Komponente	Volumen (µl)
KLD-Reaktionspuffer (2x)	2,5
PCR-Produkt	1
KLD-Enzym-Mix (10x)	0,5
zu ddH ₂ O	5

6.2.5 Transformation chemisch kompetenter *E. coli* Zellen

Durch Hitzeschock-Transformation wurden DNA-Plasmide in chemisch kompetente *E. coli* Zellen eingebracht. Die chemisch kompetenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut und mit Plasmid-DNA (100 ng) für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde ein Hitzeschock bei

42 °C für 1 min durchgeführt. Die Zellen wurden 3 min auf Eis herunter gekühlt und mit 900 µl SOC-Medium bei 37 °C für 1 h unter Schütteln inkubiert. Die Zellsuspension wurde durch Zentrifugation (7000 rpm, 2 min) pelletiert und das Pellet in ca. 50 µl des Überstands aufgenommen, auf LB-Selektionsagar ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

6.2.6 Amplifikation und Reinigung von Plasmid-DNA

Zur Amplifikation von Plasmid-DNA wurden chemisch kompetente *E. coli* Mach1-Zellen mit dem entsprechenden DNA-Plasmid transformiert. Einzelkolonien wurden in LB-Selektionsmedium bei 37 °C über Nacht unter Schütteln inkubiert. Mini-Kulturen wurden mit 4 ml LB-Medium und Midi-Kulturen mit 100 ml LB-Medium angesetzt. Plasmid-DNA wurde nach Angaben des Herstellers mit dem PureYield Plasmid Miniprep/Midiprep System aufgereinigt.

6.3 Proteinchemische Methoden

6.3.1 Proteinüberexpression

Für die Überexpression von Proteinen wurden chemisch kompetente *E. coli* BL21-(DE3)-Zellen (für Rab1b-Konstrukte) oder BL21-(DE3)-RIL-Zellen (für AnkX- und Lem3-Konstrukte) mit dem entsprechenden DNA-Plasmid transformiert. Mit einer Pipettenspitze wurden mehrere Kolonien der LB-Agar-Platte abgestrichen und in 1-1,5 L LB-Selektionsmedium bei 37 °C und 200 rpm in einem Innova 44 Inkubator inkubiert. Bei einer $OD_{600} = 0,6-0,8$ wurde die Proteinexpression durch Zugabe von 0,5 mM Isopropylthiogalactopyranosid (IPTG) induziert und das Zielprotein bei 20 °C über Nacht exprimiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 5100 rpm und 20 °C für 30 min in einer Sigma 8K Zentrifuge geerntet. Das Zellpellet wurde in PBS resuspendiert und die resuspendierten Zellen bei 4000 rpm und 4 °C für 30 min in einer 5810 R Zentrifuge erneut zentrifugiert. Danach wurden die Zellpellets entweder in Flüssigstickstoff schockgefroren und bis zur Reinigung des Zielproteins bei -80 °C gelagert oder direkt der Proteinreinigung zugeführt.

6.3.2 Proteinreinigung

Zellpellets wurden in Puffer A (5 ml pro g Pellet) resuspendiert, mit einer Spatelspitze DNase I versetzt und bei einem Druck von 2,2 kbar mit einer Passage mechanisch aufgeschlossen. Anschließend wurde der Proteaseinhibitor Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF, 1 mM) zugegeben und das Lysat durch Zentrifugation bei 20000 rpm und 4 °C für 45 min in einer Avanti J-XP Zentrifuge mit dem JA 25.50 Rotor von Zelltrümmern befreit. Mittels Metallchelat-Affinitätschromatographie wurde das Zielprotein aus dem geklärten Lysat über den Polyhistidin (His)-Tag aufgereinigt. Dazu wurde eine Nuvia IMAC Säule mit $NiSO_4$ beladen und mit Puffer A

equilibriert. Das geklärte Lysat wurde mit 25 mM Imidazol versetzt, auf die Säule geladen und mit 200 ml Puffer A und 5 % Puffer B gewaschen. Durch einen 95 ml Gradient Puffer B (5-100 %) wurde das Zielprotein eluiert und über Nacht bei 4 °C gegen 3 L Dialyse-Puffer dialysiert. Falls das Zielprotein während der Reinigung vom His-Tag und/oder anderen Tags befreit werden sollte, wurde während der Dialyse die entsprechende Protease (TEV oder PreScission) in einem molaren Verhältnis von 1:40 zugegeben. Um das Zielprotein anschließend von der Protease und den entfernten Tags zu befreien, wurde reverse Metallchelate-Affinitätschromatographie angewandt. Abhängig vom Zielprotein und den abzutrennenden Tags wurde dazu eine Nuvia IMAC Säule, eine MBPTrap HP Säule oder beide Säulen in Reihe verwendet und das Zielprotein im Durchlauf gesammelt. Um oligomere Spezies abzutrennen, wurde abschließend eine Größenausschlusschromatographie durchgeführt. Die Zielproteine wurden anschließend mit Hilfe von Zentrifugen-Filtereinheiten auf 10-30 mg/ml konzentriert, in Flüssigstickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

6.3.3 Herstellung von *E. coli*-Zelllysaten mit xTractor-Puffer

Für die Herstellung von *E. coli*-Zelllysaten im kleinen Maßstab wurde das Zielprotein in 20 ml bakterieller Kultur überexprimiert. Nach der Überexpression wurden 2 ml der bakteriellen Kultur durch Zentrifugation bei 7000 rpm für 2 min geerntet. Die pelletierten Bakterien wurden in PBS aufgenommen und erneut bei 7000 rpm für 2 min zentrifugiert. Um die Zellen zu lysieren, wurde das Zellpellet in xTractor-Puffer (20 µl pro mg pellet) resuspendiert. Zu den resuspendierten Zellen wurden 1 mM PMSF, eine Spatelspitze DNase I sowie eine Spatelspitze Lysozym zugegeben. Die Zellsuspension wurde bei 4 °C für 1 h in einem Intelli-Mixer RM-2L Überkopfmischer inkubiert und das entstandene Zelllysate durch Zentrifugation bei 13000 rpm und 4 °C für 30 min von Zelltrümmern befreit. Das geklärte *E. coli*-Zelllysate wurde entweder direkt für weitere Experimente verwendet oder über magnetische Kügelchen aufgereinigt.

6.3.4 Proteinreinigung über magnetische Kügelchen

Um Zielproteine über den Strep-Tag aus *E. coli*-Zelllysaten im kleinen Maßstab aufzureinigen, wurden MagStrep "type3" XT magnetische Kügelchen verwendet. Dazu wurde 30 µl Suspension, welche 1,5 µl magnetische Kügelchen enthielt, unter Verwendung eines magnetischen Separators mit Gelfiltrationspuffer equilibriert. Die magnetischen Kügelchen wurden mit dem geklärten Zelllysate vermischt und bei 4 °C für 1 h in einem Intelli-Mixer RM-2L Überkopfmischer inkubiert. Danach wurden die magnetischen Kügelchen unter Verwendung eines magnetischen Separators mit 3x 900 µl Gelfiltrationspuffer gewaschen. Um das Zielprotein zu eluieren, wurden die magnetischen Kügelchen mit 5 µg PreScission-Protease in

50 µl Gelfiltrationspuffer bei 4 °C über Nacht in einem Intelli-Mixer RM-2L Überkopfmischer inkubiert. Der Überstand, in dem das Zielprotein nach Verdau mit der PreScission-Protease enthalten war, wurde von den magnetischen Kügelchen mit einem magnetischen Separator abgetrennt, in Flüssigstickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

6.3.5 Präparative Phosphocholinierung von Rab1b

Um Rab1b quantitativ mit CDP-Cholin oder synthetischen CDP-Cholin-Derivaten zu modifizieren, wurde Rab1b mit dem entsprechenden Nukleotid (1,1facher molarer Überschuss) und AnkX (500facher molarer Unterschuss) über Nacht bei RT inkubiert. Die Vollständigkeit der Modifizierung wurde mittels ESI-MS verifiziert. Anschließend wurde das modifizierte Rab1b-Protein durch Größenausschlusschromatographie mit einer Superdex 75 16/600 Säule von AnkX und überschüssigem Nukleotid befreit

6.3.6 Präparative Herstellung des AnkX_{G108C}:PC:Rab1b:GDP-Komplexes

Um den AnkX_{G108C}:PC:Rab1b:GDP-Komplex in präparativem Maßstab herzustellen, wurden die Proteinkonstrukte AnkX_{G108C}, bei dem die drei Cysteine C48_{AnkX}, C84_{AnkX} und C172_{AnkX} zu Serin mutiert waren (Plasmidnummer M2362), und His₁₀-PreScission-Rab1b (Plasmidnummer M2343) verwendet. His₁₀-PreScission-Rab1b wurde präparativ mit dem C3-Cl-Derivat modifiziert und anschließend mit AnkX_{G108C} in einem molaren Verhältnis von 1:1 bei 20 °C für 72 h inkubiert. Um freies AnkX_{G108C} abzutrennen, wurde der ternäre Komplex über Metallchelate-Affinitätschromatographie mit einer 5 ml Nuvia IMAC Säule aufgereinigt. Die Säule wurde mit Puffer A equilibriert und der AnkX_{G108C}:PC:Rab1b:GDP-Komplex über den *Loop* des Chromatographiesystems auf die Säule geladen. Nach einem 100 ml Waschschrift mit Puffer A und 10 % Puffer B wurde ein 90 ml Gradient Puffer B (10-100 %) angelegt, wobei der ternäre Komplex bei ca. 40 % eluiert wurde. Der ternäre Komplex wurde gegen 3 L Dialyse-Puffer dialysiert. Zeitgleich wurde der His₁₀-Tag durch die PreScission-Protease, welche in einem molaren Verhältnis von 1:40 zugegeben wurde, entfernt. Um den entfernten His₁₀-Tag, die Protease und freies Rab1b abzutrennen, wurde eine Größenausschlusschromatographie mit einer Superdex 200 16/600 Säule durchgeführt und der AnkX_{G108C}:PC:Rab1b:GDP-Komplex anschließend auf 12,5 mg/ml konzentriert.

6.3.7 AnkX/Lem3-basierte Zweifach-Markierung von Proteinen

Für die Etablierung der AnkX/Lem3-basierten Zweifach-Markierung von Proteinen wurde ein MBP-Rab1b-Fusionskonstrukt erstellt, welches N-terminal mit der T-Sequenz ausgestattet war und eine TEV-Schnittstelle zwischen der MBP- und der Rab1b-Domäne besaß

(Plasmidnummer M1799). Die Zweifach-Markierung des Fusionskonstrukts wurde entweder mit CDP-Cholin-Derivaten für die Ein-Schritt-Markierung (PEG₄-Fluorescein und PEG₄-TAMRA) oder CDP-Cholin-Analoga für die Zwei-Schritt-Markierung (C1-Alkin und PEG₄-TCO) durchgeführt. Im ersten Markierungsschritt wurde MBP-Rab1b (40 µM) mit dem ersten CDP-Cholin-Derivat (PEG₄-Fluorescein oder C1-Alkin, 2 mM) und AnkX (4 µM) über Nacht bei RT inkubiert. Um überschüssiges Nukleotid zu entfernen, wurde das Fusionskonstrukt über eine NAP5 Säule laut Angaben des Herstellers aufgereinigt. Das aufgereinigte Fusionskonstrukt (30 µM) wurde mit Lem3 (500 nM) für 3 h bei RT inkubiert, um die Modifikation spezifisch von der T-Sequenz abzuspalten. Um Lem3 zu entfernen, wurde das Fusionskonstrukt über eine Amylose-Matrix laut Angaben des Herstellers gereinigt. Im zweiten Markierungsschritt wurde das aufgereinigte Fusionskonstrukt (5 µM) mit dem zweiten CDP-Cholin-Derivat (PEG₄-TAMRA oder PEG₄-TCO, 40 µM) und AnkX (250 nM) für 1 h bei RT inkubiert. Um überschüssiges Nukleotid zu entfernen, wurde das Fusionskonstrukt erneut über eine NAP5 Säule gereinigt. Nach jedem Schritt der Zweifach-Markierung wurden Proben des Fusionskonstrukts genommen und analytisch mit der TEV-Protease, welche in einem molaren Verhältnis von 1:5 eingesetzt wurde, bei 30 °C für 3 h inkubiert. Bei der Zweifach-Markierung mit dem C1-Alkin- und PEG₄-TCO-Derivat wurden die Proben des Fusionskonstrukts (3 µM) vor der Inkubation mit der TEV-Protease mit Rhodamin-Azid (10 µM) und Cy5-Tetrazin (10 µM) markiert. Nach Inkubation mit der TEV-Protease wurden die Proben über SDS-PAGE aufgetrennt und die Zweifach-Markierung über In-Gel-Fluoreszenz verifiziert.

6.4.6 Markierung von Proteinen mit bioorthogonalen Sonden

Im Rahmen der AnkX/Lem3-basierten Zweifach-Markierung sowie bei der Bestimmung der katalytischen Effizienz von bioorthogonalen CDP-Cholin-Derivaten wurden Proteine mit bioorthogonalen Gruppen ausgestattet. Die eingeführten bioorthogonalen Gruppen wurden anschließend mit Farbstoffen, die mit komplementären Gruppen funktionalisiert waren, markiert. Dabei wurde generell ein 3-5facher Überschuss an Farbstoff zu Protein eingesetzt und die bioorthogonale Reaktion für 1 h bei RT durchgeführt. Die bioorthogonale Reaktion zwischen Aziden und Alkinen wurde in Gegenwart von CuSO₄ (500 µM), Natrium-Ascorbat (1 mM) und Tris(3-hydroxypropyltriazolylmethyl)amin (THPTA, 100 µM) durchgeführt.

6.4 Analytische Methoden

6.4.1 SDS-PAGE

Zur analytischen Trennung von Proteingemischen und zur Abschätzung von Proteingrößen wurde die Methode der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (engl. *sodium*

dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) eingesetzt. Bei der SDS-PAGE werden Proteine in Gegenwart von Natriumdodecylsulfat (engl. *sodium dodecyl sulfate*, SDS) denaturiert. Dabei lagert sich das negativ geladene SDS an die denaturierten Proteine an. Da die Menge an negativ geladenem SDS, die von Proteinen gebunden wird, direkt proportional zu deren Größe ist, können die Proteine anschließend durch Anlegen eines elektrischen Feldes in einer geeigneten Gel-Matrix der Größe nach aufgetrennt werden. In dieser Arbeit wurden SDS-PAGE-Gele nach Laemmli mit einem 5 %igen Sammelgel und einem 12- oder 15 %igen Trenngel verwendet.²²⁷ Proteinproben für die SDS-PAGE wurden mit 2x SDS-Probenpuffer gemischt und bei 95 °C für 5 min inkubiert, um eine vollständige Denaturierung der Proteine zu gewährleisten. Anschließend wurden die Proteinproben auf ein SDS-PAGE-Gel geladen und in einer mit SDS-Laufpuffer gefüllten Elektrophoresekammer bei einer Stromstärke von 60 mA für 1 h aufgetrennt.

6.4.2 Coomassie-Färbung von SDS-Gelen

Um Proteinbanden auf SDS-PAGE-Gelen sichtbar zu machen, wurden die Gele mit Coomassie-Färbelösung aufgeköcht und anschließend mit 10 %iger Essigsäure entfärbt. Für die densitometrische Quantifizierung von Coomassie-gefärbten Gel-Banden wurde die ImageStudio Lite Software verwendet.

6.4.3 In-Gel-Fluoreszenz

Um Proteine, die mit einer fluoreszenten Sonde markiert waren, auf SDS-PAGE Gelen zu visualisieren, wurde der Typhoon 9200 *Variable Mode Imager* verwendet. Für die densitometrische Quantifizierung von fluoreszenten Gel-Banden wurde die ImageStudio Lite Software verwendet.

6.4.2 Western Blot

Durch Western Blot und den Einsatz von spezifischen Antikörpern können Proteine oder Proteinmodifikationen spezifisch nachgewiesen werden. Zu diesem Zweck wurden Proteinproben über SDS-PAGE aufgetrennt und unter Verwendung von Whatman Filterpapier, welches in Transfer-Puffer getränkt war, auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Der Proteintransfer wurde mit einem *Semi-Dry-Blot-System V20-SDP* bei 0.7 mA/cm² für 2 h durchgeführt. Nach dem Transfer wurde die Nitrocellulose-Membran mit Roti-Block in TBS-T für 30 min bei RT geblockt. Anschließend wurde die Membran mit einem primären Antikörper (oder direkt mit einem Antikörper-HRP-Konjugat) bei 4 °C über Nacht unter konstantem Schütteln inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran dreimal für 10 min mit TBS-T unter konstantem Schütteln gewaschen und mit einem HRP-gekoppelten Sekundärantikörper in

TBS-T für 45 min bei RT unter konstantem Schütteln inkubiert. Die Membran wurde erneut dreimal für 10 min mit TBS-T unter konstantem Schütteln gewaschen. Anschließend wurde die Membran für 2 min mit der Western *Bright* ECL-Lösung entwickelt und das Chemilumineszenz-Signal mit dem Image Quant LAS4000 *Imager* ausgelesen. Für die densitometrische Quantifizierung von Western Blot-Banden wurde die ImageStudio Lite Software verwendet.

