

Peptid-vermittelte chemische Modifikation intrazellulärer Proteine

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

eingereicht an der

Fakultät für Chemie und Chemische Biologie

der Technischen Universität Dortmund

von

M. Sc. Christiane Stiller

Dortmund, Oktober 2016

Bei dieser Veröffentlichung handelt es sich um eine Dissertation der Fakultät Chemie und Chemische Biologie an der Technischen Universität Dortmund.

Erstgutachter: Prof. Dr. Daniel Summerer

Technische Universität Dortmund

Fakultät Chemie und Chemische Biologie

Otto-Hahn-Straße 4a, 44227 Dortmund, Deutschland

Zweitgutachter: Prof. Dr. Tom N. Grossmann

VU University Amsterdam

Department of Chemistry & Pharmaceutical Sciences

De Boelelaan 1083, 1081 HV, Amsterdam, Niederlande

Die vorliegende Arbeit wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Tom N. Grossmann am Chemical Genomics Centre der Max-Planck-Gesellschaft von November 2012 bis Oktober 2016 durchgeführt.

Eingereicht am: 17.11.2016

Mündliche Prüfung: 08.12.2016

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Tom N. Grossmann für die interessante Themenstellung und die Möglichkeit zur weitgehend selbstständigen Bearbeitung des Themas. Zudem möchte ich mich für seine Diskussionsbereitschaft bedanken.

Herrn Prof. Dr. Summerer möchte ich für die Bereitschaft, sich als Erstgutachter zur Verfügung zu stellen, herzlich danken.

Der Abteilung für Systemische Zellbiologie unter Prof. Dr. Philippe Bastiaens des Max-Planck-Institutes für molekulare Physiologie in Dortmund danke ich für die Möglichkeit ihre Mikroskope und Durchflusszytometer zu nutzen. Mein Dank geht insbesondere an Dr. Sven A. H. Müller und Dr. Michael Schulz für die bereitwillige Einweisung in die Geräte und Hilfe bei technischen Problemen.

Für das Design und die Klonierung der cysteinenthaltenden Proteinvarianten sowie die Einführung in Arbeiten mit dem verwendeten Modellsystem danke ich Herrn Dr. Nicolas Brauckhoff und seinem Masterstudenten Hazem Salamon. Für die anfängliche Hilfe bei Western Blot Analysen und Mikroinjektionen gilt mein Dank der gesamten Arbeitsgruppe Wu, insbesondere Herrn Fu Li und Frau Dr. Hana Návarová. Bei Simone Brand, Laura Dietrich und Frau Dr. Nicole Pospiech möchte ich mich für nützliche Diskussionen zu allen Aspekten der humanen Zellkultur bedanken.

Herrn Dr. Dennis M. Krüger danke ich für die Durchführung der molekulardynamischen Simulationen, welche einen interessanten Einblick in die Ursachen der Reaktivitäten meines Modellsystems ermöglichten. Frau Dr. Petra Janning danke ich für die Diskussionen rund um die HPLC-MS²-Analyse meiner Proteine und Proteinkonjugate sowie für die Durchführung und gemeinsame Auswertung der zugehörigen analytischen Messungen.

Für das angenehme Arbeitsklima und die stete Hilfs- und Diskussionsbereitschaft danke ich allen Mitgliedern des Chemical Genomics Centers. Für angenehme Pausen mit Kuchen und Frozen Joghurt danke ich meiner Arbeitsgruppe. Arne Küpper danke ich zusätzlich für die sorgfältige Korrektur dieser Arbeit.

Mein größter Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden, die mich nicht nur in Studienangelegenheiten beraten und unterstützen.

Abstract

The intracellular location of proteins plays an important role in regulation of cell functions. To translocalize proteins *in cellulo* mainly peptidic localization signals are used in nature.¹ These can be regulated in a time dependent manner via posttranslational modifications. To artificially control protein translocation dimerization systems are state of the art.² They require genetic modifications of the protein of interest, which prevents the translocation of endogenous proteins.

Chemical modification of endogenous proteins is an important aspect of Chemical Biology research.³ Herein, the concept of proximity-induced reactions is considered a very promising approach: Through affinity induced attachment of a ligand to its target protein, an electrophilic group of the ligand is brought into proximity of proteinogenic nucleophiles thereby inducing a chemical reaction.⁴ Most of the known proximity-induced reactions for protein labeling employ small molecular ligands, which bind to highly defined binding pockets of their target proteins.

In the first part of this thesis a model system for a proximity-induced reaction with a peptidic ligand was developed expanding the concept towards ligands capable of targeting flat protein surfaces. For this purpose the peptide ligand was modified with an α -chloroacetamide, which reacts in a highly specific manner with site-specifically introduced cysteines on the surface of the target protein. Positions of cysteines and ligand structure were optimized thoroughly with a rational approach partly guided by molecular dynamic simulations. The most efficient proximity-induced reaction showed a high initial reaction rate ($v = 34 \pm 1.9 \text{ nM} \cdot \text{s}^{-1}$) and acceleration factor ($v_{rel} = 9300 \pm 500$) in comparison to a non-proximity induced reaction. Half time of the reaction ($\tau = 5 \text{ min}$) ranges in the upper section of published proximity-induced reactions.⁵⁻¹⁷

In the second part of this thesis the established model system was applied to the translocation of the target protein in human HeLa-cells. Therefore, the ligand was C-terminally elongated with peptidic localization signals. One of them localized cytosolic proteins into the endomembrane system. This is the first utilization of a proximity-induced reaction apart from protein labeling,¹⁸ thereby broadening the application scope of this highly valuable concept.

Zusammenfassung

Die zelluläre Proteinlokalisierung spielt eine wichtige Rolle in der Regulation von Zellfunktionen. Um den Aufenthaltsort eines Proteins in Zellen zu regulieren werden in der Natur u. a. peptidische Lokalisationssignale verwendet.¹ Um die Translokalisierung von Proteinen künstlich zu beeinflussen werden hauptsächlich Dimerisierungssysteme verwendet, bei welchen das Zielprotein genetisch modifiziert werden muss.²

Die kovalente Modifikation endogener Proteine durch chemische Reaktionen ist ein wichtiges Forschungsgebiet der Chemischen Biologie.³ Ein besonders vielversprechendes Konzept stellen dabei nachbarschaftsinduzierte Reaktionen dar: Ein Ligand des Zielproteins assoziiert mit diesem, wodurch eine elektrophile Gruppe des Liganden in räumliche Nähe zu nukleophilen Aminosäureseitenketten des Proteins gebracht wird und mit diesen reagiert.⁴ Bisher basieren die meisten nachbarschaftsvermittelten Reaktionen auf niedermolekularen Liganden, die in definierte Bindetaschen ihres Zielproteins binden.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde ein Modellsystem zur nachbarschaftsinduzierten Modifikation mit Hilfe eines peptidischen Liganden etabliert. Dadurch wird das Konzept der nachbarschaftsinduzierten Reaktion auf die Bindung an flache Proteinoberflächen erweitert. Im Rahmen dieser Untersuchungen wurde der peptidische Ligand mit einer α -Chloracetamidgruppe modifiziert, welche mit im Zielprotein installierten Cysteinen hoch spezifisch reagiert. Hierbei wurde besonderer Wert auf eine durch molekulardynamische Simulationen gestützte Optimierung der Position der proteinogenen Cysteine und der Ligandstruktur gelegt. Die effizienteste nachbarschaftsvermittelte Reaktion zeigte eine hohe initiale Reaktionsgeschwindigkeit ($v = 34 \pm 1,9 \text{ nM} \cdot \text{s}^{-1}$) und war mit einer relativen Geschwindigkeit von $v_{rel} = 9300 \pm 500$ deutlich schneller als eine vergleichbare nicht-nachbarschaftsinduzierte Reaktion. Zudem liegt die Reaktion mit einer Halbwertszeit von fünf Minuten im oberen Bereich publizierter nachbarschaftsvermittelter Reaktionen.⁵⁻¹⁷

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde das Modellsystem zur Translokalisierung von in HeLa-Zellen exprimierten Zielproteinen verwendet. Hierzu wurde der Ligand C-terminal mit peptidischen Lokalisationssignalen modifiziert. Eine dieser Sequenzen translokalisierte das Zielprotein in das Endomembransystem der Zellen, wodurch zum ersten Mal eine nachbarschaftsinduzierte Reaktion zur Lokalisation eines zellulären Proteins genutzt wurde.¹⁸

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Zelluläre Proteinlokalisierung	1
1.1.1	Zelluläre Kontrollmechanismen der Proteinlokalisierung	1
1.1.2	Zellkerntransport	1
1.1.3	Membranlokalisierung	4
1.2	Artifizielle Proteinmodifizierung	9
1.2.1	Genetische Modifizierung von Proteinen	9
1.2.2	Genetische Proteinmanipulation zur chemischen Modifizierung	10
1.2.3	Chemische Modifizierung von Proteinen	17
2	Zielsetzung	22
3	Ergebnisse und Diskussion	23
3.1	Wahl des Modellsystemes	23
3.2	Expression und Charakterisierung von Proteinvarianten	29
3.2.1	Expression und Aufreinigung von Proteinvarianten	29
3.2.2	Massenspektrometrische Charakterisierung der Proteinvarianten	31
3.2.3	Bestimmung der thermischen Proteinstabilität	32
3.3	Design und Synthese von Ligandvarianten	34
3.3.1	Norleucin-enthaltende Liganden	34
3.3.2	Kohlenwasserstoff-verbrückte Liganden	38
3.3.3	Liganden mit verminderter Affinität	41
3.4	Charakterisierung von Protein-Ligand-Paaren für nachbarschaftsinduzierte Reaktionen	43
3.4.1	Synthese reaktiver Liganden	43
3.4.2	Reaktivitätstest	44
3.4.3	Bestimmung der initialen Reaktionsgeschwindigkeit einzelner Protein-Ligand-Paare	47
3.4.4	Massenspektrometrische Analyse des P(C638)-L9-Konjugates	49
3.4.5	Evaluierung von Nebenreaktionen	51
3.5	Zelluläre Translokalisierung des Zielproteins	54
3.5.1	Systemübertragung auf humane Zellen	54
3.5.2	Identifizierung geeigneter Lokalisationssequenzen	65
3.5.3	Zelluläre Translokalisierung von P(C638)-mCherry	68
3.6	Diskussion	74
4	Zusammenfassung	80