6.4.4 Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS)

Um die Modifizierung von Proteinen oder Peptiden über den eingeführten Massezuwachs zu bestimmen, wurde die Methode der Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS) eingesetzt. Dazu wurden die Proben unter Verwendung eines 1260 *Infinity* LC Systems über eine Jupiter 5 μm C4 300 Å Säule (Proteinproben) oder eine Jupiter 5 μm C18 300 Å Säule (Peptidproben) einem 6100 Quadrupol LC/MS System zugeführt. Die erhaltenen Ionenspektren wurden mit der *MagiC Transformer* (MagTran) Software dekonvoliert. Um den Grad von Protein- oder Peptidmodifikationen zu quantifizieren, wurden die Flächen der dekonvolierten Masse-*Peaks* der modifizierten und unmodifizierten Spezies mit der OriginPro Software quantifiziert.

6.4.5 Fluoreszenzspektrometrie

Bei Phosphocholinierung von Rab1b ändert sich die Umgebung der beiden Tryptophane W62_{Rab1b} und W102_{Rab1b} so, dass deren Fluoreszenz um 8-10 % zunimmt.³¹ Somit lässt sich die Phosphocholinierung von Rab1b über die Zunahme der Tryptophanfluoreszenz zeitaufgelöst verfolgen. Für kinetische Untersuchungen wurde das Fluoromax-4 Fluoreszenzspektrometer mit folgenden Einstellungen verwendet: λ_{exc} : 297 nm, λ_{em} : 340 nm, Weite des Anregungsschlitzes: 1 nm, Weite des Emissionsschlitzes: 5 nm. Alle Messungen wurden bei 25 °C in Rab1b-Gelfiltrationspuffer durchgeführt. Rab1b (5 μM) und CDP-Cholin (1 mM) wurden in einer 1 ml Fluoreszenzküvette vorgelegt. Sobald sich die Tryptophanfluoreszenz stabilisiert hatte, wurde die Reaktion durch Zugabe von AnkX (100 nM oder 250 nM) gestartet und die Zunahme der Tryptophanfluoreszenz verfolgt.

6.4.5 Zeitabhängiger Einbau von CDP-Cholin-Derivaten in Rab1b

Um den zeitabhängigen Einbau von synthetischen CDP-Cholin-Derivaten in Rab1b zu verfolgen, wurde Rab1b (50 μM) mit dem entsprechenden CDP-Cholin-Derivat (200 μM) und AnkX (1 μM) bei RT inkubiert. Bei CDP-Cholin-Derivaten, deren Einbau über In-Gel-Fluoreszenz oder über die Bandenverschiebung auf einem SDS-PAGE-Gel analysiert werden sollte, wurde der Reaktion MBP (37 μM) als Ladekontrolle zugesetzt. Im Fall von CDP-Cholin-Derivaten, die über Western Blot analysiert werden sollten, wurde MBP-PC (22 μM) als

Ladekontrolle eingesetzt. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Reaktionsstart wurden Proben genommen und durch Zugabe von Rab1b-Gelfiltrationspuffer, der auf 95 °C erhitzt worden war, gequenchet. Der zeitabhängige Einbau der CDP-Cholin-Derivate wurde anschließend analysiert, indem auf unterschiedliche Weise die Menge an modifiziertem Rab1b quantifiziert und auf die Ladekontrolle normalisiert wurde.

Der Einbau von CDP-Cholin-Derivaten, die direkt an eine Sonde gekoppelt waren, wurde über die Bandenverschiebung auf SDS-PAGE-Gelen analysiert. Die entsprechenden Proben (300 ng Rab1b) wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und die SDS-PAGE-Gele einer Coomassie-Färbung unterzogen. Modifiziertes Rab1b sowie die Ladekontrolle MBP wurden anschließend über das Coomassie-gefärbte Gel quantifiziert.

Der Einbau von bioorthogonalen CDP-Cholin-Derivaten wurde über In-Gel-Fluoreszenz analysiert. Die entsprechenden Proben wurden zunächst mit einem komplementären Cy5-Farbstoff markiert, wobei ein 5facher molarer Überschuss an Cy5-Farbstoff zu Rab1b eingesetzt wurde. Anschließend wurden die Proben (300-500 ng Rab1b) über SDS-PAGE aufgetrennt und über In-Gel-Fluoreszenz visualisiert. Die SDS-PAGE-Gele wurden im Anschluss einer Coomassie-Färbung unterzogen. Modifiziertes Rab1b wurde über die In-Gel-Fluoreszenz quantifiziert, die Ladekontrolle MBP über das Coomassie-gefärbte Gel.

Der Einbau des PEG₄-Biotin-Derivats wurde über Western Blot analysiert (100 ng Rab1b). Dabei wurde zunächst modifiziertes Rab1b über ein Streptavidin-HRP Konjugat detektiert und quantifiziert. Anschließend wurde die Ladekontrolle MBP-PC über einen PC-Antikörper und einen sekundären HRP-gekoppelten Anti-Maus Antikörper detektiert und quantifiziert.

6.4.6 Bestimmung katalytischer Effizienzen

Die zeitabhängige Modifizierung von Rab1b wurde durch Bandenverschiebung in SDS-Gelen, In-Gel-Fluoreszenz, Western Blot oder die Zunahme der Rab1b-Tryptophanfluoreszenz quantifiziert und gegen die Zeit aufgetragen. Die Reaktionskurven wurden durch Gleichung (1) mit Hilfe der OriginPro Software exponentiell angepasst und auf diese Weise die beobachtete Geschwindigkeitskonstante (k_{obs}) ermittelt. Die katalytische Effizienz ($k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$) wurde berechnet, indem k_{obs} durch die eingesetzte Enzymkonzentration geteilt wurde.

$$S(t) = S_0 + S_A \cdot e^{-k_{\text{obs}}/t} \quad \text{Gleichung (1)}$$

$S(t)$: zeitabhängige Signal-Intensität, S_0 : minimale Signalintensität, S_A : totale Signalamplitude, k_{obs} : beobachtete Geschwindigkeitskonstante, t : Zeit in Sekunden.

6.4.7 Ionenpaar-Umkehrphasen-Chromatographie

Bei der Ionenpaar-Umkehrphasen-Chromatographie wird der mobilen Phase ein Ionenpaarbildner zugesetzt, der über einen organischen Anteil und einen ionischen Anteil verfügt. In der mobilen Phase kann der ionische Anteil des Ionenpaarbildners mit Probenmolekülen entgegengesetzter Ladung ein Ionenpaar bilden. Dieses Ionenpaar verhält sich wie eine neutrale unpolare Verbindung und kann somit über den organischen Teil des Ionenpaarbildners von der unpolaren stationären Phase zurückgehalten werden. Auf diese Weise wird eine Trennung der Probenmoleküle nach dem Ionenaustausch-Mechanismus möglich.

In dieser Arbeit wurde eine Michaelis-Menten-Kinetik für die AnkX-vermittelte Hydrolyse von CDP-Cholin erstellt, indem der zeitabhängige Abbau von CDP-Cholin durch AnkX mit Hilfe von Ionenpaar-Umkehrphasen-Chromatographie analysiert wurde. Dabei wurde eine C18 Säule als Umkehrphase verwendet und Tetrabutylammoniumbromid (TBABr) als Ionenbildner, um negativ geladenes CDP-Cholin und dessen Hydrolyseprodukte durch Ionenaustausch trennen zu können. Die Chromatographie wurde mit einem Shimadzu HPLC System durchgeführt. Für die Erstellung der Michaelis-Menten-Kinetik wurden unterschiedliche Ausgangsmengen an CDP-Cholin (1 μM , 2 μM , 4 μM , 6 μM , 8 μM , 10 μM , 20 μM und 50 μM) durch AnkX (250 nM) in Gegenwart von MgCl_2 (100 μM) hydrolysiert. Das 1,5 ml Eppendorf-Reagenzgefäß, in dem die jeweilige Reaktion durchgeführt wurde, wurde in den Probengeber des HPLC Systems gestellt. Bereits vor Zugabe von AnkX wurde eine Probe über den Probengeber auf die C18 Säule injiziert. Anschließend wurde die Hydrolyse durch Zugabe von AnkX gestartet. Im 10-Minuten-Takt wurden Proben der Reaktion (0,1-0,5 nmol) über den Probengeber auf die C18 Säule injiziert und über die Absorption bei 254 nm analysiert. Die Temperatur im Probengeber betrug 15 °C. Als interner Standard war den Reaktionen Coffein in einem molaren Verhältnis von 1:1 zu CDP-Cholin zugesetzt.

Die Hydrolyse von CDP-Cholin wurde über die zeitabhängige Abnahme von CDP-Cholin analysiert. Die Menge an CDP-Cholin wurde auf den internen Standard Coffein normalisiert und gegen die Zeit aufgetragen. Durch eine lineare Anpassung des Startbereichs der erhaltenen Hydrolysekurven mit OriginPro wurde die Hydrolysegeschwindigkeit (v) in Abhängigkeit von der Ausgangsmenge an CDP-Cholin berechnet. Die Division von v durch die eingesetzte Enzymkonzentration (250 nM) lieferte die beobachtete Geschwindigkeitskonstante (k_{obs}), welche gegen die Ausgangsmenge an CDP-Cholin aufgetragen wurde. Durch eine Michaelis-Menten-Anpassung der erhaltenen Kurve mit OriginPro wurde die katalytische Konstante (k_{cat}) der Hydrolysereaktion und die Menge an CDP-Cholin bestimmt, bei der die halbmaximale Hydrolysegeschwindigkeit erreicht wird (K_M).

6.4.8 Analytische Bildung des AnkX_{Cys}:PC:Rab1b-Komplexes

Die Bildung des AnkX_{Cys}:PC:Rab1b-Komplexes wurde in allen Fällen über die Bandenverschiebung auf SDS-PAGE-Gelen analysiert und gegebenenfalls quantifiziert.

6.4.8.1 Direkter Ansatz

Um zu testen ob rekombinante AnkX-Varianten mit strategisch eingebrachten Cysteinen (AnkX_{Cys}) in der Lage sind, den AnkX_{Cys}:PC:Rab1b-Komplex im direkten Ansatz auszubilden, wurde AnkX_{Cys} (50 µM) mit einem thiolreaktiven CDP-Cholin-Analogon (1 mM) bei 20 °C über Nacht inkubiert. In den initialen Experimenten wurde das binäre Addukt zwischen AnkX_{Cys} und CDP-Cholin-Derivat nicht von überschüssigem Nukleotid befreit, sondern direkt mit Rab1b (100 µM) bei 20 °C über Nacht umgesetzt.

Bei weiteren Experimenten zur Optimierung des binären Ansatzes wurde das binäre Addukt zwischen AnkX_{Cys} und CDP-Cholin-Derivat durch Puffertausch mit Amicon Ultra 0,5 ml Zentrifugen-Filtereinheiten von überschüssigem Nukleotid befreit, bevor Rab1b zugegeben wurde. Auf diese Weise konnte im direkten Ansatz die Entstehung von unspezifischen AnkX_{Cys}:PC:Rab1b-Komplexen verhindert werden.

Um die Bildung des binären Addukts zu optimieren, wurde AnkX_{D265C} (50 µM) mit dem C3-Cl-Derivat bei unterschiedlichen Temperaturen (20 °C, 25 °C, 30 °C und 37 °C) inkubiert. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten (12 h, 24 h, 48 h und 72 h) wurden Proben von überschüssigem Nukleotid befreit und das aufgereinigte binäre Addukt (50 µM) mit Rab1b bei 20 °C über Nacht umgesetzt.

Um die Bildung des ternären Komplexes zu optimieren, wurde zunächst das binäre Addukt zwischen AnkX_{D265C} (50 µM) und dem C3-Cl-Derivat (1 mM) bei 37 °C für 48 h gebildet und von überschüssigem Nukleotid befreit. Danach wurde das aufgereinigte binäre Addukt (50 µM) mit Rab1b (100 µM) bei unterschiedlichen Temperaturen (20 °C, 25 °C, 30 °C und 37 °C) inkubiert. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten (2 h, 4 h, 6 h und 24 h) wurden Proben für die Analyse der ternären Komplexbildung genommen.

6.4.8.2 Indirekter Ansatz

Um zu testen ob die AnkX_{Cys}-Varianten in der Lage sind, den AnkX_{Cys}:PC:Rab1b-Komplex im indirekten Ansatz zu bilden, wurde Rab1b (50 µM) quantitativ mit einem thiolreaktiven CDP-Cholin-Analogon (1 mM) durch katalytische Mengen an AnkX_{WT} (100 nM) bei 20 °C über Nacht modifiziert. Überschüssiges Nukleotid wurde durch NAP5 Säulen laut Angaben des Herstellers abgetrennt. Anschließend wurde das aufgereinigte Rab1b-PC Konjugat (50 µM) mit AnkX_{Cys} (200 µM) bei 20 °C über Nacht inkubiert.

Für weitere Experimente zur Optimierung des indirekten Ansatzes sowie zur präparativen Herstellung des AnkX_{G108C}:PC:Rab1b:GDP-Komplexes wurde eine AnkX_{G108C}-Variante verwendet, in der die Cysteine C48_{AnkX}, C84_{AnkX} und C172_{AnkX} zu Serin mutiert waren. Um die ternäre Komplexbildung im indirekten Ansatz zu optimieren, wurde quantitativ modifiziertes Rab1b-PC-C3-CI (50 µM) mit AnkX_{G108C} bei 20 °C inkubiert. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten (1 h, 2 h, 4 h, 8 h, 24 h und 48 h) wurden Proben für die Analyse der ternären Komplexbildung genommen.

6.4.9 Analytische Größenausschlusschromatographie

Die analytische Größenausschluss-Chromatographie wurde im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt, um die Integrität des präparativ hergestellten AnkX_{G108C}:PC:Rab1b:GDP-Komplexes zu überprüfen. Dazu wurde der AnkX_{G108C}:PC:Rab1b:GDP-Komplex (110 ng) sowie eine Mischung aus AnkX_{G108C} (90 ng) und Rab1b (20 ng) unter Verwendung eines Shimadzu HPLC Systems mit einer Superdex 200 10/300 Säule analysiert.

6.4.10 Semi-quantitative Aktivitätstests

6.4.10.1 Western Blot-basierter Aktivitätstest von AnkX-Verkürzungsstrukturen

Um die Aktivität von C-terminalen AnkX-Verkürzungsstrukturen einschätzen zu können, wurden diese im kleinen Maßstab in *E. coli* überexprimiert. Anschließend wurden mit Hilfe des xTractor-Puffers Zellysate hergestellt. Rab1b (5 µM) wurde mit CDP-Cholin (1 mM) und *E. coli*-Zellysat (2 mg/ml) bei RT inkubiert. Nach 2 h sowie nach Inkubation über Nacht wurden Proben mit 2x SDS-Probenpuffer gequenchet und über Western Blot mit einem PC-Antikörper und einem sekundären HRP-gekoppelten Anti-Maus Antikörper auf die Menge an phosphocholinierem Rab1b analysiert. Die Menge an phosphocholinierem Rab1b wurde auf die Menge an autophosphocholinierter AnkX-Verkürzungsmutante normalisiert.

6.4.10.2 Massenspektrometrie-basierter Aktivitätstest von Rab1b-Alaninmutanten

Um die Aktivität von AnkX gegenüber unterschiedlichen Rab1b-Alaninmutanten einschätzen zu können, wurden die Mutanten im kleinen Maßstab in *E. coli* überexprimiert. Mit Hilfe des xTractor-Puffers wurden Zellysate hergestellt und die überexprimierten Rab1b-Alaninvarianten über den Strep-Tag durch den Einsatz von magnetischen Kügelchen aufgereinigt. Die aufgereinigten Rab1b-Alaninvarianten (1 µM) wurden mit CDP-Cholin (50 µM) und katalytischen Mengen an AnkX_{WT} (3,75 nM) für 1 h bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Reaktionen durch Zugabe von Acetonitril (1:1 (v)/(v)) gequenchet und der Grad der Phosphocholinierung über Massenspektrometrie bestimmt.

6.6 Zellbiologische Methoden

Alle zellbiologischen Experimente wurden in einer HERAsafe Sicherheitswerkbank mit sterilen Medien und Materialien durchgeführt.

6.6.1 Kultivierung von Cos-7-Zellen

Cos-7-Zellen wurden in Zellkulturschalen mit 10 ml Cos-7-Kulturmedium bei 5 % CO₂ und 37 °C inkubiert. Bei Erreichen einer Konfluenz von 70-90 % wurden die Zellen 1:5 (alle 2 Tage) oder 1:10 (alle 3 Tage) passagiert. Dazu wurde das alte Kulturmedium abgesaugt und die Zellen vorsichtig mit 10 ml Dulbecco's *Phosphate-Buffered Saline* (DPBS) gewaschen. Durch Zugabe von 1 ml Trypsin und Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ für 2 min wurden die Zellen von der Zellkulturplatte gelöst. Anschließend wurde die Trypsinierung durch Zugabe von 9 ml Kulturmedium gestoppt und die Zellen in frischem Kulturmedium durchmischt. In eine neue Zellkulturschale wurden 8 ml bzw. 9 ml Kulturmedium vorgelegt und 2 ml bzw. 1 ml der durchmischten Zellen übertragen (Passage von 1:5 bzw. 1:10).

6.6.2 Transiente Transfektion von Cos-7-Zellen

Für die vorübergehende Expression von HA-TITSSYYR-hY2R-eYFP in Cos-7-Zellen, wurden diese transient mit dem entsprechenden Plasmid transfiziert. Um die Zellen anschließend mittels Fluoreszenzmikroskopie analysieren zu können, wurden diese auf einem Objektträger mit acht Kulturkammern (*μ-Slide 8 Well*) kultiviert und transfiziert. Einen Tag vor der transienten Transfektion wurden Cos-7-Zellen während der Passage auf eine neue Zellkulturplatte in einer Zählkammer ausgezählt. Während der Passage wurde ein Teil der Zellen auf eine Konzentration von $5 \cdot 10^4$ Zellen/ml mit Kulturmedium verdünnt und die Kammern des Objektträgers mit 300 μ l Zellsuspension befüllt ($1,5 \cdot 10^4$ Zellen/Kammer). Der Objektträger wurde bei 37 °C und 5 % CO₂ über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag, wenn die Zellen auf dem Objektträger eine Konfluenz von 70-80 % erreicht hatten, wurden die Zellen mit dem Plasmid für HA-TITSSYYR-hY2R-eYFP mit Hilfe des Transfektionsreagenzes *Lipofectamine 3000* laut Angaben des Herstellers transient transfiziert. Dabei wurden pro Kulturkammer 100 ng Plasmid, 0,2 μ l *P3000 Reagent* und 0,3 μ l *Lipofectamine 3000* eingesetzt. Anschließend wurden die Objektträger bei 37 °C und 5 % CO₂ über Nacht inkubiert, um die transiente Expression des Rezeptors in den Cos-7-Zellen zu erlauben.

6.6.3 AnkX-vermittelte Markierung von Cos-7-Zellen *in vivo*

Nachdem der Rezeptor HA-TITSSYYR-hY2R-eYFP über Nacht transient in Cos-7-Zellen exprimiert worden war, wurden die Zellen mit Hilfe von AnkX markiert. Dazu wurde zunächst das Kulturmedium aus den Kammern des Objektträgers abpipettiert und die Zellen wurden mit

200 µl Kulturmedium mit 5 % BSA bei 37 °C und 5 % CO₂ für 5 min geblockt. Das Kulturmedium wurde abpipettiert und durch 200 µl Kulturmedium mit 1 % BSA ersetzt und die Komponenten für die Markierung zugegeben. Dabei wurden im Laufe der Arbeit unterschiedliche Konzentrationen an CDP-Cholin bzw. dem PEG₄-Sulfo-Cy5-Derivat (3-100 µM) und AnkX₁₋₈₀₀ bzw. AnkX₁₋₄₈₄ (62-2000 nM) eingesetzt. Nach Zugabe der Komponenten für die Markierung wurde der Objektträger bei 37 °C und 5 % CO₂ für 3 h inkubiert.

6.6.4 Fixierung und Immunfluoreszenzfärbung von Cos-7-Zellen

Nach der AnkX-vermittelten Markierung wurden die Cos-7-Zellen mit 3x 300 µl DPBS je Kammer gewaschen und anschließend mit 200 µl Formaldehyd (4 % (v)/(v)) in DPBS für 15 min fixiert. Nach der Fixierung wurden die Zellen erneut mit 3x 300 µl DPBS gewaschen und danach mit 200 µl DAPI in DPBS (1:10000) für 10 min inkubiert, um die Zellkerne anzufärben. Überschüssiges DAPI wurde durch drei Waschschriffe mit je 300 µl DPBS entfernt. Um die PC-Gruppe oder das HA-Epitop spezifisch anzufärben, wurden die Zellen einer Immunfluoreszenzfärbung mit einem PC- bzw. HA-Primärantikörper und einem entsprechenden Fluorophor-gekoppelten Sekundärantikörper unterzogen. Dazu wurden die fixierten Zellen zunächst mit dem Primärantikörper (1:1000) für 1 h bei RT inkubiert. Danach wurden die Zellen mit 3x 300 µl DPBS gewaschen mit dem Sekundärantikörper für 1 h bei RT. Dabei wurde für die PC-Färbung ein Alexa-Fluor-647-gekoppelter Anti-Maus-Antikörper (1:1000) und für die HA-Färbung ein Alexa-Fluor-568-gekoppelter Anti-Kaninchen-Antikörper (1:1500) verwendet. Anschließend wurden die Zellen mit 3x 300 µl DPBS gewaschen und mit zwei Tropfen Eindeckmedium versetzt, um die Fluoreszenzmikroskopie zu ermöglichen.

6.6.5 Fluoreszenzmikroskopie

Für die Fluoreszenzmikroskopie fixierter Cos-7-Zellen wurde das DMi8 Fluoreszenzmikroskop mit einem 63fachen Vergrößerungsobjektiv eingesetzt. Zur Anfertigung von Fluoreszenzaufnahmen wurden die in Tabelle 24 aufgelisteten Filter verwendet. Von analysierten Zellen wurde zusätzlich eine lichtmikroskopische DIK-Aufnahme angefertigt. Die Überlagerung fluoreszenter Aufnahmen wurde mit dem Bildverarbeitungsprogramm ImageJ durchgeführt.²²⁸

Tabelle 24 Bandpass (BP)-Filter für die Fluoreszenzmikroskopie.

Filter	Extinktion (BP)	Emission (BP)	Fluorophor	Farbe
DAPI	350/50	460/50	DAPI	Blau
YFP	500/520	535/30	eYFP, GFP	Grün
TXR	560/40	630/75	Cy5, Alexa-Fluor-647	Rot

6.7 Methoden der organischen Synthese

Die folgenden Synthesen zur Herstellung bioorthogonaler CDP-Cholin-Derivate wurden an der Universität Umeå unter Anleitung von Prof. Dr. Christian Hedberg und Dr. Philipp Ochtrup durchgeführt. Die Chemikalien für die Synthese wurden von Sigma Aldrich, Acros, Carbosynth oder Alfa Aesar bezogen und wurden, sofern nicht anders angegeben, ohne weitere Aufreinigung verwendet. HPLC-Aufreinigungen wurden mit einer 250 x 21,2 mm Luna 5 µm C18 Säule an einem 1260 Infinity System durchgeführt.

6.7.1 Synthese bioorthogonaler CDP-Cholin-Derivate mit C3-Linker

6.7.1.1 3-Bromopropan-Cholin

N,N-Dimethylethanolamin (1,1 g, 1,3 ml, 12,6 mmol) wurde mit 1,3-Dibromopropan (39,6 g, 20 ml, 196 mmol, 15,5 eq) unter konstantem Rühren über Nacht umgesetzt, wobei das Produkt 3-Bromopropan-Cholin präzipitierte. Das Produkt wurde durch Zugabe von ddH₂O (10 ml) in Lösung gebracht und die wässrige Phase mit eiskaltem Diethylether über einen Scheidetrichter extrahiert. Das Lösemittel wurde mit einem Rotationsverdampfer evaporiert, so dass das Produkt 3-Bromopropan-Cholin als weißer Feststoff zurückblieb (3,3 g, 11,3 mmol, 91 %).

6.7.1.2 3-Azidopropan-Cholin (Bromidsalz)

3-Bromopropan-Cholin (2,0 g, 6,9 mmol) wurde in Dimethylformamid (DMF) gelöst (20 ml) und unter Rühren mit NaN₃ (0,9 g, 13,7 mmol, 2 eq) versetzt. Danach wurde die Reaktion auf 70 °C erhitzt und über Nacht gerührt. Am nächsten Tag wurde die gebildete Suspension auf RT abgekühlt und filtriert. Das Filtrat wurde mit einem Rotationsverdampfer eingeeengt. Anschließend wurde mit Toluol co-evaporiert (3x 5 ml), um das Lösemittel DMF vollständig zu entfernen. Abschließende Trocknung im Hochvakuum lieferte das Produkt 3-Azidopropan-Cholin als gelben Feststoff (1,5 g, 5,9 mmol, 86 %).

6.7.1.3 3-Azidopropan-Phosphocholin

POCl_3 (472 mg, 3 mmol, 1,3 eq) wurde unter Argonatmosphäre in trockenem Acetonitril (8 ml) gelöst und mit einem Eisbad gekühlt, bevor 2,6-Lutidin (1,0 g, 9,5 mmol, 4 eq) unter Rühren zugegeben wurde. 3-Azidopropan-Cholin (600 mg, 2,4 mmol) wurde in trockenem Acetonitril (2 ml) gelöst und tropfenweise zur gekühlten Reaktionslösung zugegeben. Die Reaktion wurde für 30 min auf Eis gerührt und anschließend mit eiskaltem ddH_2O (5 ml) gequench. Das Lösemittel Acetonitril wurde mit einem Rotationsverdampfer evaporiert und die zurückgebliebene wässrige Lösung mit $\text{Ca}(\text{OH})_2$ auf pH 13-14 eingestellt. Die entstandene Suspension wurde filtriert, um die ausgefallenen Salze zu entfernen. Mit einem Rotationsverdampfer wurden 2,6-Lutidin und ddH_2O evaporiert, wodurch das Produkt 3-Azidopropan-Phosphocholin als gelbes Öl zurückblieb (369 mg, 1,46 mmol, 61 %).

6.7.1.4 3-Azidopropan-CDP-Cholin (CDP-Cholin-C3-Azid)

3-Azidopropan-Phosphocholin (117 mg, 464 μmol) und Cytidin-5'-phosphomorpholidate-4-morpholin-N,N'-dicyclohexylcarboxamidin (635 mg, 928 μmol , 2 eq) wurden in Benzol (6 ml) gelöst und anschließend mit flüssigem Stickstoff gefroren und lyophilisiert, um alle Spuren von ddH_2O zu entfernen. Die getrockneten Substanzen wurden unter Argonatmosphäre in trockenem Pyridin (6 ml) gelöst. Parallel wurde 1H-Tetrazol (64 mg, 928 μM , 2eq), welches in trockenem Acetonitril (2,1 ml, 0,45 M) gelöst war, mit einem Rotationsverdampfer vollständig getrocknet. Anschließend wurde das getrocknete 1H-Tetrazol in Pyridin (2 ml) gelöst und unter Argonatmosphäre tropfenweise zum Reaktionsgemisch gegeben. Die Reaktion wurde unter Argonatmosphäre bei 60 °C über Nacht gerührt. Das Lösemittel wurde mit einem Rotationsverdampfer entfernt und das Produkt 3-Azidopropan-CDP-Cholin mittels HPLC aufgereinigt (133 mg, 239 μmol , 52 %)

6.7.1.5 3-Aminopropan-CDP-Cholin

Pd/C (20 mg) wurde unter Argonatmosphäre in Methanol (MeOH) (4 ml) aufgenommen. 3-Azidopropan-CDP-Cholin (133 mg, 239 μmol) wurde in $\text{MeOH}/\text{ddH}_2\text{O}$ (2 ml, 1:1 (v)/(v)) gelöst und unter Rühren zum Reaktionsgemisch zugegeben. Die Reaktion wurde unter Wasserstoffatmosphäre für 4 h bei RT gerührt. Anschließend wurde die Suspension über Kieselgur filtriert und mehrmals mit MeOH gewaschen. Das Filtrat wurde mit einem Rotationsverdampfer vom Lösemittel MeOH befreit, so dass das Produkt 3-Aminopropan-CDP-Cholin als farbloser Feststoff entstand (68 mg, 124 μmol , 54 %)

6.7.1.6 CDP-Cholin-C3-DBCO/TCO/Tetrazin

3-Aminopropan-CDP-Cholin wurde in gesättigter wässriger NaHCO_3 -Lösung (50 μl pro mg CDP-Cholin) gelöst, während der entsprechende NHS-Ester (DBCO-NHS, TCO-NHS oder Tetrazin-NHS) in DMF (0,5 ml) gelöst und unter Rühren zur Reaktionslösung gegeben wurde. Nachdem die Reaktion 30 min gerührt worden war, wurden die Lösemittel mit einem Rotationsverdampfer entfernt und das Produkt über Umkehrphasen-Chromatographie mit einer Sep-Pak C18 Säule aufgereinigt. Auf diese Weise wurden CDP-Cholin-C3-DBCO (weißer Feststoff, 16,8 mg, 21 %), CDP-Cholin-C3-TCO (weißer Feststoff, 7,8 mg, 34 %) und CDP-Cholin-C3-Tetrazin (roter Feststoff, 5,9 mg, 25 %) erhalten.

6.7.2 Synthese bioorthogonaler CDP-Cholin-Derivate mit PEG₄-Linker

6.7.2.1 Cbz-Amino-PEG₄-Cholin (Bromidsalz)

1-Bromo-Carboxybenzyl (Cbz)-Amino-PEG₄ (1,0 g, 2,6 mmol) wurde im Hochvakuum getrocknet und mit N,N-Dimethylethanolamin (2,3 g, 2,6 ml, 26 mmol, 10 eq) unter konstantem Rühren über Nacht umgesetzt. Anschließend wurde die Reaktion mit DMF (5 ml) versetzt und das Lösemittel mit einem Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wurde in Flüssigstickstoff eingefroren und lyophilisiert, so dass das Produkt Cbz-Amino-PEG₄-Cholin als gelbes Öl entstand (1,2 g, 2,5 mmol, 98 %).

6.7.2.2 Cbz-Amino-PEG₄-Phosphocholin

POCl_3 (574 mg, 3,8 mmol, 1,5 eq) wurde unter Argonatmosphäre in trockenem Acetonitril (5 ml) gelöst und mit einem Eisbad gekühlt, bevor 2,6-Lutidin (1,2 g, 11,3 mmol, 4,5 eq) unter Rühren zugegeben wurde. Cbz-Amino-PEG₄-Cholin (1,2 g, 2,5 mmol) wurde in trockenem Acetonitril (5 ml) gelöst und tropfenweise zur gekühlten Reaktionslösung zugegeben. Die Reaktion wurde für 30 min auf Eis gerührt und anschließend mit eiskaltem ddH_2O (5 ml) gequenchet. Das Lösemittel Acetonitril wurde mit einem Rotationsverdampfer evaporiert und die zurückgebliebene wässrige Lösung mit $\text{Ca}(\text{OH})_2$ auf pH 13-14 eingestellt. Die entstandene Suspension wurde filtriert, um die ausgefallenen Salze zu entfernen. Mit einem Rotationsverdampfer wurden 2,6-Lutidin und ddH_2O evaporiert, wodurch das Produkt Cbz-Amino-PEG₄-Phosphocholin als farbloses Öl zurückblieb (370 mg, 775 μmol , 31 %).

6.7.2.3 CDP-Cholin-PEG₄-Cbz-Amin

Cbz-Amino-PEG₄-Phosphocholin (91 mg, 190 μmol) und Cytidin-5'-phosphomorpholidate-4-morpholin-N,N'-dicyclohexylcarboxamidin (260 mg, 380 μmol , 2 eq) wurden in Benzol (6 ml) gelöst und anschließend mit flüssigem Stickstoff gefroren und lyophilisiert, um alle Spuren von

ddH₂O zu entfernen. Die getrockneten Substanzen wurden unter Argonatmosphäre in trockenem Pyridin (6 ml) gelöst. Parallel wurde 1H-Tetrazol (64 mg, 928 µM, 2eq), welches in trockenem Acetonitril (1,3 ml, 0,45 M) gelöst war, mit einem Rotationsverdampfer vollständig getrocknet. Anschließend wurde das getrocknete 1H-Tetrazol in Pyridin (1 ml) gelöst und unter Argonatmosphäre tropfenweise zum Reaktionsgemisch gegeben. Die Reaktion wurde unter Argonatmosphäre bei 60 °C über Nacht gerührt. Das Lösemittel wurde mit einem Rotationsverdampfer entfernt und das Produkt CDP-Cholin-PEG₄-Cbz-Amin mittels HPLC aufgereinigt (50 mg, 65 µmol, 34 %)

6.7.2. CDP-Cholin-PEG₄-Amin

Pd/C (10 mg) wurde unter Argonatmosphäre in MeOH (4 ml) aufgenommen. CDP-Cholin-PEG₄-Cbz-Amin (51 mg, 65 µmol) wurde in MeOH (2 ml) gelöst und unter Rühren zum Reaktionsgemisch zugegeben. Die Reaktion wurde unter Wasserstoffatmosphäre für 4 h bei RT gerührt. Anschließend wurde die Suspension über Kieselgur filtriert und mehrmals mit MeOH gewaschen. Das Filtrat wurde mit einem Rotationsverdampfer vom Lösemittel MeOH befreit, so dass das Produkt CDP-Cholin-PEG₄-Amin als farbloser Feststoff entstand (38 mg, 58 µmol, 90 %)

6.7.2.5 CDP-Cholin-PEG₄-DBCO/TCO/Tetrazin

CDP-Cholin-PEG₄-Amin wurde in gesättigter wässriger NaHCO₃-Lösung (50 µl pro mg CDP-Cholin) gelöst, während der entsprechende NHS-Ester (DBCO-NHS, TCO-NHS oder Tetrazin-NHS) in DMF (0,5 ml) gelöst und unter Rühren zur Reaktionslösung gegeben wurde. Nachdem die Reaktion 30 min gerührt worden war, wurden die Lösemittel mit einem Rotationsverdampfer entfernt und das Produkt über Umkehrphasen-Chromatographie mit einer Sep-Pak C18 Säule aufgereinigt. Auf diese Weise wurden CDP-Cholin-PEG₄-DBCO (weißer Feststoff, 9,7 mg, 59 %), CDP-Cholin-PEG₄-TCO (weißer Feststoff, 6,8 mg, 48 %) und CDP-Cholin-PEG₄-Tetrazin (roter Feststoff, 5,1 mg, 35 %) erhalten.