5	Material und Methoden	83
5.1	Materialien	83
5.1.1	Geräte	83
5.1.2	Verbrauchsmaterialien und Kits	92
5.1.3	Allgemeine Chemikalien	97
5.1.4	Aminosäuren und Trägermaterialien	98
5.1.5	Lösungen, Medien und Puffer	99
5.1.6	Enzyme und Reagenzien	105
5.1.7	Rekombinante Plasmidvektoren	106
5.1.8	Primer	107
5.1.9	<i>Escherichia Coli</i> Zelllinien	109
5.1.10	Humane Zelllinien	109
5.1.11	Software	110
5.2	Methoden zur Plasmidmodifikation und -isolation	112
5.2.1	Herstellung chemisch kompetenter <i>Escherichia coli</i> Zellen	112
5.2.2	Transformation chemisch kompetenter <i>Escherichia coli</i> Zellen	112
5.2.3	Plasmidpräparationen	113
5.2.4	Konzentrationsbestimmung von DNS mittels UV/Vis-Spektroskopie	114
5.2.5	Präparative Polymerasekettenreaktion	115
5.2.6	Analytische Agarosegelelektrophorese	120
5.2.7	Aufreinigung von Polymerasekettenreaktionsansätzen	120
5.2.8	Restriktions-Ligations-Klonierungen	121
5.2.9	<i>In vivo</i> -Klonierung der pGEX-4T5-P-mCherry-Vektoren	123
5.2.10	Analytische Polymerasekettenreaktion	124
5.2.11	Sequenzierungen	126
5.2.12	Glycerinkultur	127
5.3	Techniken zur Expression, Isolation und Analyse von Proteinen	128
5.3.1	Expression und Isolation der Proteinvarianten	128
5.3.2	Expression und Isolation von mCherry-Fusionsproteinen	131
5.3.3	Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen mittels UV/Vis-Spektroskopie	133
5.3.4	Lagerung der Proteine	134
5.3.5	Polyacrylamidgelelektrophorese	134
5.3.6	Western Blot Analyse von SDS-Polyacrylamidgelen	137
5.3.7	Analytische Hochleistungsflüssigkeitschromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie der Proteinvarianten	140
5.3.8	Tryptischer <i>In-Gel</i> -Verdau und analytische Hochleistungs-flüssigkeitschromatographie gekoppelt mit Tandem-Massenspektrometrie der Proteinvarianten	141
5.3.9	Bestimmung der thermischen Proteinstabilität	143

5.4	Techniken zur Synthese und Analyse von Peptiden	144
5.4.1	Manuelle Festphasenpeptidsynthese	144
5.4.2	Automatische Festphasenpeptidsynthese	150
5.4.3	Testabspaltungen	152
5.4.4	Vollabspaltungen	153
5.4.5	Präparative Umkehrphasen-Flüssigkeitschromatographie	153
5.4.6	Analytische Hochleistungsflüssigkeitschromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie	155
5.4.7	Analytische Hochleistungsflüssigkeitschromatographie	156
5.4.8	Konzentrationsbestimmung aufgereinigter Peptide	156
5.4.9	Gefriertrocknung und Lagerung aufgereinigter Peptide	157
5.4.10	Ansetzen von DMSO-Stammlösungen	158
5.5	Techniken zur Analyse von nicht-kovalenten Protein-Peptid-Komplexen	159
5.5.1	Fluoreszenzpolarisationsspektroskopie	159
5.6	Molekulardynamische Simulationen	162
5.6.1	Strukturmodifizierung für molekulardynamische Simulationen	162
5.6.2	Molekulardynamische Simulationen	162
5.6.3	Auswertung der molekulardynamischen Simulationen	164
5.7	Techniken zur kovalenten Modifizierung von Proteinen mit Peptiden	165
5.7.1	Reaktivitätstest	165
5.7.2	Reaktionen zur Bestimmung der initialen Reaktionsgeschwindigkeit einzelner Protein-Ligand-Paare	165
5.7.3	Bestimmung von Reaktionsausbeuten und initialen Reaktionsgeschwindigkeiten mittels analytischer Hochleistungsflüssigkeitschromatographie	167
5.7.4	Analytische Hochleistungsflüssigkeitschromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie des Konjugates P(C638)-9L-f	170
5.7.5	Tryptischer <i>In-Gel</i> -Verdau und analytische Hochleistungs-flüssigkeitschromatographie gekoppelt mit Tandem-Massenspektrometrie des Protein-Ligand-Konjugates P(C638)-9L-f	171
5.7.6	Markierungsexperimente in Zelllysaten	173
5.7.7	Pulldown-Experimente	175
5.8	Techniken zur Kultivierung und Manipulation von humanen Zellen	180
5.8.1	Kultivierung humaner Zellen	181
5.8.2	Untersuchung der Zellpermeabilität verschiedener Liganden	183
5.8.3	Transfektion humaner Zelllinien	183
5.8.4	Adhäsionstest für Hek293-Zellen	186
5.8.5	Zelllyse	186
5.8.6	Etablierung poly- und monoklonaler Hek293-Zelllinien	187
5.8.7	Konfokale Mikroskopie	190
5.8.8	Mikroinjektion	191

6	Abkürzungsverzeichnis	194
7	Literaturverzeichnis	203
8	Anhang	229
8.1	Daten zu Plasmiden	229
8.1.1	Vektorkarten	229
8.1.2	DNS-Sequenzen exprimierter Proteine	239
8.2	Daten zur Proteinexpression und -charakterisierung	247
8.2.1	Aminosäuresequenzen exprimierter Proteine	248
8.2.2	Exemplarische SDS-Polyacrylamidgele der Proteinaufreinigungen	251
8.2.3	Daten zur massenspektrometrischen Untersuchung der Proteinvarianten	255
8.2.4	Daten zur thermischen Proteinstabilität	264
8.3	Daten zur massenspektrometrischen Untersuchung der Liganden und Lokalisationssignale	265
8.3.1	Analytische Hochleistungsflüssigkeitschromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie	265
8.3.2	Daten der hochaufgelösten Massenspektrometrie	307
8.4	Daten zur Charakterisierung nicht-kovalenter Protein-Ligand-Komplexe	308
8.4.1	Fluoreszenzpolarisationspektroskopie	308
8.5	Daten zur nachbarschaftsinduzierten Proteinmodifikation	312
8.5.1	Rohdaten des Reaktivitätstests	314
8.5.2	Rohdaten der Reaktionen zur Bestimmung der initialen Reaktionsgeschwindigkeiten	316
8.5.3	Daten zur massenspektrometrischen Analyse des P(C638)-L9-Konjugates	320
8.6	Daten zu <i>in cellulo</i> Experimenten	322
8.6.1	Mikroskopische Aufnahmen der Zellpermeabilitätsuntersuchungen	322
8.6.2	Mikroskopische Aufnahmen der Zelltransfektionen	323
8.6.3	Western Blots der Expressionsanalysen	329
8.6.4	Aufnahmen der SDS-Polyacrylamidgele des Lysatlabels	332
8.6.5	Konfokale Mikroskopaufnahmen der Lokalisationsexperimente	334

1 Einleitung

1.1 Zelluläre Proteinlokalisierung

1.1.1 Zelluläre Kontrollmechanismen der Proteinlokalisierung

Eine Zelle muss viele verschiedene Umwelteinflüsse erkennen und durch Regulation ihrer Funktionen verarbeiten. Diese Zellfunktionen können zum einen durch Proteinsynthese oder -degradation, zum anderen durch Beeinflussung vorhandener Proteine mittels posttranslationaler Modifikationen verändert werden.¹ Proteinmodifikationen sind im Vergleich zur Synthese oder Degradation schneller und energiesparender, sodass sie häufig für unmittelbare Reaktionen auf externe Einflüsse genutzt werden. Eine mögliche Folge posttranslationaler Modifikationen ist die Translokalisierung von Proteinen. Die Verteilung von Proteinen in verschiedene Zellkompartimente hängt von diversen Faktoren, wie der Art, Anzahl und Stärke der enthaltenen Lokalisationssignale sowie der Möglichkeit des Zusammentreffens der Proteine mit ihren Lokalisationssignalrezeptoren und ihrer Affinität zu diesen ab.^{1,19} Lokalisationsmechanismen vom Cytoplasma an die Innenseite der Plasmamembran und die Außenseiten der von Membranen umschlossenen Organellen sowie durch große Porenkomplexe wie z. B. beim Zellkern- oder Peroxisomentransport können mit nativ gefalteten Proteinen erfolgen und sind häufig reversibel. Im Gegensatz dazu erfordern Mechanismen zur Lokalisation ins Endoplasmatische Reticulum (ER) oder in die Mitochondrien ungefaltete Proteine und erfolgen häufig irreversibel.¹

1.1.2 Zellkerntransport

Der Nukleus eukaryotischer Zellen wird vom Cytoplasma durch die Kernmembran getrennt. Der Transport zwischen diesen beiden Kompartimenten erfolgt durch Kernporen, welche die Membran durchspannen. Kernporen sind Multiproteinkomplexe aus etwa 30 verschiedenen Nukleoporinen mit einer Gesamtgröße von ca. 120 MDa, wobei die Gruppe der Phenylalanin/Glycin- (FG-)reichen Nukleoporine in der Mitte der Pore eine Barriere bildet.^{19,20} Kleine Moleküle und Proteine (Durchmesser $< 45 \text{ \AA}$, Molekulargewicht $\sim 40 \text{ kDa}$)^{19,21} können durch Kanäle innerhalb dieser Barriere diffundieren. Größere Proteine müssen von Karyopherinen translokalisiert werden,¹ welche mit den FG-reichen Nukleoporinen interagieren.²⁰ Die Karyopherine werden in Importine für den Kernimport

und Exportine für den Kernexport unterschieden. Die Bindung an die beiden Proteingruppen wird über peptidische Lokalisationssignale gesteuert. Die meisten nuklearen Lokalisationssignale (NLS) gehören zu den klassischen NLS, welche aus Abschnitten basischer Aminosäuren bestehen. Dabei wird zwischen NLS mit einem Abschnitt (monopartite NLS) und solchen mit zwei Abschnitten (bipartite NLS), welche durch ca. zehn Aminosäuren getrennt sind, unterschieden.^{22,23}

Der am besten untersuchte Kernimportmechanismus beginnt mit der Bindung von Importin α an das NLS eines seiner Substratproteine (Abbildung 1).¹ Nach Anlagerung von Importin β transportiert dieses den trimeren Komplex durch die Kernpore. Im Nukleus bindet die kleine GTPase Ran in ihrer aktiven, Guanosintriphosphat (GTP) bindenden Form (Ran-GTP) an Importin β , induziert in diesem eine Konformationsänderung und führt somit zum Zerfall des trimeren Importkomplexes. Das Substratprotein befindet sich nun im Nukleus. Importin β translokalisiert im Komplex mit Ran-GTP zurück in das Cytoplasma. Importin α bindet an Exportin 2 und Ran-GTP, um ins Cytoplasma transportiert zu werden. Diese Bindungen an Ran-GTP geben die Richtung des Transportes vor. Im Cytoplasma angelangt, wird die GTPase-Aktivität von Ran durch Interaktion mit seinem GTPase aktivierendem Protein (GAP) erhöht, sodass Ran sein gebundenes GTP zu Guanosindiphosphat (GDP) umsetzt. Um Ran-GDP zurück in den Nukleus zu transportieren, muss dieses an den nuklearen Transportfaktor 2 (NTF2) binden. Im Nukleus wird Ran-GDP von seinem GTP-Austauschfaktor (GEF) zu Ran-GTP umgewandelt, wobei neben GDP auch NTF2 freigesetzt wird, welches dank seiner geringen Größe frei durch die Kernporen diffundieren kann.

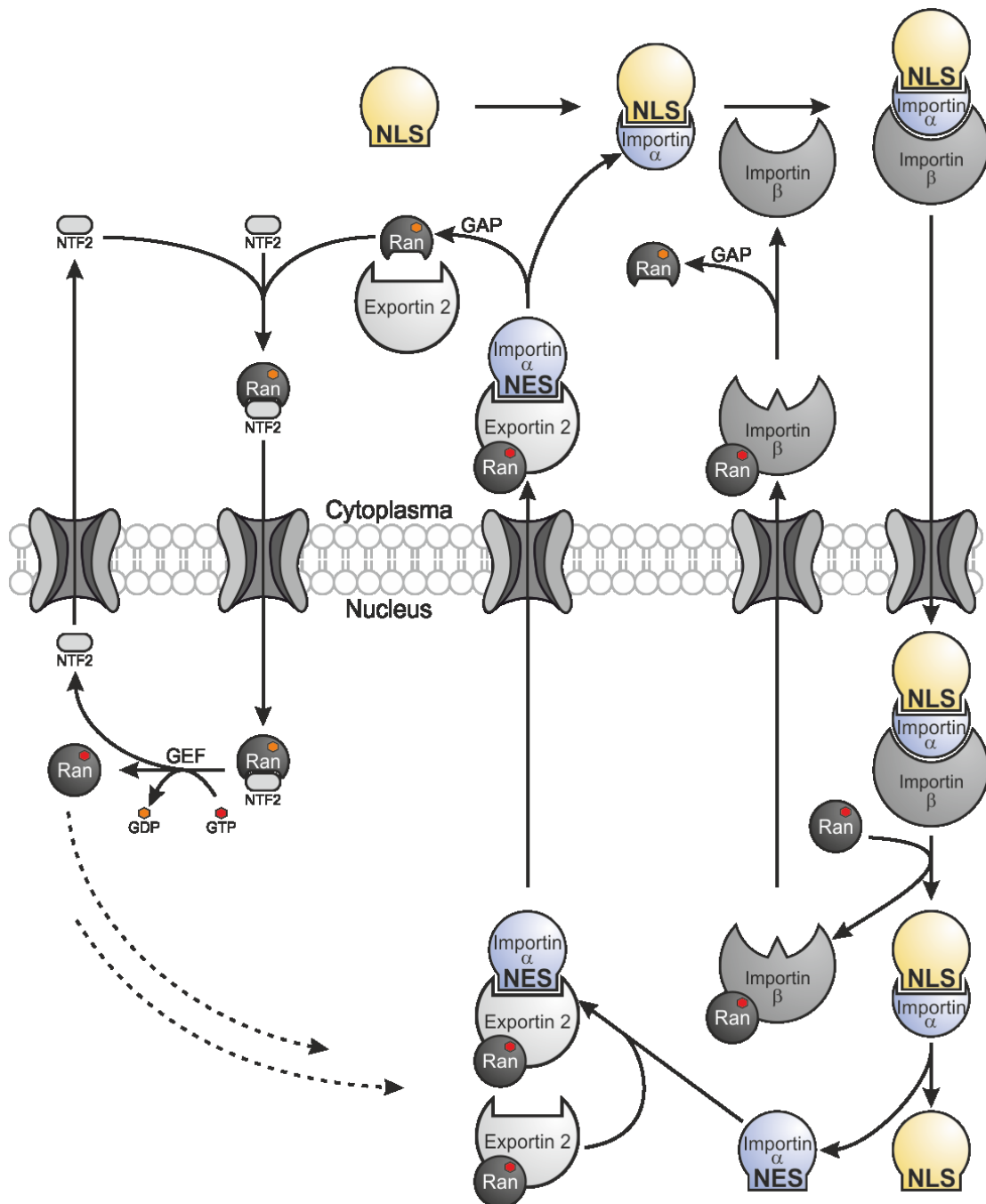


Abbildung 1: Exemplarischer Mechanismus eines Zellkerntransportes. Substratproteine (gelb) mit nuklearem Lokalisationssignal (NLS) werden von Importinen (dunkelgrau) durch die Kernporen in den Nucleus transportiert, Substratproteine (blau) mit Kernexportsignal (NES) werden von Exportinen (hellgrau) aus dem Nucleus entfernt. Der Zellkerntransport wird durch den Energieumsatz der kleinen GTPase Ran (schwarz) im Zusammenspiel mit ihrem GTPase-aktivierendem Protein (GAP) und ihrem GTP-Austauschfaktor (GEF) gesteuert. NTF2: Nuklearer Transportfaktor 2.

Beim Kernexport bindet i. d. R. ein Protein, welches ein Kernexportsignal (NES) enthält, an einen Ran-GTP/Exportin-Komplex. Klassische NES bestehen aus hydrophoben Aminosäuresequenzen, in denen häufig Leucin vorkommt, und die vom Exportin 1

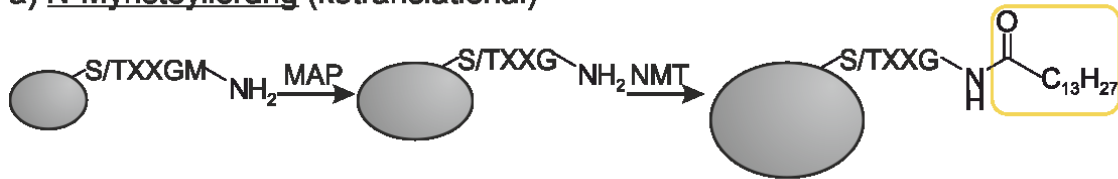
transportiert werden.²⁴ Typische Beispiele sind die NES des rev-Proteins aus dem Humanen Immundefizienz Virus 1 (HIV-1)²⁵ oder die NES aus dem cAMP-abhängigen Proteinkinaseinhibitor α (PKI α).²⁶

Um den Kerntransport von Proteinen zeitlich zu regulieren, enthalten diese meist ein oder mehrere NLS bzw. NES. Welche dieser Signalsequenzen erkannt werden, hängt z. B. von posttranslationalen Modifikationen oder Interaktionen des Proteins ab. So können NLS und NES durch Phosphorylierung oder Acetylierung an benachbarten Aminosäuren abgeschwächt oder verstärkt werden.^{1,27,28} Durch Interaktionen mit anderen Proteinen oder Substratmolekülen können NLS und NES verdeckt und somit vor der Interaktion mit Karyopherinen geschützt werden.^{29,30} Tertiäre NLS/NES, die durch räumliche Nachbarschaft ihrer Aminosäuren in der Tertiärstruktur eines Proteins ausgebildet werden, lassen sich durch Konformationsänderungen steuern, da die NLS/NES nur in einer der Proteinkonformationen die zur Detektion benötigte räumliche Anordnung besitzt.^{31,32}

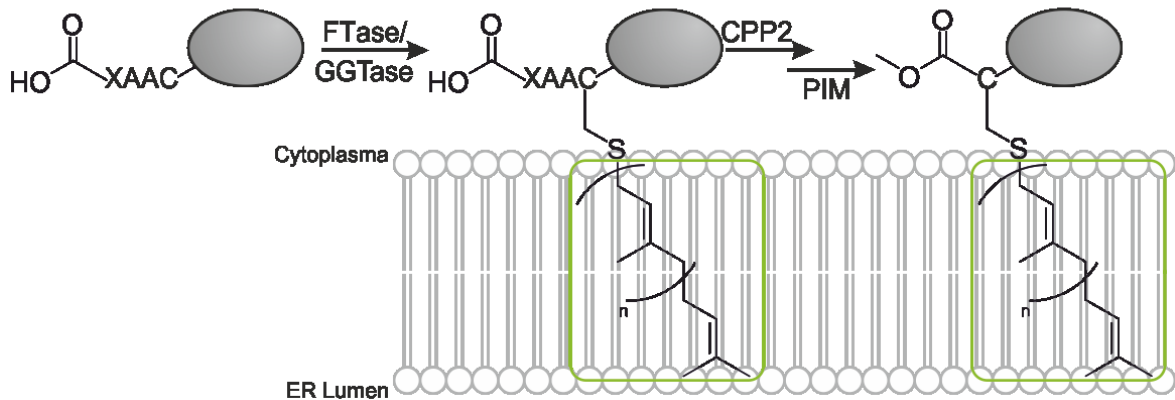
1.1.3 Membranlokalisation

Um Proteine in unterschiedliche Membranen einer Zelle zu lokalisieren, können diese durch Transmembranhelices dauerhaft insertiert werden. Diese Insertion erfolgt meist kotranslational im ER und ist irreversibel.¹ Zur reversiblen Membranlokalisation werden Proteine häufig mit Membrankankern (MAs) modifiziert, welche durch hydrophobe Wechselwirkungen mit Membranlipiden interagieren.³³ Die wichtigsten dieser MAs sind die Fettsäuren Myristin- und Palmitinsäure, die im Rahmen der *N*-Myristoylierung bzw. *S*-Palmitoylierung an Proteine gebunden werden, sowie die Isoprenoide Farnesyl und Geranylgeranyl, mit denen Proteine während der *S*-Prenylierung modifiziert werden (Abbildung 2).

a) N-Myristoylierung (kotranslational)



b) S-Prenylierung



c) S-Palmitoylierung



Abbildung 2: Proteinmodifikationen mit lipophilen Gruppen. a) *N*-Myristoylierung: Von Proteinen mit einer Erkennungssequenz wird kontranslational zunächst durch die Methionin-Aminopeptidase (MAP) das *N*-terminale Methionin entfernt. Anschließend wird die endständige Aminfunktion des Glycins durch die *N*-Myristoyltransferase (NMT) myristoyliert. b) *S*-Prenylierung: Nach einer Prenylierungsreaktion durch eine Farnesyl- oder Geranylgeranyltransferase (FTase/GGTase) innerhalb der *C*-terminalen Erkennungssequenz im Cytoplasma werden die Proteine an der Membran des endoplasmatischen Reticulums (ER) durch die CAAX Prenylprotease 2 (CPP2) und die Protein-*S*-Isoprenylcystein-O-Methyltransferase (PIM) modifiziert, sodass ein *C*-terminal methyliertes Cystein mit einer Thioetherbindung zum Prenylrest entsteht. c) *S*-Palmitoylierung: Bei der reversiblen *S*-Palmitoylierung werden Cysteine durch Palmitoyltransferasen (PATs) modifiziert, wobei ein Thioester entsteht. Die Gegenreaktion wird durch Palmitoylproteinthioesterasen (PTEs) katalysiert.