Literaturverzeichnis

1. Omotade, T. O., & Roy, C. R. (2019): Manipulation of Host Cell Organelles by Intracellular Pathogens, *Microbiology spectrum*, 7(2), 1-18.
2. Rowbotham, T. J. (1980): Preliminary report on the pathogenicity of Legionella pneumophila for freshwater and soil amoebae, *Journal of clinical pathology*, 33(12), 1179-1183.
3. Horwitz, M. A., & Silverstein, S. C. (1980): Legionnaires' disease bacterium (Legionella pneumophila) multiplies intracellularly in human monocytes, *Journal of clinical investigation*, 66(3), 441-450.
4. Clemens, D. L., Lee, B.-Y., & Horwitz, M. A. (2000): Deviant expression of Rab5 on phagosomes containing the intracellular pathogens Mycobacterium tuberculosis and Legionella pneumophila is associated with altered phagosomal fate, *Infection and immunity*, 68(5), 2671-2684.
5. Segal, G., & Shuman, H. A. (1999): Legionella pneumophila utilizes the same genes to multiply within Acanthamoeba castellanii and human macrophages, *Infection and immunity*, 67(5), 2117-2124.
6. Berger, K. H., & Isberg, R. R. (1993): Two distinct defects in intracellular growth complemented by a single genetic locus in Legionella pneumophila, *Molecular microbiology*, 7(1), 7-19.
7. Luo, Z.-Q., & Isberg, R. R. (2004): Multiple substrates of the Legionella pneumophila Dot/Icm system identified by interbacterial protein transfer, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(3), 841-846.
8. Isberg, R. R., O'connor, T. J., & Heidtman, M. (2009): The Legionella pneumophila replication vacuole: making a cosy niche inside host cells, *Nature reviews microbiology*, 7(1), 13-24.
9. Kagan, J. C., & Roy, C. R. (2002): Legionella phagosomes intercept vesicular traffic from endoplasmic reticulum exit sites, *Nature cell biology*, 4(12), 945-954.
10. Tilney, L. G., Harb, O. S., Connelly, P. S., Robinson, C. G., & Roy, C. R. (2001): How the parasitic bacterium Legionella pneumophila modifies its phagosome and transforms it into rough ER: implications for conversion of plasma membrane to the ER membrane, *Journal of Cell Science*, 114(24), 4637-4650.
11. Cossart, P., & Roy, C. R. (2010): Manipulation of host membrane machinery by bacterial pathogens, *Current opinion in cell biology*, 22(4), 547-554.
12. Kagan, J. C., Stein, M.-P., Pypaert, M., & Roy, C. R. (2004): Legionella subvert the functions of Rab1 and Sec22b to create a replicative organelle, *Journal of Experimental Medicine*, 199(9), 1201-1211.
13. Plutner, H., Cox, A. D., Pind, S., Khosravi-Far, R., Bourne, J. R., Schwaninger, R., Der, C. J., & Balch, W. E. (1991): Rab1b regulates vesicular transport between the endoplasmic reticulum and successive Golgi compartments, *Journal of cell biology*, 115(1), 31-43.
14. Colicelli, J. (2004): Human RAS superfamily proteins and related GTPases, *Science signaling*, 2004(250), 1-31.
15. Calero, M., Chen, C. Z., Zhu, W., Winand, N., Havas, K. A., Gilbert, P. M., Burd, C. G., & Collins, R. N. (2003): Dual prenylation is required for Rab protein localization and function, *Molecular biology of the cell*, 14(5), 1852-1867.
16. Pylypenko, O., Rak, A., Durek, T., Kushnir, S., Dursina, B. E., Thomae, N. H., Constantinescu, A. T., Brunsveld, L., Watzke, A., & Waldmann, H. (2006): Structure of doubly prenylated Ypt1:GDI complex and the mechanism of GDI-mediated Rab recycling, *EMBO journal*, 25(1), 13-23.
17. Araki, S., Kikuchi, A., Hata, Y., Isomura, M., & Takai, Y. (1990): Regulation of reversible binding of smg p25A, a ras p21-like GTP-binding protein, to synaptic plasma membranes and vesicles by its specific regulatory protein, GDP dissociation inhibitor, *Journal of biological chemistry*, 265(22), 13007-13015.
18. Cherfils, J., & Zeghouf, M. (2013): Regulation of small GTPases by GEFs, GAPs, and GDIs, *Physiological reviews*, 93(1), 269-309.
19. Mizuno-Yamasaki, E., Rivera-Molina, F., & Novick, P. (2012): GTPase networks in membrane traffic, *Annual review of biochemistry*, 81(1), 637-659.

20. Wittinghofer, A., & Vetter, I. R. (2011): Structure-function relationships of the G domain, a canonical switch motif, *Annual review of biochemistry*, 80(1), 943-971.
21. Vetter, I. R., & Wittinghofer, A. (2001): The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions, *Science*, 294(5545), 1299-1304.
22. Pylypenko, O., Hammich, H., Yu, I.-M., & Houdusse, A. (2018): Rab GTPases and their interacting protein partners: structural insights into Rab functional diversity, *Small GTPases*, 9(1-2), 22-48.
23. Cheng, W., Yin, K., Lu, D., Li, B., Zhu, D., Chen, Y., Zhang, H., Xu, S., Chai, J., & Gu, L. (2012): Structural insights into a unique Legionella pneumophila effector LidA recognizing both GDP and GTP bound Rab1 in their active state, *Public Library of Science pathogens*, 8(3), 1-12.
24. Derré, I., & Isberg, R. R. (2004): Legionella pneumophila replication vacuole formation involves rapid recruitment of proteins of the early secretory system, *Infection and immunity*, 72(5), 3048-3053.
25. Machner, M. P., & Isberg, R. R. (2006): Targeting of host Rab GTPase function by the intravacuolar pathogen Legionella pneumophila, *Developmental cell*, 11(1), 47-56.
26. Murata, T., Delprato, A., Ingmundson, A., Toomre, D. K., Lambright, D. G., & Roy, C. R. (2006): The Legionella pneumophila effector protein DrrA is a Rab1 guanine nucleotide-exchange factor, *Nature cell biology*, 8(9), 971-977.
27. Brombacher, E., Urwyler, S., Ragaz, C., Weber, S. S., Kami, K., Overduin, M., & Hilbi, H. (2009): Rab1 guanine nucleotide exchange factor SidM is a major phosphatidylinositol 4-phosphate-binding effector protein of Legionella pneumophila, *Journal of biological chemistry*, 284(8), 4846-4856.
28. Schoebel, S., Oesterlin, L. K., Blankenfeldt, W., Goody, R. S., & Itzen, A. (2009): RabGDI displacement by DrrA from Legionella is a consequence of its guanine nucleotide exchange activity, *Molecular cell*, 36(6), 1060-1072.
29. Müller, M. P., Peters, H., Blümer, J., Blankenfeldt, W., Goody, R. S., & Itzen, A. (2010): The Legionella effector protein DrrA AMPylates the membrane traffic regulator Rab1b, *Science*, 329(5994), 946-949.
30. Mukherjee, S., Liu, X., Arasaki, K., McDonough, J., Galán, J. E., & Roy, C. R. (2011): Modulation of Rab GTPase function by a protein phosphocholine transferase, *Nature*, 477(7362), 103-106.
31. Goody, P. R., Heller, K., Oesterlin, L. K., Müller, M. P., Itzen, A., & Goody, R. S. (2012): Reversible phosphocholination of Rab proteins by Legionella pneumophila effector proteins, *EMBO journal*, 31(7), 1774-1784.
32. Tan, Y., & Luo, Z.-Q. (2011): Legionella pneumophila SidD is a deAMPylase that modifies Rab1, *Nature*, 475(7357), 506-509.
33. Ingmundson, A., Delprato, A., Lambright, D. G., & Roy, C. R. (2007): Legionella pneumophila proteins that regulate Rab1 membrane cycling, *Nature*, 450(7168), 365-369.
34. Kouranti, I., Sachse, M., Arouche, N., Goud, B., & Echard, A. (2006): Rab35 regulates an endocytic recycling pathway essential for the terminal steps of cytokinesis, *Current biology*, 16(17), 1719-1725.
35. Allgood, S. C., Romero Dueñas, B. P., Noll, R. R., Pike, C., Lein, S., & Neunuebel, M. R. (2017): Legionella effector AnkX disrupts host cell endocytic recycling in a phosphocholination-dependent manner, *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 7(397), 1-13.
36. Gavriljuk, K., Schartner, J., Seidel, H., Dickhut, C., Zahedi, R. P., Hedberg, C., Kötting, C., & Gerwert, K. (2016): Unraveling the phosphocholination mechanism of the Legionella pneumophila enzyme AnkX, *Biochemistry*, 55(31), 4375-4385.
37. Pan, X., Lührmann, A., Satoh, A., Laskowski-Arce, M. A., & Roy, C. R. (2008): Ankyrin repeat proteins comprise a diverse family of bacterial type IV effectors, *Science*, 320(5883), 1651-1654.
38. Campanacci, V., Mukherjee, S., Roy, C. R., & Cherfils, J. (2013): Structure of the Legionella effector AnkX reveals the mechanism of phosphocholine transfer by the FIC domain, *EMBO journal*, 32(10), 1469-1477.

39. Li, J., Mahajan, A., & Tsai, M.-D. (2006): Ankyrin repeat: a unique motif mediating protein-protein interactions, *Biochemistry*, 45(51), 15168-15178.
40. Xiao, J., Worby, C. A., Mattoo, S., Sankaran, B., & Dixon, J. E. (2010): Structural basis of Fic-mediated adenylation, *Nature structural & molecular biology*, 17(8), 1004-1010.
41. Heller, K., Ochtrop, P., Albers, M. F., Zauner, F. B., Itzen, A., & Hedberg, C. (2015): Covalent protein labeling by enzymatic phosphocholination, *Angewandte Chemie international edition*, 54(35), 10327-10330.
42. Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. W., & Prasher, D. C. (1994): Green fluorescent protein as a marker for gene expression, *Science*, 263(5148), 802-805.
43. Keppler, A., Pick, H., Arrivoli, C., Vogel, H., & Johnsson, K. (2004): Labeling of fusion proteins with synthetic fluorophores in live cells, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(27), 9955-9959.
44. Maurel, D., Comps-Agrar, L., Brock, C., Rives, M.-L., Bourrier, E., Ayoub, M. A., Bazin, H., Tinel, N., Durroux, T., & Prézeau, L. (2008): Cell-surface protein-protein interaction analysis with time-resolved FRET and snap-tag technologies: application to GPCR oligomerization, *Nature methods*, 5(6), 561-567.
45. Yang, A., Ha, S., Ahn, J., Kim, R., Kim, S., Lee, Y., Kim, J., Söll, D., Lee, H.-Y., & Park, H.-S. (2016): A chemical biology route to site-specific authentic protein modifications, *Science*, 354(6312), 623-626.
46. Brustad, E. M., Lemke, E. A., Schultz, P. G., & Deniz, A. A. (2008): A general and efficient method for the site-specific dual-labeling of proteins for single molecule fluorescence resonance energy transfer, *Journal of the American Chemical Society of the United States of America*, 130(52), 17664-17665.
47. Beck, A., Goetsch, L., Dumontet, C., & Corvaia, N. (2017): Strategies and challenges for the next generation of antibody-drug conjugates, *Nature reviews drug discovery*, 16(5), 315-337.
48. Van Dongen, G. A., Visser, G. W., Lub-de Hooge, M. N., De Vries, E. G., & Perk, L. R. (2007): Immuno-PET: a navigator in monoclonal antibody development and applications, *The oncologist*, 12(12), 1379-1389.
49. Datta, S., Christena, L. R., & Rajaram, Y. R. S. (2013): Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials, *3 Biotech*, 3(1), 1-9.
50. Ibraheem, A., & Campbell, R. E. (2010): Designs and applications of fluorescent protein-based biosensors, *Current opinion in chemical biology*, 14(1), 30-36.
51. Sutandy, F. R., Qian, J., Chen, C. S., & Zhu, H. (2013): Overview of protein microarrays, *Current protocols in protein science*, 72(1), 1-21.
52. Zhang, Y., Park, K.-Y., Suazo, K. F., & Distefano, M. D. (2018): Recent progress in enzymatic protein labelling techniques and their applications, *Chemical Society Reviews*, 47(24), 9106-9136.
53. Gunnoo, S. B., & Madder, A. (2016): Chemical protein modification through cysteine, *ChemBioChem*, 17(7), 529-553.
54. Valkevich, E. M., Guenette, R. G., Sanchez, N. A., Chen, Y.-C., Ge, Y., & Strieter, E. R. (2012): Forging isopeptide bonds using thiol-ene chemistry: site-specific coupling of ubiquitin molecules for studying the activity of isopeptidases, *Journal of the American Chemical Society of the United States of America*, 134(16), 6916-6919.
55. Conte, M. L., Staderini, S., Marra, A., Sanchez-Navarro, M., Davis, B. G., & Dondoni, A. (2011): Multi-molecule reaction of serum albumin can occur through thiol-yne coupling, *Chemical communications*, 47(39), 11086-11088.
56. Kalkhof, S., & Sinz, A. (2008): Chances and pitfalls of chemical cross-linking with amine-reactive N-hydroxysuccinimide esters, *Analytical and bioanalytical chemistry*, 392(1-2), 305-312.
57. Nakamura, T., Kawai, Y., Kitamoto, N., Osawa, T., & Kato, Y. (2009): Covalent modification of lysine residues by allyl isothiocyanate in physiological conditions: plausible transformation of isothiocyanate from thiol to amine, *Chemical research in toxicology*, 22(3), 536-542.
58. Yu, Y., Zhang, L.-K., Buevich, A. V., Li, G., Tang, H., Vachal, P., Colletti, S. L., & Shi, Z.-C. (2018): Chemoselective peptide modification via photocatalytic tryptophan β -

- position conjugation, *Journal of the American Chemical Society of the United States of America*, 140(22), 6797-6800.
59. Lin, S., Yang, X., Jia, S., Weeks, A. M., Hornsby, M., Lee, P. S., Nichiporuk, R. V., Iavarone, A. T., Wells, J. A., & Toste, F. D. (2017): Redox-based reagents for chemoselective methionine bioconjugation, *Science*, 355(6325), 597-602.
 60. Wendeler, M., Grinberg, L., Wang, X., Dawson, P. E., & Baca, M. (2013): Enhanced catalysis of oxime-based bioconjugations by substituted anilines, *Bioconjugate chemistry*, 25(1), 93-101.
 61. Crisalli, P., & Kool, E. T. (2013): Water-soluble organocatalysts for hydrazone and oxime formation, *The Journal of organic chemistry*, 78(3), 1184-1189.
 62. Nauman, D. A., & Bertozzi, C. R. (2001): Kinetic parameters for small-molecule drug delivery by covalent cell surface targeting, *Biochimica et biophysica acta - general subjects*, 1568(2), 147-154.
 63. Agarwal, P., Kudirka, R., Albers, A. E., Barfield, R. M., de Hart, G. W., Drake, P. M., Jones, L. C., & Rabuka, D. (2013): Hydrazino-Pictet-Spengler ligation as a biocompatible method for the generation of stable protein conjugates, *Bioconjugate chemistry*, 24(6), 846-851.
 64. Prescher, J. A., & Bertozzi, C. R. (2005): Chemistry in living systems, *Nature chemical biology*, 1(1), 13-21.
 65. Ramil, C. P., & Lin, Q. (2013): Bioorthogonal chemistry: strategies and recent developments, *Chemical communications*, 49(94), 11007-11022.
 66. Agarwal, P., van der Weijden, J., Sletten, E. M., Rabuka, D., & Bertozzi, C. R. (2013): A Pictet-Spengler ligation for protein chemical modification, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(1), 46-51.
 67. Kudirka, R., Barfield, R. M., McFarland, J., Albers, A. E., de Hart, G. W., Drake, P. M., Holder, P. G., Banas, S., Jones, L. C., & Garofalo, A. W. (2015): Generating site-specifically modified proteins via a versatile and stable nucleophilic carbon ligation, *Chemistry & biology*, 22(2), 293-298.
 68. Saxon, E., & Bertozzi, C. R. (2000): Cell surface engineering by a modified Staudinger reaction, *Science*, 287(5460), 2007-2010.
 69. Nilsson, B. L., Kiessling, L. L., & Raines, R. T. (2000): Staudinger ligation: a peptide from a thioester and azide, *Organic letters*, 2(13), 1939-1941.
 70. Saxon, E., Armstrong, J. I., & Bertozzi, C. R. (2000): A "traceless" Staudinger ligation for the chemoselective synthesis of amide bonds, *Organic letters*, 2(14), 2141-2143.
 71. Lin, F. L., Hoyt, H. M., van Halbeek, H., Bergman, R. G., & Bertozzi, C. R. (2005): Mechanistic investigation of the Staudinger ligation, *Journal of the American Chemical Society*, 127(8), 2686-2695.
 72. Hangauer, M. J., & Bertozzi, C. R. (2008): A FRET-based fluorogenic phosphine for live-cell imaging with the Staudinger ligation, *Angewandte Chemie international edition*, 47(13), 2394-2397.
 73. Rostovtsev, V. V., Green, L. G., Fokin, V. V., & Sharpless, K. B. (2002): A stepwise Huisgen cycloaddition process: copper (I)-catalyzed regioselective "ligation" of azides and terminal alkynes, *Angewandte Chemie international edition*, 41(14), 2596-2599.
 74. Tornøe, C. W., Christensen, C., & Meldal, M. (2002): Peptidotriazoles on solid phase: [1,2,3]-triazoles by regioselective copper (I)-catalyzed 1,3-dipolar cycloadditions of terminal alkynes to azides, *The Journal of organic chemistry*, 67(9), 3057-3064.
 75. Presolski, S. I., Hong, V., Cho, S.-H., & Finn, M. (2010): Tailored ligand acceleration of the Cu-catalyzed azide-alkyne cycloaddition reaction: Practical and mechanistic implications, *Journal of the American Chemical Society of the United States of America*, 132(41), 14570-14576.
 76. Hong, V., Steinmetz, N. F., Manchester, M., & Finn, M. (2010): Labeling live cells by copper-catalyzed alkyne-azide click chemistry, *Bioconjugate chemistry*, 21(10), 1912-1916.
 77. Rodionov, V. O., Presolski, S. I., Díaz Díaz, D., Fokin, V. V., & Finn, M. (2007): Ligand-accelerated Cu-catalyzed azide-alkyne cycloaddition: A mechanistic report, *Journal of the American Chemical Society of the United States of America*, 129(42), 12705-12712.