Bei der *N*-Myristoylierung wird von der *N*-terminalen Erkennungssequenz MGXXS/T zunächst das Methionin durch die Methionin-Aminopeptidase (MAP) entfernt.^{34,35} Anschließend modifiziert eine *N*-Myristoyltransferase (NMT) die nun freiliegende Aminogruppe des Glycins unter Umsatz von myristoyliertem Coenzym A mit Myristinsäure (Abbildung 2a).³⁶ Durch die hohe Stabilität der entstehenden Amidbindung ist die *N*-Myristoylierung irreversibel.³⁴ Da die bei Insertion einer Myristoylgruppe in eine Membran freigesetzte Energiemenge vergleichsweise gering ist,³⁷ sind *N*-myristoylierte

Proteine reversibel an Membranen gebunden und benötigen weitere Lokalisationssignale für eine irreversible Assoziation (s. u.).³⁴

Im Rahmen der S-Prenylierung werden die Proteine unter Umsatz von Farnesyl- oder Geranylgeranylpyrophosphat am Cystein einer C-terminalen Erkennungssequenz modifiziert (Abbildung 2b). Die klassische CAAX-Box wird von der Farnesyltransferase (FTase) erkannt, wenn an Position vier die Aminosäure M, S, A oder Q vorliegt. Sie modifiziert das Cystein über einen Thioether mit einem Farnesylrest. Bei der Aminosäure L oder I wird die Sequenz von der Geranylgeranyltransferase 1 (GGTase 1) erkannt und ein Geranylgeranylrest übertragen.³⁸ Durch diese Prenylierung erhält das Protein eine Affinität für die Membran des ER, in welcher die Transmembranproteine CAAX Prenylprotease 2 (CPP2) und Protein-S-isoprenylcysteine-O-methyltransferase (PIM) vorliegen. Die Prenylprotease entfernt die Aminosäuren AAX und die O-Methyltransferase modifiziert den freigesetzten C-Terminus des prenylierten Cysteins. Die Prenylierung von Proteinen ist durch die hohe Stabilität ihrer Thioetherbindung und die angeschlossene Proteolyse irreversibel.³³ Während ein einfach farnesyliertes Protein keine ausreichende Affinität besitzt, um dauerhaft an Membranen zu binden, genügt ein einzelner Geranylgeranylrest für eine permanente Lokalisation.³⁹ Dennoch gibt es für beide Arten von prenylierten Proteinen Mechanismen, um eine Translokalisierung zu bewirken (s. u.).³⁴

Die S-Palmitoylierung von Proteinen erfolgt reversibel an Cysteinen, jedoch ist bisher keine Erkennungssequenz für die Modifizierung mit diesem MA bekannt.³⁴ Bei ihr wird von Palmitoyltransferasen (PATs) unter Umsatz von palmitoyliertem Coenzym A ein Thioester zwischen Protein und Palmitinsäure aufgebaut (Abbildung 2c).^{40,41} Dieser lässt sich durch die katalytische Aktivität von Palmitoylproteinthioesterasen (PTEs) wieder abbauen.^{42,43} Die Affinität eines einzelnen Palmitinrestes ist für eine dauerhafte Membranassoziation nicht ausreichend, sodass auch dieser MA mit anderen Mechanismen kombiniert werden muss, um eine stabile Lokalisation zu erreichen (s. u.).³⁴

Um die Membranlokalisation von Proteinen zeitlich zu steuern, gibt es eine Vielzahl unterschiedlicher Mechanismen, von denen hier einige Beispiele dargestellt werden (Abbildung 3).³⁴ Wie bereits beschrieben, assoziiert ein geranylgeranyliertes Protein dauerhaft an Membranen. Zur Dissoziation bindet z. B. ein interagierendes Protein die Geranylgeranylgruppe in einer hydrophoben Tasche und ermöglicht so ihre Membranextraktion (Abbildung 3, Mechanismus 1).^{44,45}

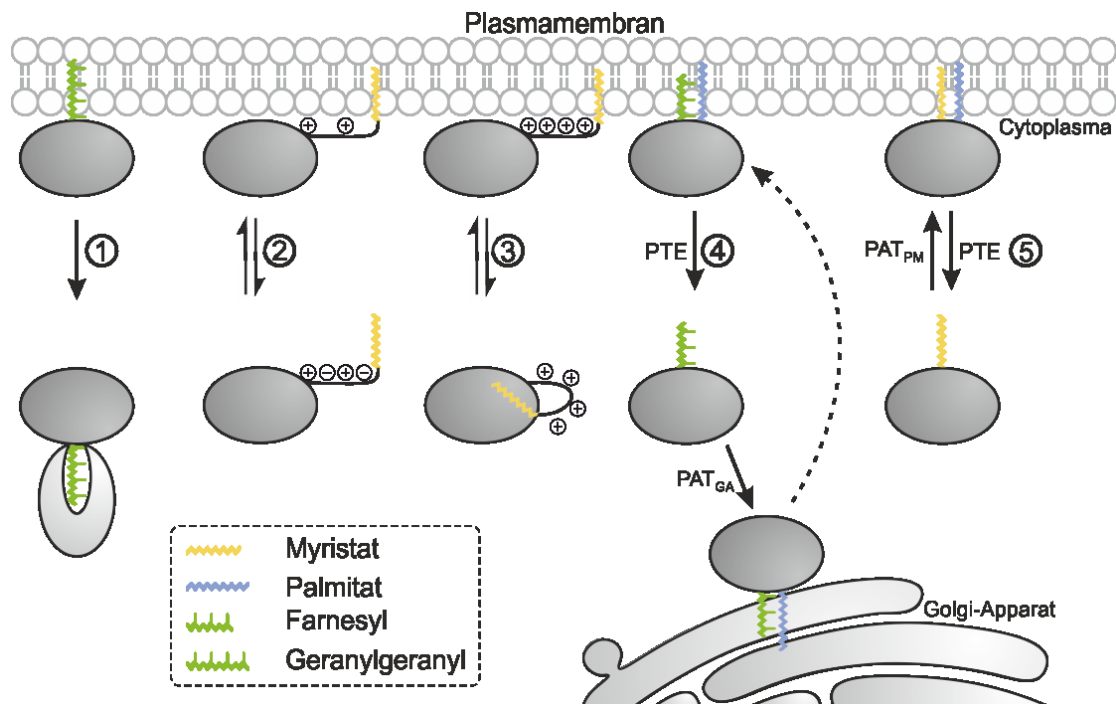


Abbildung 3: Mechanismen zur reversiblen Membranlokalisation von Proteinen (dunkelgrau) mit MAS. 1: Membranextraktion durch Interaktionspartner (hellgrau) von geranylgeranylierten Proteinen. 2: Polybasischer Schalter. 3: Myristoylschalter. 4+5: Reversible S-Palmitoylierung mit im Golgi-Apparat (GA) bzw. der Plasmamembran (PM) lokalisierter Palmitoyltransferase (PAT). Die Gegenreaktion wird durch Palmitoylproteinthioesterasen (PTEs) katalysiert.

Um die Membranaffinität von Proteinen zu erhöhen können mehrere membranbindende Modifizierungen kombiniert werden. Die *N*-Myristoylierung wird häufig mit polybasischen Schaltern kombiniert (Abbildung 3, Mechanismus 2). Dabei interagieren positiv geladene Abschnitte auf der Proteinoberfläche mit negativ geladenen Kopfgruppen der Membranlipide. Durch Phosphorylierung wird die Ladung der basischen Aminosäuren ausgeglichen und die Membrandissoziation begünstigt. Durch die Reversibilität der Phosphorylierung lässt sich die Membranlokalisation steuern.⁴⁶ Alternativ kann bei Myristoylschaltern durch eine Konformationsänderung des Proteins die Myristoylgruppe in eine hydrophobe Tasche binden, sodass die Membranaffinität verringert wird (Abbildung 3, Mechanismus 3). Die Konformationsänderung kann dabei sowohl von kleinen Liganden als auch Protein-Protein-Interaktionen (PPIs) ausgelöst werden.^{47,48}

Auch die Kombination zweier MAS wird zur reversiblen Membranlokalisation verwendet. So werden myristoylierte oder farnesylierte Proteine häufig reversibel palmitoyliert, wodurch ihre Membranassoziation gesteuert werden kann (Abbildung 3, Mechanismus 4&5). Eine wichtige Rolle spielt dabei die palmitoylierende PAT, welche als

Transmembranprotein in einer definierten Membran der Zelle vorliegt.³³ Durch die Palmitoylierung ihrer Substratproteine werden diese in derselben Membran angereichert. Dieser als „*kinetic trapping*“ bezeichnete Prozess induziert nicht nur eine generelle Membrananlagerung, sondern bestimmt die genaue Zellmembran.⁴⁹ Hierdurch lässt sich ein Protein gezielt zwischen verschiedenen Membranen transportieren, indem es z. B. im Golgi-Apparat palmitoyliert wird und durch vesikulären Transport zur Plasmamembran gelangt. Durch Depalmitoylierung löst sich das Protein von der Plasmamembran und kann erneut über seine Myristoylgruppe mit allen Endomembranen reversibel interagieren. Bindet es dabei an den Golgi-Apparat wird es erneut palmitoyliert und der Transportzyklus wiederholt sich.

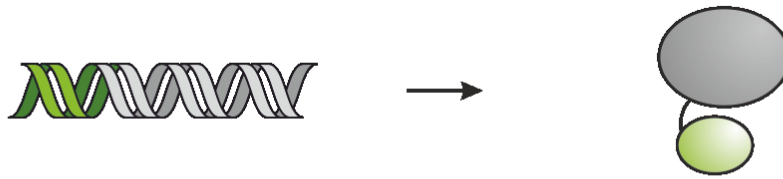
1.2 Artificielle Proteinmodifizierung

Da die Funktion eines Proteins mit seinem Aufenthaltsort in der Zelle zusammenhängt, ist die Kontrolle der Proteinlokalisierung von entscheidender Bedeutung für biologische und medizinische Fragestellungen.⁵⁰ Um künstlich auf diese einzuwirken, ist es notwendig das Zielprotein spezifisch innerhalb von Zellen oder Organismen zu modifizieren. Zu diesem Zweck gibt es eine Vielzahl von Methoden, die von einer rein genetischen Modifizierung bis zu einer ausschließlich chemischen Modifizierung reichen und dabei viele Zwischenstufen umfassen. Seit der Einführung dieser Methoden wurde eine Vielzahl unterschiedlicher Varianten entwickelt. Häufig werden diese zunächst *in vitro* charakterisiert und scheitern anschließend an der Übertragung auf die zugleich eingeschränkteren und komplexeren Reaktionsbedingungen *in cellulo* oder *in vivo*.⁵¹ Daher werden im Rahmen dieser Arbeit nur Systeme vorgestellt, die ihre Funktionalität unter diesen Bedingungen bereits gezeigt haben. Ein besonderer Fokus liegt dabei auf Methoden, die bereits häufig zur Lokalisationskontrolle von Proteinen genutzt wurden.

1.2.1 Genetische Modifizierung von Proteinen

Eine genetische Proteinmodifikation sorgt intrinsisch dafür, dass Modifikation und Zielprotein gemeinsam translatiert werden (Abbildung 4), sodass nur das Zielprotein modifiziert wird.⁵² Die rein genetische Modifizierung von Proteinen ist eine der wichtigsten Methoden zur Untersuchung von zellulären Prozessen.^{53,54} Z. B. wurden die Sequenzen einiger NLS und NES mittels genetischer Fusionierung entdeckt.^{22,23,25,26} Auch die Signalstärke verschiedener NLS oder NES lässt sich durch Fusionsproteine miteinander vergleichen.⁵⁵ Durch Fusion mit Erkennungssequenzen diverser Membrananker aufbauender Enzyme wird das Zielprotein co- oder posttranslational mit dem gewünschten MA modifiziert. So lassen sich sowohl die Zielmembranen der eingeführten Membrananker als auch ihre Bindungsstärke an unterschiedliche Membranen untersuchen.^{39,56,57} Ein Nachteil der rein genetischen Proteinmodifizierung ist die dauerhafte Modifizierung des Zielproteins: Durch die gemeinsame Expression ist es nicht möglich, die Modifizierung zu einem definierten Zeitpunkt einzubringen und zelluläre Effekte ihres Eintretens zu beobachten.⁵⁸

a)



b)

Fusionspartner	M / kDa	Sequenz
Kernexportsequenzen, z. B. aus HIV-1 rev PKI α	1,1 1,0	⁷⁶ LPPLERLTL ⁸⁴ ³⁷ LALKLAGLDI ⁴⁶
Kernlokalisationssequenzen, z. B. aus SV40 <i>large</i> T-Antigen Nucleoplasmin	0,9 1,7	¹²⁶ PKKKRKV ¹³² ¹⁵⁵ KRPAATKKAGQAKKK ¹⁷⁰
Membrananker, z. B. <i>N</i> -Myristoylierung	0,7	
<i>S</i> -Palmitoylierung	0,3	
<i>S</i> -Farnesylierung	0,2	
<i>S</i> -Geranylgeranylierung	0,3	

Abbildung 4: a) Rein genetische Proteinmodifikation. Durch Fusion der Gensequenz des Zielproteins (dunkelgrau) mit der Gensequenz für die gewünschte Proteinmodifikation (grün) werden diese gemeinsam exprimiert. b) Beispielhafte Liste von genetischen Modifikationen.^{22,23,25,26,33,34,38} HIV-1 rev: rev-Protein aus dem Humanen Immundefizienz Virus 1; PKI α : *cAMP-dependent protein kinase inhibitor α* , SV40: Simian-Virus 40.

1.2.2 Genetische Proteinmanipulation zur chemischen Modifizierung

Um die zeitliche Kontrolle über Proteinmodifizierungen zu erhalten, ist es von Vorteil, diese über eine chemische Reaktion einzuführen.⁵² Daher werden in der Praxis häufig Kombinationen aus genetischer und chemischer Proteinmanipulation genutzt, wobei eine genetisch eingebrachte Modifizierung mit einem chemischen Molekül zur Reaktion gebracht

wird. Da die Zugabe des chemischen Moleküls zu einem definierten Zeitpunkt erfolgt, kann so die Folge der finalen Proteinmodifizierung untersucht werden.

Ein wichtiges Beispiel für die Lokalisationssteuerung durch Kombination genetischer und chemischer Proteinmanipulationen stellen Dimerisierungssysteme dar (Abbildung 5).² Bei diesen müssen zwei genetische Modifizierungen des untersuchten Organismus vorgenommen werden. Zum einen wird das Zielprotein mit einer Dimerisierungsdomäne fusioniert. Zum anderen wird eine zweite Dimerisierungsdomäne gemeinsam mit der gewünschten Modifizierung exprimiert. Ein synthetischer Ligand, der so genannte Dimerisierer, bindet an beide Dimerisierungsdomänen, sodass das Zielprotein mit der gewünschten Modifizierung versehen wird. Hierbei muss zwischen Homo- und Heterodimerisierungssystemen unterschieden werden. Bei Homodimerisierungen werden nach Zugabe des Liganden zwei Zielproteine miteinander verbunden, sodass z. B. die Dimerisierung eines Transmembranrezeptors imitiert und dessen endogene Signalkaskade ausgelöst wird.⁵⁹ Heterodimerisierungssysteme ermöglichen die Interaktion von zwei verschiedenen Zielproteinen, indem jedes mit einer anderen Dimerisierungsdomäne fusioniert wird.⁶⁰⁻⁶³ Dabei ist es möglich, zwei Dimerisierungssysteme parallel zu exprimieren und durch Zugabe unterschiedlicher Liganden orthogonal zueinander zu steuern.⁶³ Dimerisierungssysteme wurden bereits erfolgreich zur Translokalisierung von Proteinen *in cellulo* und *in vivo* genutzt.⁶⁴⁻⁶⁶ Die meisten ihrer Liganden beruhen jedoch auf komplexen Naturstoffen, welche zum Teil kompliziert in der Synthese sind oder toxische Effekte aufweisen.⁶⁷ Zudem sind die Interaktionen zwischen den Domänen und ihrem Dimerisierer häufig nicht-kovalent, sodass ihre potentielle Reversibilität berücksichtigt werden muss.⁶⁸

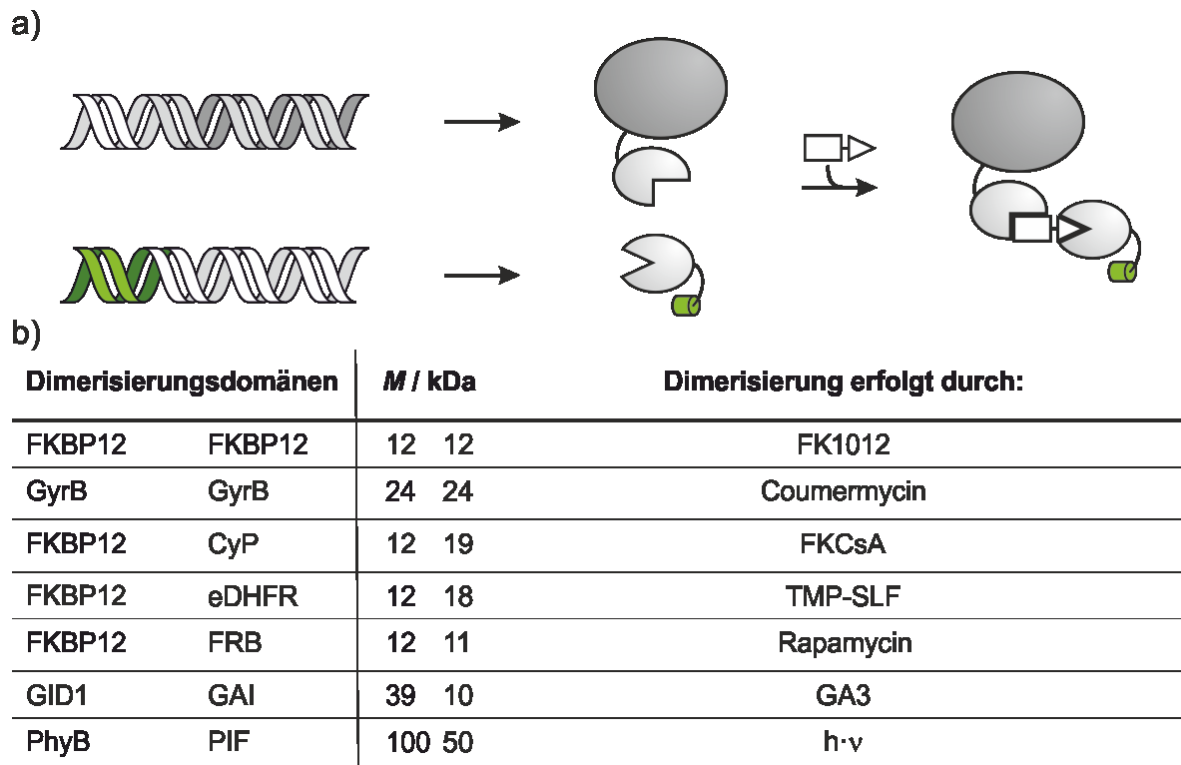


Abbildung 5: a) Chemisch-genetische Proteinmodifikation mit Hilfe eines Dimerisierungssystems. Zusätzlich zu den beiden genetisch eingebrachten Domänen des Dimerisierungssystems (hellgrau) als Fusionspartner des Zielproteins (dunkelgrau) und der gewünschten proteinogenen Modifikation (grün) wird ein passender Ligand (weiß) benötigt, der die beiden Dimerisierungsdomänen zeitlich gesteuert verbindet. b) Beispiele für *in cellulo* verwendete Dimerisierungssysteme.^{59–63,69,70} FKBP12: FK506 bindendes Protein 12; GyrB: B-Untereinheit der DNS-Gyrase; CyP: Cyclophilin; eDHFR: Dihydrofolatreduktase aus *Escherichia coli*; FRB: Fragment der humanen Serine/threonine-protein kinase mTOR; GID1: Gibberellin Rezeptor 1; GAI: Gibberellin *insensitive*; PhyB: Phytochrome B; PIF: Phytochrome-interagierender Faktor.

Reversible Proteinmodifikationen, welche bei Dimerisierungssystemen häufig vorkommen, können von Nachteil sein, sodass Proteine häufig mit einer dauerhaften kovalenten Modifizierung versehen werden. Hierzu kann das Zielprotein mittels genetischer Manipulation mit einem selbstmarkierenden Protein als Fusionspartner exprimiert werden (Abbildung 6).^{3,71} Selbstmarkierende Proteine sind meist modifizierte Enzyme, die nach Zugabe ihres Liganden auf einer Zwischenstufe der ursprünglichen Reaktion durch ein kovalentes Produkt abgefangen werden.⁷² Die meisten der verwendeten Systeme haben gut charakterisierte Liganden, die sich effizient synthetisieren und an definierten Positionen mit diversen Modifikationen versehen lassen.^{17,73–83}

a)

b)

selbstmarkierendes Protein	M / kDa	Ligand
BL-Tag	29	
Clip-Tag	20	
eDHFR (nicht-kovalente Variante)	18	
eDHFR-Cys (kovalente Variante)	18	
Halo-Tag	33	
PYP-Tag	15	
Snap-Tag	20	
SPY-Catcher	9	H ₂ N-AHIVMVDAYK---

Abbildung 6: a) Chemisch-genetische Proteinmodifikation mit Hilfe von selbstmarkierenden Proteinen (hellgrau). Zusätzlich zum genetisch eingebrachten selbstmarkierenden Protein als Fusionspartner des Zielproteins (dunkelgrau) wird sein Ligand (weiß) benötigt, um das Zielprotein zeitlich gesteuert mit der gewünschten Modifizierung (grün) zu versehen. b) Beispiele selbstmarkierender Proteine, die bereits *in cellulo* verwendet wurden.^{17,73–83} Die Liganden können an den gestrichelten Bindungen mit der gewünschten Markierung für das Zielprotein versehen werden. BL: β -Lactamase; eDHFR: *E. coli* Dihydrofolatreductase; PYP: Photoaktives gelbes Protein; SPY: *major pilin protein* Spy0128.