78. Besanceney-Webler, C., Jiang, H., Zheng, T., Feng, L., Soriano del Amo, D., Wang, W., Klivansky, L. M., Marlow, F. L., Liu, Y., & Wu, P. (2011): Increasing the efficacy of bioorthogonal click reactions for bioconjugation: a comparative study, *Angewandte Chemie international edition*, 50(35), 8051-8056.
79. Soriano del Amo, D., Wang, W., Jiang, H., Besanceney, C., Yan, A. C., Levy, M., Liu, Y., Marlow, F. L., & Wu, P. (2010): Biocompatible copper (I) catalysts for in vivo imaging of glycans, *Journal of the American Chemical Society of the United States of America*, 132(47), 16893-16899.
80. Hong, V., Presolski, S. I., Ma, C., & Finn, M. (2009): Analysis and optimization of copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition for bioconjugation, *Angewandte Chemie international edition*, 48(52), 9879-9883.
81. Kennedy, D. C., McKay, C. S., Legault, M. C., Danielson, D. C., Blake, J. A., Pegoraro, A. F., Stolow, A., Mester, Z., & Pezacki, J. P. (2011): Cellular consequences of copper complexes used to catalyze bioorthogonal click reactions, *Journal of the American Chemical Society of the United States of America*, 133(44), 17993-18001.
82. Chan, T. R., Hilgraf, R., Sharpless, K. B., & Fokin, V. V. (2004): Polytriazoles as copper (I)-stabilizing ligands in catalysis, *Organic letters*, 6(17), 2853-2855.
83. Shieh, P., Hangauer, M. J., & Bertozzi, C. R. (2012): Fluorogenic azidofluoresceins for biological imaging, *Journal of the American Chemical Society of the United States of America*, 134(42), 17428-17431.
84. Sivakumar, K., Xie, F., Cash, B. M., Long, S., Barnhill, H. N., & Wang, Q. (2004): A fluorogenic 1,3-dipolar cycloaddition reaction of 3-azidocoumarins and acetylenes, *Organic letters*, 6(24), 4603-4606.
85. Xie, F., Sivakumar, K., Zeng, Q., Bruckman, M. A., Hodges, B., & Wang, Q. (2008): A fluorogenic 'click' reaction of azidoanthracene derivatives, *Tetrahedron*, 64(13), 2906-2914.
86. Wang, Q., Chan, T. R., Hilgraf, R., Fokin, V. V., Sharpless, K. B., & Finn, M. (2003): Bioconjugation by copper (I)-catalyzed azide-alkyne [3 + 2] cycloaddition, *Journal of the American Chemical Society of the United States of America*, 125(11), 3192-3193.
87. Deiters, A., Cropp, T. A., Mukherji, M., Chin, J. W., Anderson, J. C., & Schultz, P. G. (2003): Adding amino acids with novel reactivity to the genetic code of *Saccharomyces cerevisiae*, *Journal of the American Chemical Society*, 125(39), 11782-11783.
88. Beatty, K. E., Xie, F., Wang, Q., & Tirrell, D. A. (2005): Selective dye-labeling of newly synthesized proteins in bacterial cells, *Journal of the American Chemical Society*, 127(41), 14150-14151.
89. Agard, N. J., Prescher, J. A., & Bertozzi, C. R. (2004): A strain-promoted [3 + 2] azide-alkyne cycloaddition for covalent modification of biomolecules in living systems *Journal of the American Chemical Society*, 126(46), 15046-15047.
90. Agard, N. J., Baskin, J. M., Prescher, J. A., Lo, A., & Bertozzi, C. R. (2006): A comparative study of bioorthogonal reactions with azides, *American Chemical Society chemical biology*, 1(10), 644-648.
91. Baskin, J. M., Prescher, J. A., Laughlin, S. T., Agard, N. J., Chang, P. V., Miller, I. A., Lo, A., Codelli, J. A., & Bertozzi, C. R. (2007): Copper-free click chemistry for dynamic in vivo imaging, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(43), 16793-16797.
92. Jewett, J. C., Sletten, E. M., & Bertozzi, C. R. (2010): Rapid Cu-free click chemistry with readily synthesized biarylazacyclooctynones, *Journal of the American Chemical Society*, 132(11), 3688-3690.
93. Medina, J. M., McMahon, T. C., Jiménez-Osés, G., Houk, K., & Garg, N. K. (2014): Cycloadditions of cyclohexynes and cyclopentyne, *Journal of the American Chemical Society*, 136(42), 14706-14709.
94. Ning, X., Guo, J., Wolfert, M. A., & Boons, G. J. (2008): Visualizing metabolically labeled glycoconjugates of living cells by copper-free and fast Huisgen cycloadditions, *Angewandte Chemie international edition*, 47(12), 2253-2255.
95. Plass, T., Milles, S., Koehler, C., Schultz, C., & Lemke, E. A. (2011): Genetically encoded copper-free click chemistry, *Angewandte Chemie international edition*, 50(17), 3878-3881.

96. van Geel, R., Pruijn, G. J., van Delft, F. L., & Boelens, W. C. (2012): Preventing thiol-yne addition improves the specificity of strain-promoted azide-alkyne cycloaddition, *Bioconjugate chemistry*, 23(3), 392-398.
97. Belardi, B., de la Zerda, A., Spiciarich, D. R., Maund, S. L., Peehl, D. M., & Bertozzi, C. R. (2013): Imaging the glycosylation state of cell surface glycoproteins by two-photon fluorescence lifetime imaging microscopy, *Angewandte Chemie international edition*, 52(52), 14045-14049.
98. Laughlin, S. T., & Bertozzi, C. R. (2009): In vivo imaging of *Caenorhabditis elegans* glycans, *American Chemical Society chemical biology*, 4(12), 1068-1072.
99. Dehnert, K. W., Baskin, J. M., Laughlin, S. T., Beahm, B. J., Naidu, N. N., Amacher, S. L., & Bertozzi, C. R. (2012): Imaging the sialome during zebrafish development with copper-free click chemistry, *ChemBioChem*, 13(3), 353-357.
100. Chang, P. V., Prescher, J. A., Sletten, E. M., Baskin, J. M., Miller, I. A., Agard, N. J., Lo, A., & Bertozzi, C. R. (2010): Copper-free click chemistry in living animals, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(5), 1821-1826.
101. Chen, X., & Wu, Y.-W. (2016): Selective chemical labeling of proteins, *Organic & biomolecular chemistry*, 14(24), 5417-5439.
102. Blackman, M. L., Royzen, M., & Fox, J. M. (2008): Tetrazine ligation: fast bioconjugation based on inverse-electron-demand Diels-Alder reactivity, *Journal of the American Chemical Society*, 130(41), 13518-13519.
103. Taylor, M. T., Blackman, M. L., Dmitrenko, O., & Fox, J. M. (2011): Design and synthesis of highly reactive dienophiles for the tetrazine-trans-cyclooctene ligation, *Journal of the American Chemical Society*, 133(25), 9646-9649.
104. Chen, W., Wang, D., Dai, C., Hamelberg, D., & Wang, B. (2012): Clicking 1,2,4,5-tetrazine and cyclooctynes with tunable reaction rates, *Chemical communications*, 48(12), 1736-1738.
105. Li, Z., Wang, D., Li, L., Pan, S., Na, Z., Tan, C. Y., & Yao, S. Q. (2014): "Minimalist" cyclopropene-containing photo-cross-linkers suitable for live-cell imaging and affinity-based protein labeling, *Journal of the American Chemical Society*, 136(28), 9990-9998.
106. Carlson, J. C., Meimetis, L. G., Hilderbrand, S. A., & Weissleder, R. (2013): BODIPY-tetrazine derivatives as superbright bioorthogonal turn-on probes, *Angewandte Chemie international edition*, 52(27), 6917-6920.
107. Meimetis, L. G., Carlson, J. C., Giedt, R. J., Kohler, R. H., & Weissleder, R. (2014): Ultrafluorogenic coumarin-tetrazine probes for real-time biological imaging, *Angewandte Chemie international edition*, 53(29), 7531-7534.
108. Devaraj, N. K., Upadhyay, R., Haun, J. B., Hilderbrand, S. A., & Weissleder, R. (2009): Fast and sensitive pretargeted labeling of cancer cells through a tetrazine/trans-cyclooctene cycloaddition, *Angewandte Chemie international edition*, 48(38), 7013-7016.
109. Haun, J. B., Devaraj, N. K., Hilderbrand, S. A., Lee, H., & Weissleder, R. (2010): Bioorthogonal chemistry amplifies nanoparticle binding and enhances the sensitivity of cell detection, *Nature nanotechnology*, 5(9), 660-665.
110. Reiner, T., Keliher, E. J., Earley, S., Marinelli, B., & Weissleder, R. (2011): Synthesis and in vivo imaging of a ¹⁸F-labeled PARP1 inhibitor using a chemically orthogonal scavenger-assisted high-performance method, *Angewandte Chemie international edition*, 50(8), 1922-1925.
111. Keliher, E. J., Reiner, T., Turetsky, A., Hilderbrand, S. A., & Weissleder, R. (2011): High-yielding, two-step ¹⁸F labeling strategy for ¹⁸F-PARP1 inhibitors, *ChemMedChem*, 6(3), 424-427.
112. Rossin, R., Renart Verkerk, P., Van Den Bosch, S. M., Vulderson, R. C., Verel, I., Lub, J., & Robillard, M. S. (2010): In vivo chemistry for pretargeted tumor imaging in live mice, *Angewandte Chemie international edition*, 49(19), 3375-3378.
113. Lang, K., Davis, L., Torres-Kolbus, J., Chou, C., Deiters, A., & Chin, J. W. (2012): Genetically encoded norbornene directs site-specific cellular protein labelling via a rapid bioorthogonal reaction, *Nature chemistry*, 4(4), 298-304.

114. Lang, K., Davis, L., Wallace, S., Mahesh, M., Cox, D. J., Blackman, M. L., Fox, J. M., & Chin, J. W. (2012): Genetic encoding of bicyclononynes and trans-cyclooctenes for site-specific protein labeling in vitro and in live mammalian cells via rapid fluorogenic Diels-Alder reactions, *Journal of the American Chemical Society*, 134(25), 10317-10320.
115. Nikić, I., Plass, T., Schraidt, O., Szymański, J., Briggs, J. A., Schultz, C., & Lemke, E. A. (2014): Minimal tags for rapid dual-color live-cell labeling and super-resolution microscopy, *Angewandte Chemie international edition*, 53(8), 2245-2249.
116. Liu, D. S., Tangpeerachaikul, A., Selvaraj, R., Taylor, M. T., Fox, J. M., & Ting, A. Y. (2012): Diels-Alder cycloaddition for fluorophore targeting to specific proteins inside living cells, *Journal of the American Chemical Society*, 134(2), 792-795.
117. Johnson, J. A., Lu, Y. Y., Van Deventer, J. A., & Tirrell, D. A. (2010): Residue-specific incorporation of non-canonical amino acids into proteins: recent developments and applications, *Current opinion in chemical biology*, 14(6), 774-780.
118. Ngo, J. T., & Tirrell, D. A. (2011): Noncanonical amino acids in the interrogation of cellular protein synthesis, *Accounts of chemical research*, 44(9), 677-685.
119. van Hest, J. C., Kiick, K. L., & Tirrell, D. A. (2000): Efficient incorporation of unsaturated methionine analogues into proteins in vivo, *Journal of the American Chemical Society*, 122(7), 1282-1288.
120. Kiick, K. L., & Tirrell, D. A. (2000): Protein engineering by in vivo incorporation of non-natural amino acids: Control of incorporation of methionine analogues by methionyl-tRNA synthetase, *Tetrahedron*, 56(48), 9487-9493.
121. Kiick, K. L., Saxon, E., Tirrell, D. A., & Bertozzi, C. R. (2002): Incorporation of azides into recombinant proteins for chemoselective modification by the Staudinger ligation, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 99(1), 19-24.
122. Budisa, N., Alefelder, S., Bae, J. H., Golbik, R., Minks, C., Huber, R., & Moroder, L. (2001): Proteins with β -(thienopyrrolyl) alanines as alternative chromophores and pharmaceutically active amino acids, *Protein science*, 10(7), 1281-1292.
123. Tang, Y., Ghirlanda, G., Petka, W. A., Nakajima, T., DeGrado, W. F., & Tirrell, D. A. (2001): Fluorinated coiled-coil proteins prepared in vivo display enhanced thermal and chemical stability, *Angewandte Chemie international edition*, 40(8), 1494-1496.
124. Wang, P., Tang, Y., & Tirrell, D. A. (2003): Incorporation of trifluoroisoleucine into proteins in vivo, *Journal of the American Chemical Society*, 125(23), 6900-6906.
125. Yoshikawa, E., Fournier, M. J., Mason, T. L., & Tirrell, D. A. (1994): Genetically engineered fluoropolymers. Synthesis of repetitive polypeptides containing p-fluorophenylalanine residues, *Macromolecules*, 27(19), 5471-5475.
126. Renner, C., Alefelder, S., Bae, J. H., Budisa, N., Huber, R., & Moroder, L. (2001): Fluoroprolines as tools for protein design and engineering, *Angewandte Chemie international edition*, 40(5), 923-925.
127. Davis, L., & Chin, J. W. (2012): Designer proteins: applications of genetic code expansion in cell biology, *Nature reviews molecular cell biology*, 13(3), 168-182.
128. Goodman, H. M., Abelson, J., Landy, A., Brenner, S., & Smith, J. (1968): Amber suppression: a nucleotide change in the anticodon of a tyrosine transfer RNA, *Nature*, 217(5133), 1019-1024.
129. Blight, S. K., Larue, R. C., Mahapatra, A., Longstaff, D. G., Chang, E., Zhao, G., Kang, P. T., Green-Church, K. B., Chan, M. K., & Krzycki, J. A. (2004): Direct charging of tRNA CUA with pyrrolysine in vitro and in vivo, *Nature*, 431(7006), 333-335.
130. Polycarpo, C., Ambrogelly, A., Bérubé, A., Winbush, S. M., McCloskey, J. A., Crain, P. F., Wood, J. L., & Söll, D. (2004): An aminoacyl-tRNA synthetase that specifically activates pyrrolysine, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(34), 12450-12454.
131. Liu, D. R., & Schultz, P. G. (1999): Progress toward the evolution of an organism with an expanded genetic code, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(9), 4780-4785.
132. Bianco, A., Townsley, F. M., Greiss, S., Lang, K., & Chin, J. W. (2012): Expanding the genetic code of *Drosophila melanogaster*, *Nature chemical biology*, 8(9), 748-750.

133. Greiss, S., & Chin, J. W. (2011): Expanding the genetic code of an animal, *Journal of the American Chemical Society*, 133(36), 14196-14199.
134. Hancock, S. M., Uprety, R., Deiters, A., & Chin, J. W. (2010): Expanding the genetic code of yeast for incorporation of diverse unnatural amino acids via a pyrrolysyl-tRNA synthetase/tRNA pair, *Journal of the American Chemical Society*, 132(42), 14819-14824.
135. Chen, P. R., Groff, D., Guo, J., Ou, W., Cellitti, S., Geierstanger, B. H., & Schultz, P. G. (2009): A facile system for encoding unnatural amino acids in mammalian cells, *Angewandte Chemie international edition*, 48(22), 4052-4055.
136. Gautier, A., Nguyen, D. P., Lusic, H., An, W., Deiters, A., & Chin, J. W. (2010): Genetically encoded photocontrol of protein localization in mammalian cells, *Journal of the American Chemical Society*, 132(12), 4086-4088.
137. Mukai, T., Kobayashi, T., Hino, N., Yanagisawa, T., Sakamoto, K., & Yokoyama, S. (2008): Adding L-lysine derivatives to the genetic code of mammalian cells with engineered pyrrolysyl-tRNA synthetases, *Biochemical and biophysical research communications*, 371(4), 818-822.
138. Chin, J. W., Cropp, T. A., Anderson, J. C., Mukherji, M., Zhang, Z., & Schultz, P. G. (2003): An expanded eukaryotic genetic code, *Science*, 301(5635), 964-967.
139. Chin, J. W., Santoro, S. W., Martin, A. B., King, D. S., Wang, L., & Schultz, P. G. (2002): Addition of p-azido-L-phenylalanine to the genetic code of Escherichia coli, *Journal of the American Chemical Society*, 124(31), 9026-9027.
140. Deiters, A., & Schultz, P. G. (2005): In vivo incorporation of an alkyne into proteins in Escherichia coli, *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 15(5), 1521-1524.
141. Plass, T., Milles, S., Koehler, C., Szymański, J., Mueller, R., Wießler, M., Schultz, C., & Lemke, E. A. (2012): Amino acids for Diels-Alder reactions in living cells, *Angewandte Chemie international edition*, 51(17), 4166-4170.
142. Seitchik, J. L., Peeler, J. C., Taylor, M. T., Blackman, M. L., Rhoads, T. W., Cooley, R. B., Refakis, C., Fox, J. M., & Mehl, R. A. (2012): Genetically encoded tetrazine amino acid directs rapid site-specific in vivo bioorthogonal ligation with trans-cyclooctenes, *Journal of the American Chemical Society*, 134(6), 2898-2901.
143. Staus, D. P., Wingler, L. M., Choi, M., Pani, B., Manglik, A., Kruse, A. C., & Lefkowitz, R. J. (2018): Sortase ligation enables homogeneous GPCR phosphorylation to reveal diversity in β -arrestin coupling, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(15), 3834-3839.
144. Rashidian, M., Wang, L., Edens, J. G., Jacobsen, J. T., Hossain, I., Wang, Q., Vitorica, G. D., Vasdev, N., Ploegh, H., & Liang, S. H. (2016): Enzyme-mediated modification of single-domain antibodies for imaging modalities with different characteristics, *Angewandte Chemie international edition*, 55(2), 528-533.
145. Chen, I., Dorr, B. M., & Liu, D. R. (2011): A general strategy for the evolution of bond-forming enzymes using yeast display, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(28), 11399-11404.
146. Uth, C., Zielonka, S., Hörner, S., Rasche, N., Plog, A., Orelma, H., Avrutina, O., Zhang, K., & Kolmar, H. (2014): A chemoenzymatic approach to protein immobilization onto crystalline cellulose nanoscaffolds, *Angewandte Chemie international edition*, 53(46), 12618-12623.
147. Pasqual, G., Chudnovskiy, A., Tas, J. M., Agudelo, M., Schweitzer, L. D., Cui, A., Hachohen, N., & Vitorica, G. D. (2018): Monitoring T cell-dendritic cell interactions in vivo by intercellular enzymatic labelling, *Nature*, 553(7689), 496-500.
148. Glasgow, J. E., Salit, M. L., & Cochran, J. R. (2016): In vivo site-specific protein tagging with diverse amines using an engineered sortase variant, *Journal of the American Chemical Society*, 138(24), 7496-7499.
149. Wu, Q., Ploegh, H. L., & Truttmann, M. C. (2017): Hepta-mutant Staphylococcus aureus sortase A (SrtA7m) as a tool for in vivo protein labeling in Caenorhabditis elegans, *American Chemical Society chemical biology*, 12(3), 664-673.
150. Alt, K., Paterson, B. M., Westein, E., Rudd, S. E., Poniger, S. S., Jagdale, S., Ardipradja, K., Connell, T. U., Krippner, G. Y., & Nair, A. K. (2015): A versatile approach for the site-specific modification of recombinant antibodies using a combination of enzyme-