Die Fusion mit den relativ großen selbstmarkierenden Proteinen ist häufig nur an Proteintermini oder in flexiblen *loop*-Regionen des Zielproteins möglich. Zudem können die Eigenschaften eines Zielproteins durch seinen Fusionspartner beeinflusst werden.^{52,58,83} Da

die Wahrscheinlichkeit solcher Beeinflussungen umso geringer ist, je kleiner der verwendete Fusionspartner ist,⁸³ wird in solchen Fällen häufig auf selbstmarkierende Peptide zurückgegriffen. Ähnlich wie selbstmarkierende Proteine interagieren diese mit chemischen Molekülen, welche die gewünschte Modifizierung tragen (Abbildung 7), sind jedoch wesentlich kleiner.^{3,71}

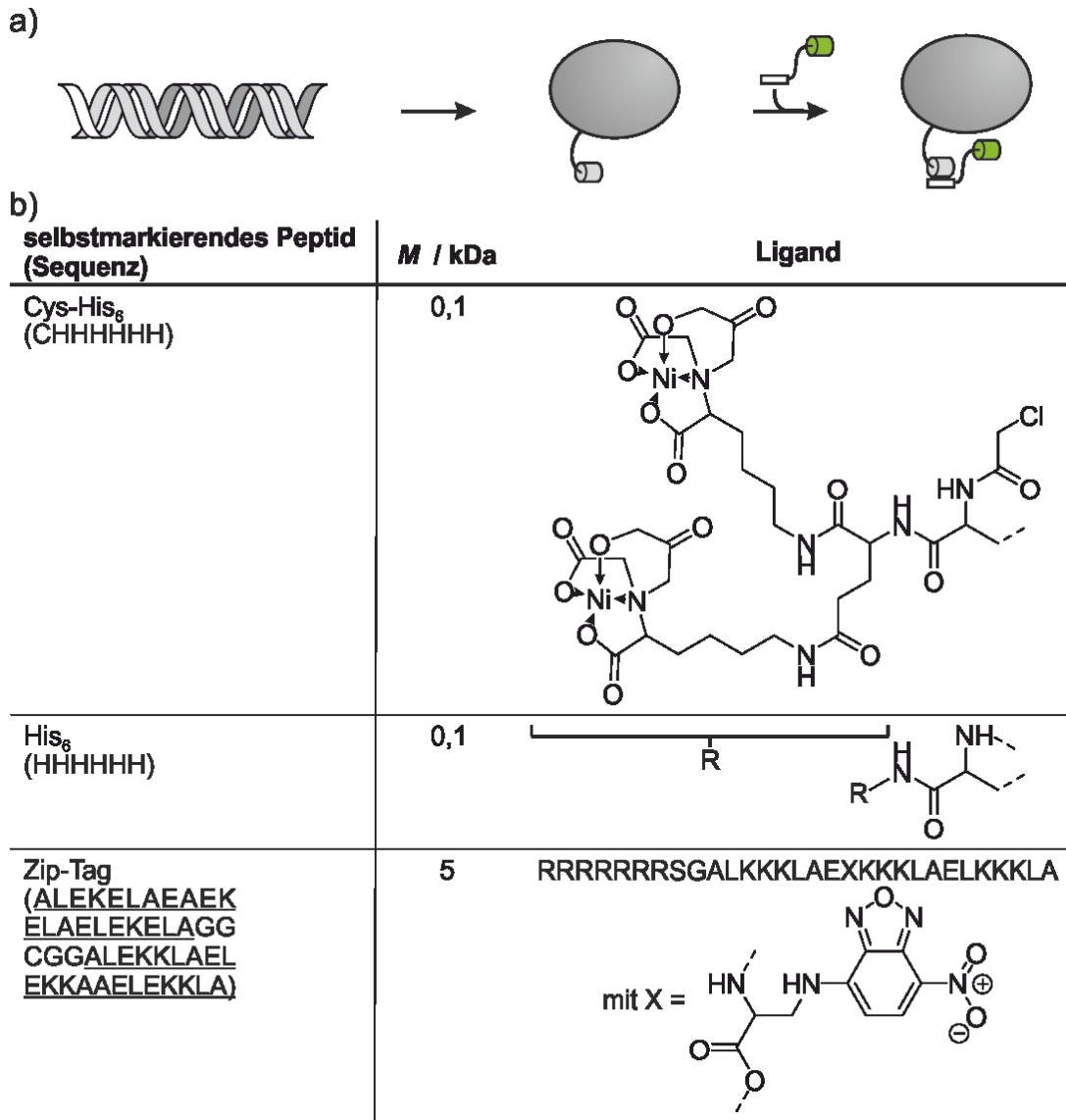


Abbildung 7: a) Chemisch-genetische Proteinmodifikation mit Hilfe von selbstmarkierenden Peptiden (hellgrau). Zusätzlich zum genetisch eingebrachten selbstmarkierenden Peptid als Fusionspartner wird sein passender Ligand (weiß) benötigt, um das Zielprotein (dunkelgrau) zeitlich gesteuert mit der gewünschten Modifizierung (grün) zu verbinden. b) Beispiele selbstmarkierender Peptide, die bereits *in cellulo* verwendet wurden.^{15,84-86} Die Liganden können an den gestrichelten Bindungen mit der gewünschten Markierung für das Zielprotein versehen werden.

Selbstmarkierende Peptide wurden zunächst zur Visualisierung des fusionierten Zielproteins *in cellulo* genutzt.^{87,88} Da diese Peptide aus relativ kurzen Aminosäuresequenzen bestehen,

können bei ihnen Nebenreaktionen mit endogenen Proteinen erfolgen, die ähnliche Aminosäureanordnungen auf ihrer Oberfläche besitzen.⁸⁹ Der Zip-Tag stellt dabei eine Ausnahme dar: Bei ihm werden vergleichsweise lange Peptidsequenzen als genetische Modifizierung und synthetischer Ligand verwendet, die in einer trimeren *coiled-coil*-Struktur aneinander binden.^{85,86} Hierdurch sind Interaktionen mit endogenen Proteinen sehr unwahrscheinlich. Obwohl selbstmarkierende Peptide bisher hauptsächlich mit Fluorophoren modifiziert wurden, ist eine Verwendung von Lokalisationssignalen denkbar. So wurde der Ligand des Zip-Tags bereits mit einer *N*-terminalen Oktaargininsequenz zur Verbesserung seiner Zellpermeabilität modifiziert.⁸⁶ Anstelle dieser Modifizierung wäre das Einbringen eines peptidischen Lokalisationssignals denkbar.

Ein Nachteil der selbstmarkierenden Peptide ist ähnlich wie bei vielen Dimerisierungssystemen die fehlende kovalente Bindung zwischen Ligand und Peptid, was zu ungewollter Dissoziation der Interaktionspartner führen kann.⁹⁰ Aus diesem Grund wurde der His₆-Tag mit einem Cystein ergänzt, welches nach der affinitätsvermittelten Assoziation durch eine nachbarschaftsinduzierte Reaktion eine kovalente Bindung mit dem Liganden eingeht.^{15,90,91}

Eine weitere wichtige Methode, mit der sich Proteine nach genetischer Manipulation durch chemische Reaktionen kovalent modifizieren lassen, stellt die Ambercodon-Suppressionstechnik zur Insertion unnatürlicher Aminosäuren in Proteinsequenzen dar (Abbildung 8).^{92,93} Dabei wird das Zielprotein genetisch mit einer Punktmutation versehen, sodass es nur in einer einzelnen Aminosäureseitenkette von seiner nativen Sequenz abweicht. Diese genetische Modifikation beeinflusst selten die Proteinfunktion und kann theoretisch an jeder Position des Zielproteins eingebracht werden.⁹³ I. d. R. weisen die unnatürlichen Aminosäuren in ihren Seitenketten reaktive Gruppen auf, die im Idealfall unter physiologischen Bedingungen ausschließlich mit ihrem bioorthogonalen Reaktionspartner umgesetzt werden können.⁹⁴ Über hoch chemoselektive Reaktionen kann dann das Zielprotein modifiziert werden. Seit der Einführung des Konzeptes der bioorthogonalen Reaktionen wächst dieses Gebiet der Chemischen Biologie stetig, sodass aus einer Vielzahl von Reaktionspartnern gewählt werden kann.³ Zudem können in einem Organismus mehrere unnatürliche Aminosäuren eingebracht und in zu einander orthogonalen bioorthogonalen Reaktionen modifiziert werden.^{95,96} Ein interessantes Beispiel für die Manipulation einer Proteinlokalisierung mit Hilfe unnatürlicher Aminosäuren ist die Einführung eines geschützten Lysins innerhalb eines NLS.^{97,98} Durch Licht- oder

Palladium-Katalyse kann die Schutzgruppe gezielt entfernt und so die Lokalisationwirkung der NLS aktiviert werden.