- mediated bioconjugation and click chemistry, *Angewandte Chemie international edition*, 54(26), 7515-7519.
151. Hu, J., Wang, G., Zhao, W., Liu, X., Zhang, L., & Gao, W. (2016): Site-specific in situ growth of an interferon-polymer conjugate that outperforms PEGASYS in cancer therapy, *Biomaterials*, 96(1), 84-92.
 152. Witte, M. D., Cragolini, J. J., Dougan, S. K., Yoder, N. C., Popp, M. W., & Ploegh, H. L. (2012): Preparation of unnatural N-to-N and C-to-C protein fusions, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(30), 11993-11998.
 153. Abrahmsen, L., Tom, J., Burnier, J., Butcher, K. A., Kossiakoff, A., & Wells, J. A. (1991): Engineering subtilisin and its substrates for efficient ligation of peptide bonds in aqueous solution, *Biochemistry*, 30(17), 4151-4159.
 154. Weeks, A. M., & Wells, J. A. (2018): Engineering peptide ligase specificity by proteomic identification of ligation sites, *Nature chemical biology*, 14(1), 50-57.
 155. Henager, S. H., Chu, N., Chen, Z., Bolduc, D., Dempsey, D. R., Hwang, Y., Wells, J., & Cole, P. A. (2016): Enzyme-catalyzed expressed protein ligation, *Nature methods*, 13(11), 925-927.
 156. Gray, M. A., Tao, R. N., DePorter, S. M., Spiegel, D. A., & McNaughton, B. R. (2016): A nanobody activation immunotherapeutic that selectively destroys HER2-positive breast cancer cells, *ChemBioChem*, 17(2), 155-158.
 157. Best, M., Degen, A., Baalman, M., Schmidt, T. T., & Wombacher, R. (2015): Two-step protein labeling by using lipoic acid ligase with norbornene substrates and subsequent inverse-electron demand Diels-Alder reaction, *ChemBioChem*, 16(8), 1158-1162.
 158. Schumacher, D., Helma, J., Mann, F. A., Pichler, G., Natale, F., Krause, E., Cardoso, M. C., Hackenberger, C. P., & Leonhardt, H. (2015): Versatile and efficient site-specific protein functionalization by tubulin tyrosine ligase, *Angewandte Chemie international edition*, 54(46), 13787-13791.
 159. Schumacher, D., Lemke, O., Helma, J., Gerszonowicz, L., Waller, V., Stoschek, T., Durkin, P. M., Budisa, N., Leonhardt, H., & Keller, B. G. (2017): Broad substrate tolerance of tubulin tyrosine ligase enables one-step site-specific enzymatic protein labeling, *Chemical science*, 8(5), 3471-3478.
 160. Chen, I., Howarth, M., Lin, W., & Ting, A. Y. (2005): Site-specific labeling of cell surface proteins with biophysical probes using biotin ligase, *Nature methods*, 2(2), 99-104.
 161. Slavoff, S. A., Chen, I., Choi, Y.-A., & Ting, A. Y. (2008): Expanding the substrate tolerance of biotin ligase through exploration of enzymes from diverse species, *Journal of the American Chemical Society*, 130(4), 1160-1162.
 162. Sueda, S., Yoneda, S., & Hayashi, H. (2011): Site-specific labeling of proteins by using biotin protein ligase conjugated with fluorophores, *ChemBioChem*, 12(9), 1367-1375.
 163. Miyao, H., Ikeda, Y., Shiraishi, A., Kawakami, Y., & Sueda, S. (2015): Immobilization of immunoglobulin-G-binding domain of protein A on a gold surface modified with biotin ligase, *Analytical biochemistry*, 484(1), 113-121.
 164. Kim, D. I., Jensen, S. C., Noble, K. A., KC, B., Roux, K. H., Motamedchaboki, K., & Roux, K. J. (2016): An improved smaller biotin ligase for BioID proximity labeling, *Molecular biology of the cell*, 27(8), 1188-1196.
 165. Yin, J., Straight, P. D., McLoughlin, S. M., Zhou, Z., Lin, A. J., Golan, D. E., Kelleher, N. L., Kolter, R., & Walsh, C. T. (2005): Genetically encoded short peptide tag for versatile protein labeling by Sfp phosphopantetheinyl transferase, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(44), 15815-15820.
 166. Grünwald, J., Klock, H. E., Cellitti, S. E., Bursulaya, B., McMullan, D., Jones, D. H., Chiu, H.-P., Wang, X., Patterson, P., & Zhou, H. (2015): Efficient preparation of site-specific antibody-drug conjugates using phosphopantetheinyl transferases, *Bioconjugate chemistry*, 26(12), 2554-2562.
 167. Pippig, D. A., Baumann, F., Strackharn, M., Aschenbrenner, D., & Gaub, H. E. (2014): Protein-DNA chimeras for nano assembly, *American Chemical Society nano*, 8(7), 6551-6555.
 168. Sunbul, M., Yen, M., Zou, Y., & Yin, J. (2008): Enzyme catalyzed site-specific protein labeling and cell imaging with quantum dots, *Chemical communications*, 45(1), 5927-5929.

169. Rashidian, M., Song, J. M., Pricer, R. E., & Distefano, M. D. (2012): Chemoenzymatic reversible immobilization and labeling of proteins without prior purification, *Journal of the American Chemical Society*, 134(20), 8455-8467.
170. Wollack, J. W., Monson, B. J., Dozier, J. K., Dalluge, J. J., Poss, K., Hilderbrand, S. A., & Distefano, M. D. (2014): Site-specific labeling of proteins and peptides with trans-cyclooctene containing handles capable of tetrazine ligation, *Chemical biology & drug design*, 84(2), 140-147.
171. Gauchet, C., Labadie, G. R., & Poulter, C. D. (2006): Regio- and chemoselective covalent immobilization of proteins through unnatural amino acids, *Journal of the American Chemical Society*, 128(29), 9274-9275.
172. Hosokawa, A., Wollack, J. W., Zhang, Z., Chen, L., Barany, G., & Distefano, M. D. (2007): Evaluation of an alkyne-containing analogue of farnesyl diphosphate as a dual substrate for protein-prenyltransferases, *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 13(1-2), 345-354.
173. Lee, J. J., Choi, H. J., Yun, M., Kang, Y., Jung, J. E., Ryu, Y., Kim, T. Y., Cha, Y. J., Cho, H. S., & Min, J. J. (2015): Enzymatic prenylation and oxime ligation for the synthesis of stable and homogeneous protein-drug conjugates for targeted therapy, *Angewandte Chemie international edition*, 54(41), 12020-12024.
174. Rashidian, M., Kumarapperuma, S. C., Gabrielse, K., Fegan, A., Wagner, C. R., & Distefano, M. D. (2013): Simultaneous dual protein labeling using a triorthogonal reagent, *Journal of the American Chemical Society*, 135(44), 16388-16396.
175. Zhang, Y., Blanden, M. J., Sudheer, C., Gangopadhyay, S. A., Rashidian, M., Hougland, J. L., & Distefano, M. D. (2015): Simultaneous site-specific dual protein labeling using protein prenyltransferases, *Bioconjugate chemistry*, 26(12), 2542-2553.
176. Yeo, J. E., Wickramaratne, S., Khatwani, S., Wang, Y.-C., Vervacke, J., Distefano, M. D., & Tretyakova, N. Y. (2014): Synthesis of site-specific DNA-protein conjugates and their effects on DNA replication, *American Chemical Society chemical biology*, 9(8), 1860-1868.
177. Seo, J.-s., Lee, S., & Poulter, C. D. (2013): Regioselective covalent immobilization of recombinant antibody-binding proteins A, G, and L for construction of antibody arrays, *Journal of the American Chemical Society*, 135(24), 8973-8980.
178. Ho, S. H., & Tirrell, D. A. (2016): Chemoenzymatic labeling of proteins for imaging in bacterial cells, *Journal of the American Chemical Society*, 138(46), 15098-15101.
179. Heal, W. P., Wickramasinghe, S. R., Leatherbarrow, R. J., & Tate, E. W. (2008): N-myristoyl transferase-mediated protein labelling in vivo, *Organic & biomolecular chemistry*, 6(13), 2308-2315.
180. Kulkarni, C., Lo, M., Fraseur, J. G., Tirrell, D. A., & Kinzer-Ursem, T. L. (2015): Bioorthogonal chemoenzymatic functionalization of calmodulin for bioconjugation applications, *Bioconjugate chemistry*, 26(10), 2153-2160.
181. Kulkarni, C., Kinzer-Ursem, T. L., & Tirrell, D. A. (2013): Selective functionalization of the protein N Terminus with N-myristoyl transferase for bioconjugation in cell lysate, *ChemBioChem*, 14(15), 1958-1962.
182. Gao, H., Sun, W., Song, Z., Yu, Y., Wang, L., Chen, X., & Zhang, Q. (2017): A method to generate and analyze modified myristoylated proteins, *ChemBioChem*, 18(3), 324-330.
183. Rachel, N. M., Toulouse, J. L., & Pelletier, J. N. (2017): Transglutaminase-catalyzed bioconjugation using one-pot metal-free bioorthogonal chemistry, *Bioconjugate chemistry*, 28(10), 2518-2523.
184. Rachel, N., & Pelletier, J. (2016): One-pot peptide and protein conjugation: a combination of enzymatic transamidation and click chemistry, *Chemical communications*, 52(12), 2541-2544.
185. Oteng-Pabi, S. K., Pardin, C., Stoica, M., & Keillor, J. W. (2014): Site-specific protein labelling and immobilization mediated by microbial transglutaminase, *Chemical communications*, 50(50), 6604-6606.
186. Dennler, P., Chiotellis, A., Fischer, E., Brégeon, D., Belmont, C., Gauthier, L., Lhospice, F., Romagne, F., & Schibli, R. (2014): Transglutaminase-based chemo-enzymatic conjugation approach yields homogeneous antibody-drug conjugates, *Bioconjugate chemistry*, 25(3), 569-578.

187. Mero, A., Grigoletto, A., Maso, K., Yoshioka, H., Rosato, A., & Pasut, G. (2016): Site-selective enzymatic chemistry for polymer conjugation to protein lysine residues: PEGylation of G-CSF at lysine-41, *Polymer chemistry*, 7(42), 6545-6553.
188. Tanaka, T., Kamiya, N., & Nagamune, T. (2005): N-terminal glycine-specific protein conjugation catalyzed by microbial transglutaminase, *FEBS letters*, 579(10), 2092-2096.
189. Navarre, W. W., & Schneewind, O. (1994): Proteolytic cleavage and cell wall anchoring at the LPXTG motif of surface proteins in Gram-positive bacteria, *Molecular microbiology*, 14(1), 115-121.
190. Mazmanian, S. K., Liu, G., Ton-That, H., & Schneewind, O. (1999): Staphylococcus aureus sortase, an enzyme that anchors surface proteins to the cell wall, *Science*, 285(5428), 760-763.
191. Ton-That, H., Faull, K. F., & Schneewind, O. (1997): Anchor structure of staphylococcal surface proteins. A branched peptide that links the carboxyl terminus of proteins to the cell wall, *Journal of biological chemistry*, 272(35), 22285-22292.
192. Antos, J. M., Truttmann, M. C., & Ploegh, H. L. (2016): Recent advances in sortase-catalyzed ligation methodology, *Current opinion in structural biology*, 38(1), 111-118.
193. Theile, C. S., Witte, M. D., Blom, A. E., Kundrat, L., Ploegh, H. L., & Guimaraes, C. P. (2013): Site-specific N-terminal labeling of proteins using sortase-mediated reactions, *Nature protocols*, 8(9), 1800-1807.
194. Li, Y. M., Li, Y. T., Pan, M., Kong, X. Q., Huang, Y. C., Hong, Z. Y., & Liu, L. (2014): Irreversible site-specific hydrazinolysis of proteins by use of sortase, *Angewandte Chemie international edition*, 53(8), 2198-2202.
195. Morris, T. W., Reed, K. E., & Cronan, J. E. (1994): Identification of the gene encoding lipoate-protein ligase A of Escherichia coli. Molecular cloning and characterization of the lplA gene and gene product, *Journal of biological chemistry*, 269(23), 16091-16100.
196. Fernández-Suárez, M., Baruah, H., Martínez-Hernández, L., Xie, K. T., Baskin, J. M., Bertozzi, C. R., & Ting, A. Y. (2007): Redirecting lipoic acid ligase for cell surface protein labeling with small-molecule probes, *Nature biotechnology*, 25(12), 1483-1487.
197. Puthenveetil, S., Liu, D. S., White, K. A., Thompson, S., & Ting, A. Y. (2009): Yeast display evolution of a kinetically efficient 13-amino acid substrate for lipoic acid ligase, *Journal of the American Chemical Society*, 131(45), 16430-16438.
198. Plaks, J. G., Falatach, R., Kastantin, M., Berberich, J. A., & Kaar, J. L. (2015): Multisite clickable modification of proteins using lipoic acid ligase, *Bioconjugate chemistry*, 26(6), 1104-1112.
199. Drake, C. R., Sevillano, N., Truillet, C., Craik, C. S., VanBrocklin, H. F., & Evans, M. J. (2016): Site-specific radiofluorination of biomolecules with 8-[18F]-fluorooctanoic acid catalyzed by lipoic acid ligase, *American Chemical Society chemical biology*, 11(6), 1587-1594.
200. Lambalot, R. H., Gehring, A. M., Flugel, R. S., Zuber, P., LaCelle, M., Marahiel, M. A., Reid, R., Khosla, C., & Walsh, C. T. (1996): A new enzyme superfamily - the phosphopantetheinyl transferases, *Chemistry & biology*, 3(11), 923-936.
201. Belshaw, P. J., Walsh, C. T., & Stachelhaus, T. (1999): Aminoacyl-CoAs as probes of condensation domain selectivity in nonribosomal peptide synthesis, *Science*, 284(5413), 486-489.
202. Sieber, S. A., Walsh, C. T., & Marahiel, M. A. (2003): Loading peptidyl-coenzyme A onto peptidyl carrier proteins: a novel approach in characterizing macrocyclization by thioesterase domains, *Journal of the American Chemical Society*, 125(36), 10862-10866.
203. La Clair, J. J., Foley, T. L., Schegg, T. R., Regan, C. M., & Burkart, M. D. (2004): Manipulation of carrier proteins in antibiotic biosynthesis, *Chemistry & biology*, 11(2), 195-201.
204. Zhou, Z., Cironi, P., Lin, A. J., Xu, Y., Hrvatin, S., Golan, D. E., Silver, P. A., Walsh, C. T., & Yin, J. (2007): Genetically encoded short peptide tags for orthogonal protein labeling by Sfp and AcpS phosphopantetheinyl transferases, *American Chemical Society chemical biology*, 2(5), 337-346.