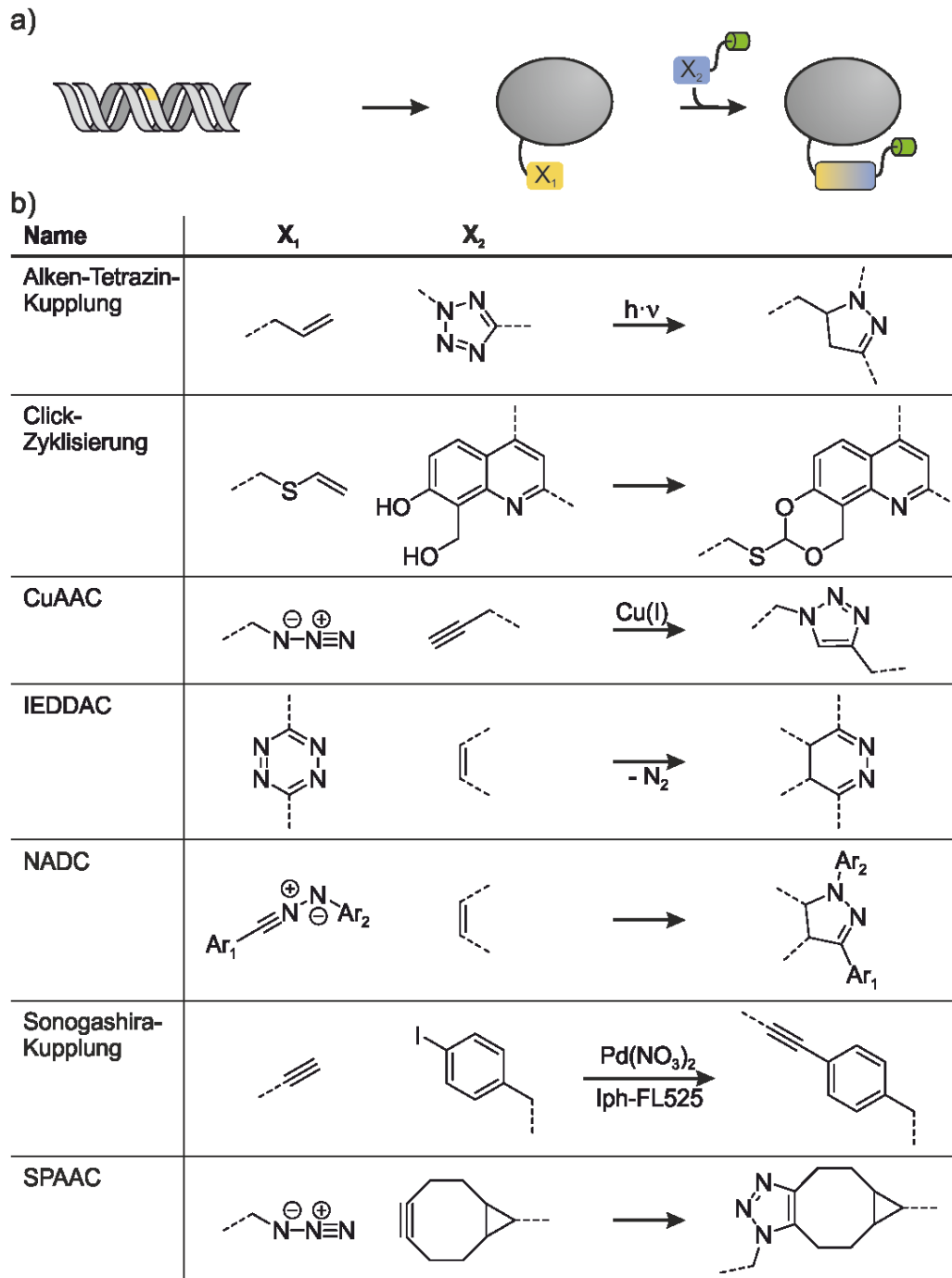


Abbildung 8: a) Chemisch-genetische Proteinmodifikation mit Hilfe der Ambercodon-Suppressionstechnik und bioorthogonaler Reaktionen. Durch eine Punktmutation in der Gensequenz des Zielproteins (dunkelgrau) wird eine unnatürliche Aminosäure mit reaktiver Seitenkette (X₁, gelb) in ihm exprimiert. Diese reagiert mit ihrem bioorthogonalen Reaktionspartner (X₂, blau) an der gewünschten Modifikation (grün) zu einer kovalenten Bindung. b) Beispiele für bioorthogonale Reaktionen, die bereits *in cellulo* genutzt wurden.^{98–107} CuAAC: Cu(I)-katalysierte Alkin-Azid-Cycloaddition; IEDDAC: Diels-Alder-Cycloaddition mit inversem Elektronenbedarf; NADC: Nitrilimin-Alken/Alkin-1,3-dipolare Cycloaddition; SPAAC: Ringspannungs-induzierte Alkin-Azid-Cycloaddition.

Obwohl die Ambercodon-Suppressionstechnik in Kombination mit bioorthogonalen Reaktionen zur Untersuchung einer Vielzahl biologischer Fragestellungen verwendet wird, ist auch bei ihr eine genetische Manipulation des verwendeten Organismus und insbesondere des Zielproteins notwendig. Bei keiner der bisher geschilderten Methoden ist es somit möglich endogene Proteine anzusprechen, was jedoch von großem therapeutischen Nutzen wäre.⁵⁰

1.2.3 Chemische Modifizierung von Proteinen

Bisher ermöglicht nur eine ausschließlich chemische Modifizierung die gezielte Addressierung endogener Proteine.⁴ Hierzu werden häufig Liganden von Enzymen verwendet, welche ihre enzymatische Aktivität modifizieren. Um Proteine mit Hilfe ihrer Liganden zu translokalisieren, kann ein Lokalisationssignal kovalent an den Liganden gebunden werden. Mit dieser Technik wurden in ersten Studien diverse Proteine in den Nukleus, die Plasmamembran oder das Zytoskelett translokalisiert.^{57,108} In diesem System wird jedoch keine kovalente Bindung zwischen Ligand und Protein ausgebildet, sodass die Reversibilität der Translokalisation berücksichtigt werden muss.

Um eine dauerhafte Translokalisation zu gewährleisten, muss eine kovalente Bindung zu einem endogenen Protein aufgebaut werden. Hierbei ist die Wahl der Reaktionen beschränkt, da nur die Seitenketten der Aminosäuren und eventuelle posttranslationale Modifikationen des Zielproteins adressiert werden können. Diese liegen jedoch in einer Vielzahl verschiedener Biomakromoleküle oder niedermolekularen Substanzen innerhalb der Zelle vor. Um in einem derart komplexen Reaktionsmedium dennoch eine selektive Modifizierung eines einzelnen Zielproteins zu ermöglichen, kann das Konzept der nachbarschaftsinduzierten Reaktionen verwendet werden.^{4,109} Hierbei wird ein Ligand des Zielproteins genutzt, welcher zum einen mit der gewünschten Modifizierung und zum anderen mit einer reaktiven Gruppe, welche mit proteinogenen Aminosäuren reagieren kann, modifiziert wird. Nach der affinitätsinduzierten Bindung des Liganden an sein Zielprotein wird die Reaktion zwischen Ligand und Aminosäureseitenketten durch die gewonnene räumliche Nähe induziert. Das Konzept der nachbarschaftsinduzierten Reaktionen wurde zunächst bei der kovalenten Inhibition von Enzymen verwendet, wobei meist eine Additionsreaktion zwischen einer nukleophilen Aminosäure des Enzyms und einer elektrophilen Gruppe des Liganden stattfindet (Abbildung 9).^{110,111}

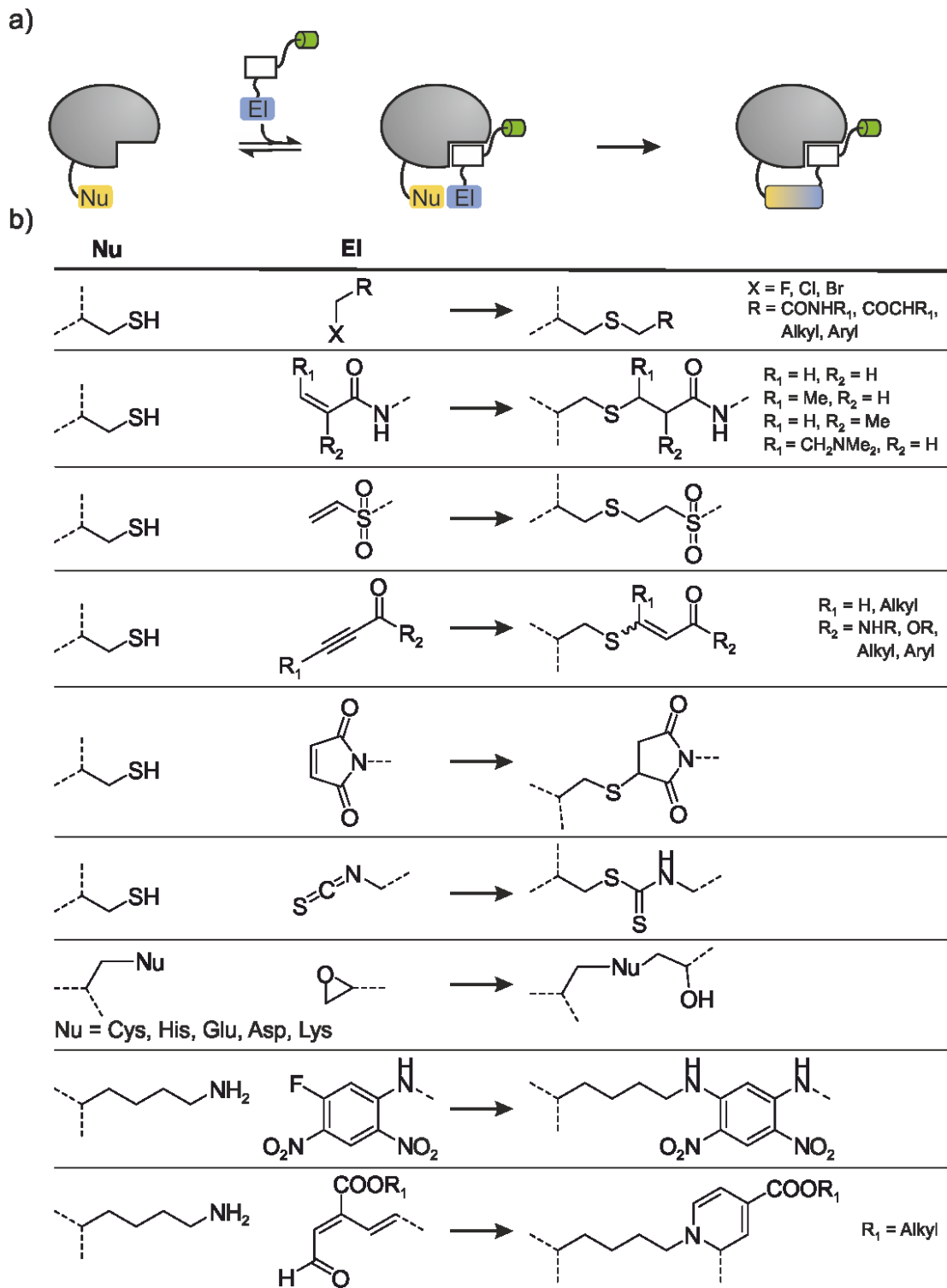


Abbildung 9: a) Rein chemische Proteinmodifikation durch nachbarschaftsinduzierte Reaktionen mit Hilfe von Additionsreaktionen. Ein für das Zielprotein (dunkelgrau) spezifischer Ligand (weiß) wird mit einer reaktiven, (meist elektrophilen) Gruppe (EI, blau) und der gewünschten Modifikation (grün) versehen. Nachdem der Ligand an das Zielprotein gebunden hat, reagiert seine reaktive, (meist elektrophile) Gruppe mit einer benachbarten reaktiven, (meist nukleophilen) Seitenkettengruppe (Nu, gelb) des Proteins. b) Beispiele von *in cellulo* anwendbaren reaktiven Gruppen (EI), die über die gestrichelte Bindung mit dem Liganden verbunden werden können und mit nukleophilen Seitenketten des Proteins (Nu) reagieren.^{15-17,112-131}