205. Schmohl, L., & Schwarzer, D. (2014): Chemo-enzymatic three-fragment assembly of semisynthetic proteins, *Journal of peptide science*, 20(2), 145-151.
206. Grünewald, J., Jones, D. H., Brock, A., Chiu, H. P., Bursulaya, B., Ng, K., Vo, T., Patterson, P., Uno, T., & Hunt, J. (2014): Site-specific dual labeling of proteins by using small orthogonal tags at neutral pH, *ChemBioChem*, 15(12), 1787-1791.
207. Rothmann, M., Kosa, N. M., & Burkart, M. D. (2014): Resin supported acyl carrier protein labeling strategies, *Royal Society of Chemistry advances*, 4(18), 9092-9097.
208. Kosa, N. M., Haushalter, R. W., Smith, A. R., & Burkart, M. D. (2012): Reversible labeling of native and fusion-protein motifs, *Nature methods*, 9(10), 981-984.
209. Reinhardt, U., Lotze, J., Zernia, S., Mörl, K., Beck-Sickingler, A. G., & Seitz, O. (2014): Peptide-templated acyl transfer: A chemical method for the labeling of membrane proteins on live cells, *Angewandte Chemie international edition*, 53(38), 10237-10241.
210. Shafer, D. E., Inman, J. K., & Lees, A. (2000): Reaction of tris (2-carboxyethyl) phosphine (TCEP) with maleimide and α -haloacyl groups: anomalous elution of TCEP by gel filtration, *Analytical biochemistry*, 282(1), 161-164.
211. Tamura, K., Ohbayashi, N., Maruta, Y., Kanno, E., Itoh, T., & Fukuda, M. (2009): Varp is a novel Rab32/38-binding protein that regulates Tyrp1 trafficking in melanocytes, *Molecular biology of the cell*, 20(12), 2900-2908.
212. Wang, F., Zhang, H., Zhang, X., Wang, Y., Ren, F., Zhang, X., Zhai, Y., & Chang, Z. (2008): Varp interacts with Rab38 and functions as its potential effector, *Biochemical and biophysical research communications*, 372(1), 162-167.
213. Johansson, M., Lehto, M., Tanhuanpää, K., Cover, T. L., & Olkkonen, V. M. (2005): The oxysterol-binding protein homologue ORP1L interacts with Rab7 and alters functional properties of late endocytic compartments, *Molecular biology of the cell*, 16(12), 5480-5492.
214. Kanno, E., Ishibashi, K., Kobayashi, H., Matsui, T., Ohbayashi, N., & Fukuda, M. (2010): Comprehensive screening for novel Rab-binding proteins by GST pull-down assay using 60 different mammalian Rabs, *Traffic*, 11(4), 491-507.
215. Etoh, K., & Fukuda, M. (2015): Structure-function analyses of the small GTPase Rab35 and its effector protein centaurin- β 2/ACAP2 during neurite outgrowth of PC12 cells, *Journal of biological chemistry*, 290(14), 9064-9074.
216. Tamura, K., Ohbayashi, N., Ishibashi, K., & Fukuda, M. (2011): Structure-function analysis of VPS9-ankyrin-repeat protein (Varp) in the trafficking of tyrosinase-related protein 1 in melanocytes, *Journal of biological chemistry*, 286(9), 7507-7521.
217. Oesterlin, L. K., Goody, R. S., & Itzen, A. (2012): Posttranslational modifications of Rab proteins cause effective displacement of GDP dissociation inhibitor, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(15), 5621-5626.
218. Pylypenko, O., Rak, A., Durek, T., Kushnir, S., Dursina, B. E., Thomae, N. H., Constantinescu, A. T., Brunsveld, L., Watzke, A., & Waldmann, H. (2006): Structure of doubly prenylated Ypt1:GDI complex and the mechanism of GDI-mediated Rab recycling, *EMBO journal*, 25(1), 13-23.
219. Wu, Y.-W., Oesterlin, L. K., Tan, K.-T., Waldmann, H., Alexandrov, K., & Goody, R. S. (2010): Membrane targeting mechanism of Rab GTPases elucidated by semisynthetic protein probes, *Nature chemical biology*, 6(7), 534-540.
220. Itzen, A., Pylypenko, O., Goody, R., Alexandrov, K., & Rak, A. (2006): Nucleotide exchange via local protein unfolding - Structure of Rab8 in complex with MSS4, *EMBO journal*, 25(7), 1445-1455.
221. Xiang, Z., Lacey, V. K., Ren, H., Xu, J., Burban, D. J., Jennings, P. A., & Wang, L. (2014): Proximity-enabled protein crosslinking through genetically encoding haloalkane unnatural amino acids, *Angewandte Chemie international edition*, 53(8), 2190-2193.
222. Cigler, M., Müller, T. G., Horn-Ghetko, D., von Wrisberg, M. K., Fottner, M., Goody, R. S., Itzen, A., Müller, M. P., & Lang, K. (2017): Proximity-triggered covalent stabilization of low-affinity protein complexes in vitro and in vivo, *Angewandte Chemie international edition*, 56(49), 15737-15741.
223. Fujiwara, K., Toma, S., Okamura-Ikeda, K., Motokawa, Y., Nakagawa, A., & Taniguchi, H. (2005): Crystal structure of lipoate-protein ligase A from *Escherichia coli*.

- Determination of the lipoic acid-binding site, *Journal of biological chemistry*, 280(39), 33645-33651.
224. Green, D., Morris, T., Green, J., Cronan, J. E., & Guest, J. (1995): Purification and properties of the lipoate protein ligase of *Escherichia coli*, *Biochemical journal*, 309(3), 853-862.
225. Schutkowski, M., Reimer, U., Panse, S., Dong, L., Lizcano, J. M., Alessi, D. R., & Schneider-Mergener, J. (2004): High-content peptide microarrays for deciphering kinase specificity and biology, *Angewandte Chemie international edition*, 43(20), 2671-2674.
226. Marchetti, L., De Nadai, T., Bonsignore, F., Calvello, M., Signore, G., Viegi, A., Beltram, F., Luin, S., & Cattaneo, A. (2014): Site-specific labeling of neurotrophins and their receptors via short and versatile peptide tags, *Public Library of Science ONE*, 9(11), 1-18.
227. Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, 227(5259), 680-685.
228. Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012): NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis, *Nature methods*, 9(7), 671-675.

Anhang

Tabelle 25 Densitometrische Ermittlung der Menge an phosphocholinisiertem Rab1b (Rab1b-PC) für die Western-Blot-basierte Bestimmung der Aktivität der AnkX-Verkürzungskonstrukte aus Abbildung 12a.

	Rab1b-PC (%)
AnkX ₁₋₈₀₀	100
AnkX ₁₋₇₆₉	27
AnkX ₁₋₇₂₃	25
AnkX ₁₋₆₈₈	2
AnkX ₁₋₆₁₉	0
AnkX ₁₋₅₈₈	0
AnkX ₁₋₅₂₀	0
AnkX ₁₋₄₈₄	0

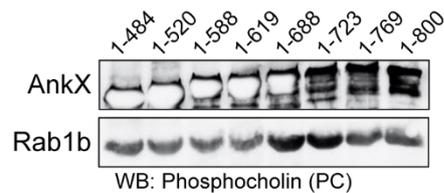


Abbildung 41 Western-Blot-basierte Bestimmung der katalytischen Aktivität von C-terminalen AnkX-Verkürzungskonstrukten. Rab1b (5 μ M) wurde mit CDP-Cholin (1 mM) und *E. coli*-Zelllysate (2 mg/ml Gesamtprotein), welches ein rekombinant exprimiertes AnkX-Verkürzungskonstrukt enthielt, für 16 h bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Menge an Rab1b-PC über Western Blot mit einem PC-Antikörper bestimmt. Das Signal von Rab1b-PC wurde auf das Signal von autophosphocholinisiertem AnkX (AnkX-PC) normalisiert. Im untersuchten Zeitraum von 16 h führen alle AnkX-Verkürzungskonstrukte zu einer Phosphocholinierung von Rab1b.

Tabelle 26 Einfluss der unterschiedlichen Löslichkeitsfaktoren aus Abbildung 12b-e auf die katalytische Effizienz (k_{cat}/K_M) und die Ausbeute der Proteinreinigung von AnkX. Der k_{cat}/K_M -Wert und die Ausbeute der Proteinreinigung bei der Expression von AnkX mit dem jeweiligen Löslichkeitsfaktor wurden auf die Werte des Enzyms bei der Expression ohne Löslichkeitsfaktor normalisiert (norm. AnkX_{WT}). Das Produkt aus dem normalisierten k_{cat}/K_M -Wert und der normalisierten Ausbeute der Proteinreinigung wurde als Leistung des jeweiligen Löslichkeitsfaktors definiert.

	k_{cat}/K_M ($M^{-1} \cdot s^{-1}$)	k_{cat}/K_M (norm. AnkX _{WT})	Ausbeute (mg)	Ausbeute (norm. AnkX _{WT})	Leistung (norm. AnkX _{WT})
WT	$9,0 \cdot 10^4$	1,0	2,9	1,0	1,0
MBP	$1,1 \cdot 10^5$	1,2	2,4	0,8	1,0
GFP	$1,2 \cdot 10^5$	1,3	18,1	6,2	8,3
GST	$1,6 \cdot 10^5$	1,8	4,1	1,4	2,5
Halo	$2,0 \cdot 10^5$	2,2	6,9	2,4	5,3

Tabelle 27 Hydrolysegeschwindigkeiten (v) und beobachtete Geschwindigkeitskonstanten (k_{obs}) der HPLC-basierten Michaelis-Menten-Kinetik für die AnkX-vermittelte Hydrolyse von CDP-Cholin aus Abbildung 14.

CDP-Cholin (μM)	$v \cdot 10^{-3}$ ($\mu M/s$)	$k_{obs} \cdot 10^{-3}$ (1/s)
0	0	0
1	0,4	1,4
2	0,5	2,1
4	0,8	3,1
6	0,9	3,8
8	1,0	4,1
10	1,3	5,1
20	1,5	5,9
50	1,8	7,1

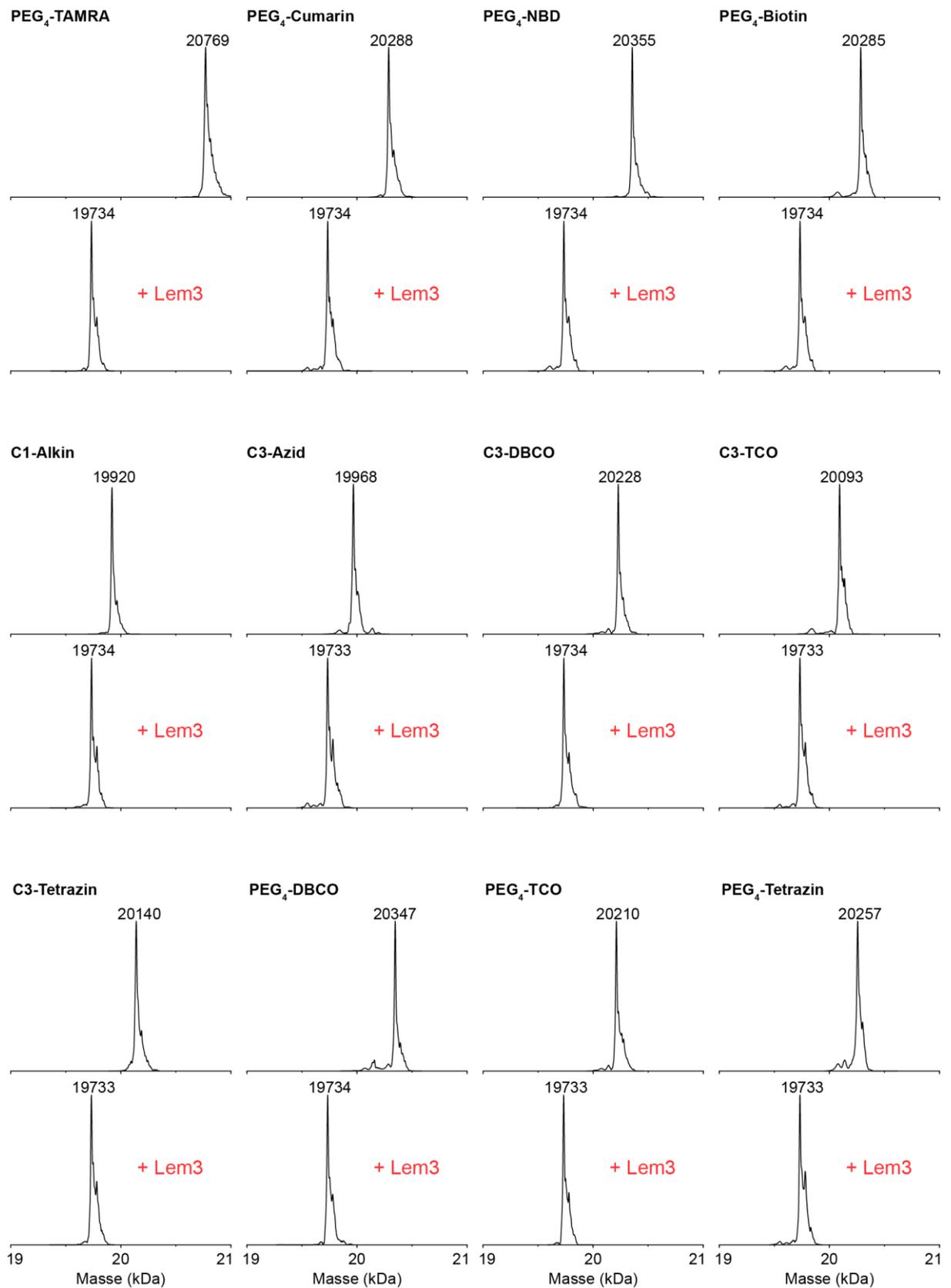


Abbildung 42 Modifizierung und Demodifizierung von Rab1b mit unterschiedlichen CDP-Cholin-Derivaten. Die Massenspektren in der jeweils oberen Spur entsprechen den Endpunkten der zeitabhängigen Modifizierung von Rab1b aus Abbildung 17 und zeigen in allen Fällen eine quantitative Umsetzung von Rab1b. Quantitativ modifiziertes Rab1b (5 μ M) wurde mit Lem3 (500 nM) über Nacht bei RT inkubiert. Die anschließend aufgenommenen Massenspektren sind in der jeweils unteren Spur dargestellt und zeigen, dass Lem3 die Modifikation in allen Fällen wieder vollständig von Rab1b entfernen kann.

Tabelle 28 Absolute und relative k_{cat}/K_M -Werte der CDP-Cholin-Derivate aus Abbildung 18. Die relativen k_{cat}/K_M -Werte der CDP-Cholin-Derivate wurden auf den k_{cat}/K_M -Wert von CDP-Cholin normalisiert (norm. CDP-Cholin).

	k_{cat}/K_M ($M^{-1} s^{-1}$)	k_{cat}/K_M (norm. CDP-Cholin in %)
CDP-Cholin	$1,3 \cdot 10^5$	100
C1-Alkin	$1,8 \cdot 10^4$	14
C3-Azid	$1,2 \cdot 10^4$	9,2
C3-DBCO	$8,4 \cdot 10^3$	6,5
C3-TCO	$1,0 \cdot 10^3$	0,8
C3-Tetrazin	$1,1 \cdot 10^3$	0,8
PEG ₄ -DBCO	$7,4 \cdot 10^2$	0,6
PEG ₄ -TCO	$1,2 \cdot 10^3$	0,9
PEG ₄ -Tetrazin	$9,9 \cdot 10^2$	0,8
PEG ₄ -TAMRA	$7,6 \cdot 10^2$	0,6
PEG ₄ -Cumarin	$6,9 \cdot 10^2$	0,5
PEG ₄ -NBD	$2,5 \cdot 10^3$	1,9
PEG ₄ -Biotin	$1,1 \cdot 10^3$	0,8

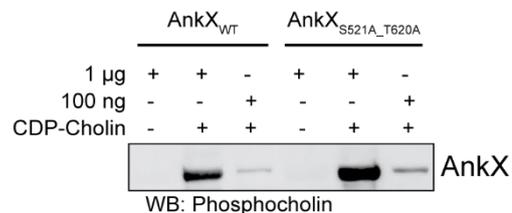


Abbildung 43 Autophosphocholinierung von AnkX_{S521A_T620A}. AnkX_{WT} (10 μ M) oder AnkX_{S521A_T620A} (10 μ M) wurde mit CDP-Cholin (2 mM) über Nacht bei RT inkubiert. Anschließend wurden Proben (1 μ g und 100 ng Protein) über SDS-PAGE aufgetrennt und über Western Blot mit einem PC-Antikörper auf die Autophosphocholinierung von AnkX untersucht.

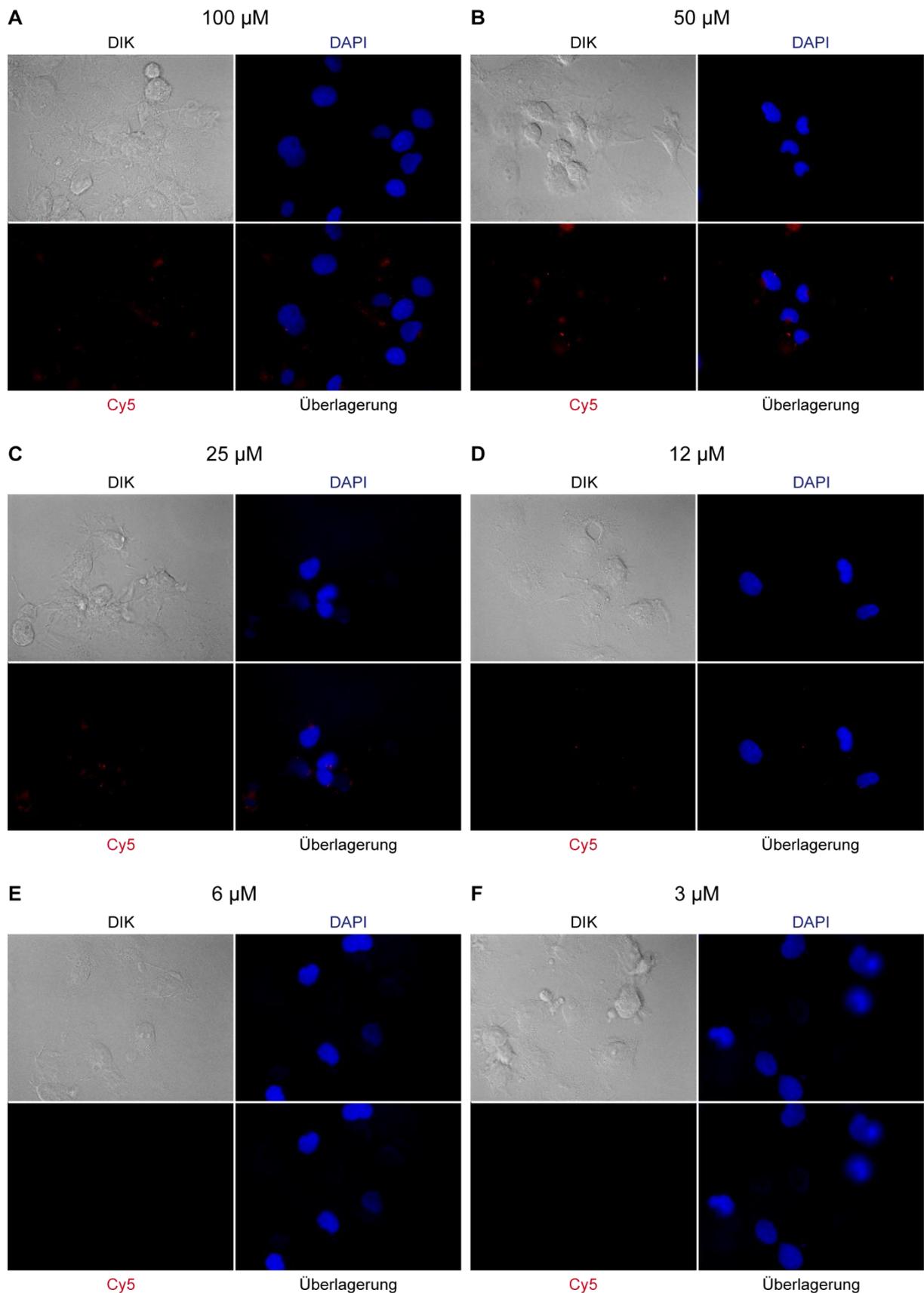


Abbildung 44 Anlagerung von CDP-Cholin-PEG₄-Sulfo-Cy5 an Cos-7-Zellen. Nicht-transfizierte Cos-7-Zellen wurden mit CDP-Cholin-PEG₄-Sulfo-Cy5 **(A)** (100 μM), **(B)** (50 μM), **(C)** (25 μM), **(D)** (12 μM), **(E)** (6 μM) oder **(F)** (3 μM) für 3 h inkubiert und anschließend mit 4 % Formaldehyd fixiert. Die Fluoreszenz von Cy5 (rot) wurde durch fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen analysiert. Zellkerne sind mit DAPI (blau) gefärbt. Von analysierten Zellen wurde zusätzlich eine lichtmikroskopische DIK-Aufnahme erstellt.

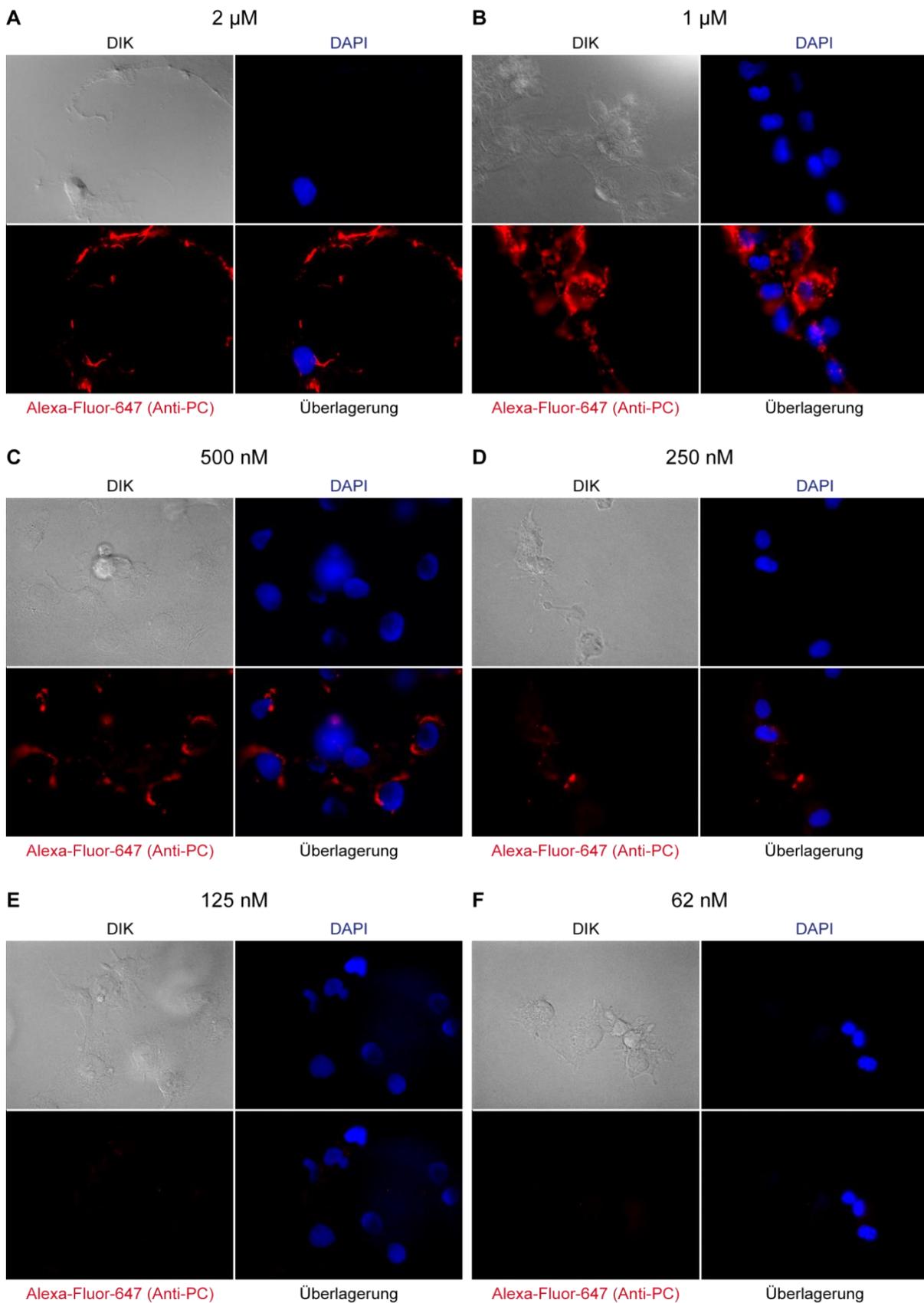


Abbildung 45 Anlagerung von AnxA-PC an Cos-7-Zellen. Nicht-transfizierte Cos-7-Zellen wurden mit CDP-Cholin (1 mM) und AnxA (**A**) (2 μM), (**B**) (1 μM), (**C**) (500 nM), (**D**) (250 nM), (**E**) (125 nM) oder (**F**) (62 nM) für 3 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 4 % Formaldehyd fixiert und mit einem primären PC-Antikörper (1:1000) und einem Alexa-Fluor-647-gekoppelten Sekundär-Antikörper (1:1000) gefärbt. Die Fluoreszenz von Alexa-Fluor-647 (rot) wurde durch fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen analysiert. Zellkerne sind mit DAPI (blau) gefärbt. Von analysierten Zellen wurde zusätzlich eine lichtmikroskopische DIK-Aufnahme erstellt.

Tabelle 29 Densitometrische Bestimmung der Ausbeute (in %) an AnkX_{D265C}:PC:Rab1b-Komplex bei der Optimierung der binären Adduktbildung im direkten Ansatz aus Abbildung 33.

	20 °C	25 °C	30 °C	37 °C
12 h	18	16	27	28
24 h	20	22	31	36
48 h	19	30	37	44
72 h	31	34	40	49

Tabelle 30 Densitometrische Bestimmung der Ausbeute (in %) an AnkX_{D265C}:PC:Rab1b-Komplex bei der Optimierung der ternären Komplexbildung im direkten Ansatz aus Abbildung 34.

	20 °C	25 °C	30 °C	37 °C
0 h	6	9	10	9
2 h	41	40	37	39
4 h	44	44	42	41
6 h	46	45	43	43
24 h	47	43	44	50

Tabelle 31 Densitometrische Bestimmung der Ausbeute (in %) an AnkX_{G108C}:PC:Rab1b-Komplex bei der Optimierung der ternären Komplexbildung im indirekten Ansatz aus Abbildung 35.

	20 °C
1 h	27
2 h	33
4 h	37
8 h	42
24 h	53
48 h	60

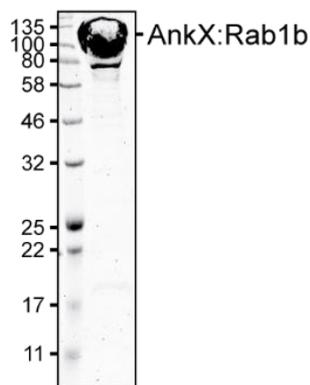


Abbildung 46 SDS-PAGE-Analyse von Kristallen des kovalenten AnkX_{G108C}:PC:Rab1b:GDP-Komplexes. Kristalle des AnkX_{G108C}:PC:Rab1b:GDP-Komplexes wurden längere Zeit bei 20 °C inkubiert und anschließend über SDS-PAGE analysiert. Die Abwesenheit von freiem Rab1b (20 kDa) im SDS-PAGE-Gel bestätigt, dass die kovalente Verknüpfung intakt ist.

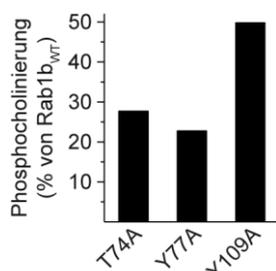


Abbildung 47 Massenspektrometrische Einschätzung der katalytischen Effizienz der Rab1b-Alaninvariante Y77A. Rab1b-Alaninvarianten (1 µM) wurden mit CDP-Cholin (50 µM) und katalytischen Mengen an AnkX_{WT} (3,75 nM) für 6 h bei RT inkubiert. Anschließend wurde das Ausmaß der Phosphocholinierung über Massenspektrometrie bestimmt. Da Y77A_{Rab1b} in ähnlichem Ausmaß wie T74A_{Rab1b} phosphocholinert wird, wurde angenommen, dass die katalytische Effizienz von Y77A_{Rab1b} in einer ähnlichen Größenordnung liegt wie die katalytische Effizienz von T74A_{Rab1b}.

Tabelle 32 Massenspektrometrische Analyse der Phosphocholinierung der Rab1b-Alaninvarianten aus Abbildung 38a. Das Ausmaß der Phosphocholinierung der Rab1b-Alaninvarianten wurde auf die Phosphocholinierung von Rab1b_{WT} normalisiert (norm. Rab1b_{WT}). Für N154A_{Rab1b} und N157A_{Rab1b} konnte kein Ionenspektrum aufgenommen und daher das Ausmaß der Phosphocholinierung nicht bestimmt werden (n. b.).

	Phosphocholinierung (norm. Rab1b _{WT} in %)
D30A	55
D31A	30
T32A	55
T34A	102
I38A	101
I41A	99

D53A	106
T72A	94
I73A	72
T74A	0
S75A	61
S76A	0
Y77A	0
Y78A	133
R79A	46
Q101A	88
E105A	104
Y109A	32
T126A	90
K128A	99
K137A	111
D141A	49
K153A	42
N154A	n. b.
T156A	90
N157A	n. b.
Q160A	63
E168A	59
K171A	92

Tabelle 33 Tryptophanfluoreszenz-basierte Bestimmung der k_{cat}/K_M -Werte der Rab1b-Alaninvarianten aus Abbildung 38b. Die k_{cat}/K_M -Werte wurden auf den k_{cat}/K_M -Wert von Rab1b_{WT} normalisiert (norm. Rab1b_{WT}). Der k_{cat}/K_M -Wert von Y77A_{Rab1b} (*) wurde durch massenspektrometrische Einschätzung bestimmt (siehe Anhang Abbildung 47).

	k_{cat}/K_M (norm. Rab1b _{WT} in %)
D30A	54
D31A	15
T32A	54
T74A	6
S75A	38
S76A	0
Y77A *	6
R79A	38
Y109A	15
D141A	31
K153A	31
N154A	69
N157A	23
Q160A	54
E168A	69

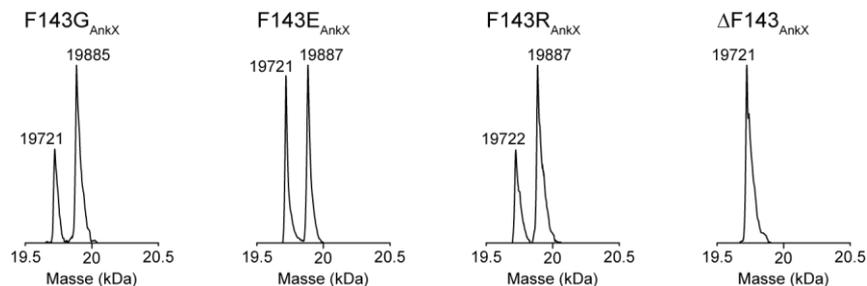


Abbildung 48 Katalytische Aktivität unterschiedlicher F143_{AnkX}-Varianten. Rab1b (5 μ M) wurde mit CDP-Cholin (1 mM) und katalytischen Mengen der F143_{AnkX}-Varianten (250 nM) für 8 h bei RT inkubiert. Anschließend wurde das Ausmaß der Phosphocholinierung über Massenspektrometrie bestimmt.

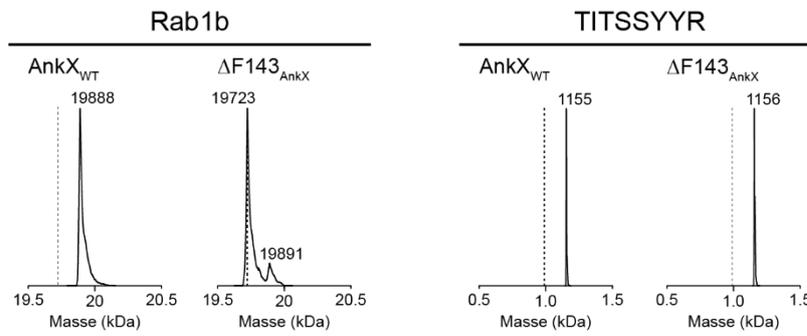


Abbildung 49 Bedeutung des AnkX-Dorns für die lokale Entfaltung von Rab1b bei der AnkX-vermittelten Phosphocholinierung. Abgebildet sind die Massenspektren der Experimente aus Abbildung 40d. Rab1b (50 μ M) oder das Octapeptid TITSSYYR (50 μ M) wurde mit CDP-Cholin (5 mM) und AnkX_{WT} (5 μ M) oder Δ F143_{AnkX} (5 μ M) für 4 Tage bei 25 °C inkubiert. Anschließend wurde das Ausmaß der Phosphocholinierung über Massenspektrometrie bestimmt.

Danksagung

Bei folgenden Personen möchte ich mich sehr herzlich bedanken:

Prof. Dr. Aymelt Itzen für die Möglichkeit, das AnkX-Projekt in seiner Arbeitsgruppe bearbeiten zu dürfen, sowie die kompetente und intensive Betreuung (auch aus dem fernen Hamburg). Insbesondere die Freiräume bei der Projektgestaltung und die lehrreichen und motivierenden Diskussionen habe ich sehr geschätzt.

Prof. Dr. Matthias Feige für die Übernahme des Zweitgutachtens, die Betreuung als Mentor und die Bereitstellung seines Zellkulturlabors.

Prof. Dr. Christian Hedberg für die erfolgreiche Kooperation und die Möglichkeit eines Forschungsaufenthalts in Umeå.

Dr. Philipp Ochtrop für die nette Aufnahme in Schweden und die geduldige Einführung in die Grundlagen der organischen Synthese.

Prof. Dr. Michael Groll für die erfolgreiche Kooperation und die Möglichkeit, meine Dissertation in seiner Arbeitsgruppe zu Ende zu bringen.

Felix Ecker für das Ansetzen zahlreicher Kristallisationsplatten und die röntgenkristallographische Strukturaufklärung.

Marietta Kaspers für die konstruktive Kritik an der vorliegenden Arbeit und die angenehme und produktive Zusammenarbeit während ihrer Masterarbeit. Ihr intensiver Arbeitseinsatz und ihre Zielstrebigkeit haben wesentlich zum Gelingen des AnkX-Projekts beigetragen. Die gelegentlichen Heimfahrten direkt vor meine Haustür sind ihr ebenfalls hoch anzurechnen.

Prof. Dr. Johannes Buchner für die Bereitstellung zahlreicher Laborgeräte.

Carolin Rulofs für ihre außergewöhnliche technische Unterstützung im Laboralltag sowie für ihre regelmäßige und lebhaftige Gesellschaft in der Mensa.

Der gesamten AG Proteinchemie für eine kollegiale und einzigartige Arbeitsatmosphäre. Sowohl die hilfreichen und anregenden Diskussionen als auch der ein oder andere Schabernack haben den Laboralltag ebenso produktiv wie unterhaltsam gestaltet.

Meiner Familie für ihre liebevolle Unterstützung und ihren Rückhalt in jeglicher Situation.

Meinen Freunden aus München und Donauwörth, die in den stressigen Phasen meiner Promotion stets ein offenes Ohr und Zeit für ein Bierchen hatten.

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, September 2019

(Stefan Ernst)