Bei der kovalenten Inhibition von Enzymen durch nachbarschaftsinduzierte Reaktionen werden oft katalytisch-aktive Aminosäureseitenketten angesprochen, welche i. d. R. durch ihre Mikroumgebung im aktiven Zentrum spezifische Eigenschaften besitzen. So kann ihre Nukleophilie durch Wasserstoffbrücken stark erhöht sein, was den elektrophilen Angriff des Liganden begünstigt.^{111,112} Dadurch können beim *activity-based protein-profiling* ganze Proteome mit sehr schwach elektrophilen Liganden auf verwandte Enzymzentren untersucht werden.¹¹³ Es ist jedoch auch möglich, dass Liganden mit nicht-katalytischen Aminosäureseitenketten in Nachbarschaft ihrer Bindestellen spezifisch reagieren. Da die Reaktivität der dabei angesprochenen Aminosäureseitenketten im Vergleich zu analogen Seitenkettenresten anderer Proteine nicht erhöht ist, ist hierbei die exakte Einstellung der Reaktivität des Liganden essentiell.¹¹³⁻¹¹⁵ Es gibt eine Vielzahl möglicher chemischer Additionsreaktionen, die meist spezifisch für einzelne Aminosäureseitenketten sind (Abbildung 9b).^{15-17,112-131} Die Aminosäure Cystein ist dabei ein besonders beliebter Reaktionspartner, da sie die nukleophilste der endogenen Aminosäureseitenketten ist und relativ selten in Proteinen auftritt.¹¹¹ Jedoch weist nicht jedes Protein ein Cystein in der Nähe seiner Ligandenbindestelle auf, sodass stetig neue reaktive Gruppen für nachbarschaftsinduzierte Reaktionen entwickelt werden, die mit anderen Aminosäureseitenketten reagieren können.¹¹⁸⁻¹²²

Zusätzlich zur Entwicklung weiterer Aminosäure-spezifischer Additionsreaktionen wurden reaktive Gruppen für nachbarschaftsinduzierte Transferreaktionen entwickelt.⁴ Auch diese finden erst nach der affinitätsinduzierten Bindung eines Liganden an sein Zielprotein statt. Jedoch wird bei ihnen die reaktive Gruppe zwischen dem ursprünglichen Liganden des Zielproteins und der gewünschten Modifizierung angeordnet, sodass der Ligand nach der Reaktion nicht kovalent mit dem Protein verbunden ist und die Bindestelle verlassen kann (Abbildung 10). Die Verwendung eines solchen Systems ermöglicht die Modifizierung endogener Proteine ohne die native Ligandbindung zu stören, was bei einer Vielzahl biologischer Fragestellungen von Vorteil ist.^{4,5,109}

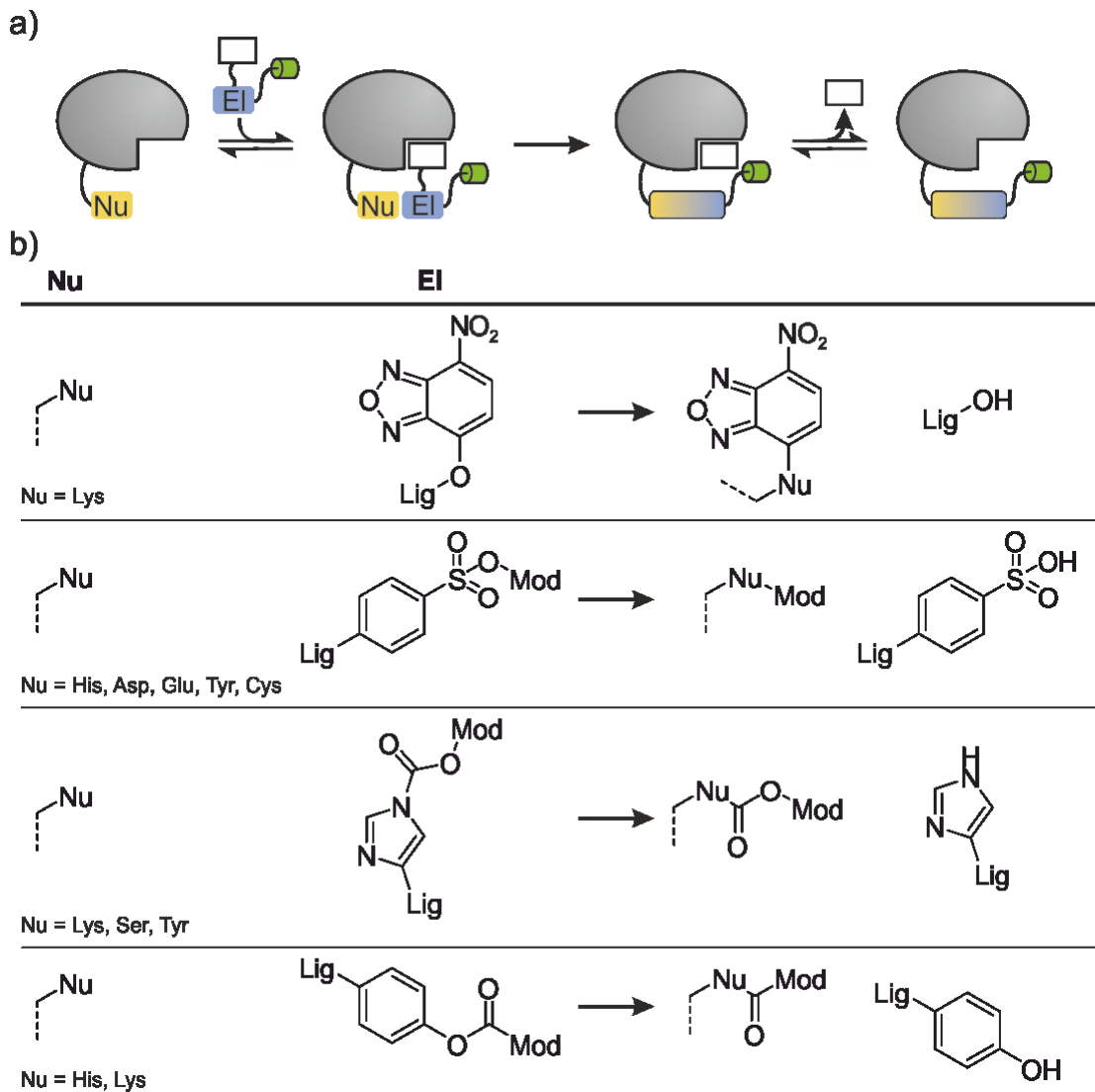


Abbildung 10: a) Rein chemische Proteinmodifikation durch nachbarschaftsinduzierte Reaktionen mit Hilfe von Transferreaktionen. Ein für das Zielprotein (dunkelgrau) spezifischer Ligand (weiß) wird mit einer reaktiven, (meist elektrophilen) Gruppe (EI, blau) und der gewünschten Modifikation (grün) versehen. Nachdem der Ligand an das Zielprotein gebunden hat, reagiert seine reaktive, (meist elektrophile) Gruppe mit reaktiven (meist nukleophilen) Seitenkettengruppen (Nu, gelb) des Proteins. Dabei wird die Modifikation auf das Protein übertragen, während der Ligand anschließend aus der Bindestelle des Proteins herausdiffundieren kann. b) Beispiele von *in cellulo* anwendbaren reaktiven Gruppen (EI) für nachbarschaftsinduzierte Transferreaktionen, die die gewünschte Modifizierung auf nukleophile Seitenketten des Proteins (Nu) übertragen.^{5,7,9,122,132}

Das Konzept der nachbarschaftsinduzierten Reaktionen ist der vielversprechenste Ansatz für die Translokalisierung endogener Proteine *in cellulo* oder *in vivo*. Dennoch ist bisher kein Beispiel für eine Translokalisierung zellulärer Proteine mit Hilfe einer nachbarschaftsinduzierten Reaktion bekannt. Dies liegt vermutlich unter anderem an der komplexen Sondenentwicklung, die für jedes Reaktionssystem erneut durchgeführt werden muss. Ein

großes Problem dabei liegt in der fehlenden Verfügbarkeit von Liganden. Bisher wurden für nachbarschaftsinduzierte Reaktionen hauptsächlich niedermolekulare Verbindungen als Liganden verwendet.^{4,109} Die wenigen Beispiele, in denen Peptide als Affinitätsvermittler einer nachbarschaftsinduzierten Reaktion verwendet werden, beschränken sich auf peptidische Liganden von Membranrezeptoren.^{6,12} Hierdurch ist die Nutzung dieser Reaktionsart auf Proteine mit definierten Bindungstaschen sowie mit peptidischen Liganden auf die Zelloberfläche eingeschränkt. Ist ein Ligand für das Zielprotein verfügbar, liegt die nächste Schwierigkeit in der komplexen Modifizierung desselben, wobei der proteinbindende Teil des Liganden mit der reaktiven Gruppe und der Modifizierung verbunden werden muss. Neben der exakten Einstellung der Reaktivität ist dabei vor allem die geometrische Anordnung der drei Einheiten des Liganden, nämlich der reaktiven Gruppe, der affinen Gruppe und der gewünschten Modifikation, von großer Bedeutung, welche häufig empirisch durch die Untersuchung eines Ligandensets optimiert wird.^{9,10,15,16,82,90}

2 Zielsetzung

Im Rahmen dieser Arbeit sollte ein nachbarschaftsinduziertes Reaktionssystem für ein nicht-enzymatisches intrazelluläres Protein entwickelt werden, um das Konzept der nachbarschaftsinduzierten Reaktion auf diesen Proteintypus zu erweitern. Zu diesem Zweck sollte ein Modellprotein gewählt werden, dessen Funktion durch Protein-Protein-Interaktionen (PPIs) bestimmt wird. Da PPIs durch relativ große, eher flache Proteinoberflächen der interagierenden Proteine vermittelt werden, ist die Addressierung dieser Bindestellen durch niedermolekulare Inhibitoren kompliziert.^{133,134} Eine mögliche Alternative ist die Verwendung einer mit dem Zielprotein interagierenden Peptidsequenz, um peptidische Liganden zu erhalten.¹³⁵ Daher sollte im Rahmen dieser Arbeit ein peptidischer Ligand genutzt werden.

Das gewählte Modellsystem sollte zunächst *in vitro* charakterisiert werden. Von besonderem Interesse ist dabei der Einfluss des Abstandes zwischen der nukleophilen Aminosäure im Zielprotein und dem Anknüpfungspunkt der reaktiven Gruppe am peptidischen Liganden. Ein Modellprotein ohne native Cysteine sollte dabei die Einbringung einzelner Cysteine an definierten Positionen ermöglichen, welche unterschiedliche Entfernungen von der Bindestelle des Liganden aufweisen. Zudem sollten verschiedene Varianten des Liganden hergestellt werden, wobei insbesondere der Abstandshalter zwischen der Peptidsequenz und der reaktiven Gruppe variiert werden sollte, um dieser das Erreichen und somit die Reaktion mit unterschiedlichen Cysteinen zu ermöglichen. Anschließend sollte das effizienteste Protein-Ligand-Paar ermittelt werden. Parallel sollten molekulardynamische Simulationen durchgeführt werden, um zu ermitteln, ob das Design nachbarschaftsinduzierter Reaktionssysteme mit derartigen Berechnungen unterstützt werden kann.

Im finalen Teil dieser Arbeit sollte das etablierte System zur Translokation des Zielproteins *in cellulo* verwendet werden. Hierzu sollte das Modellprotein genetisch mit einem fluoreszierenden Protein fusioniert und in humanen Zellen überexprimiert werden. Durch Zugabe des um Lokalisationssignale erweiterten peptidischen Liganden sollte anschließend das Fusionsprotein translokalisiert werden, wobei die Lokalisationsänderung mit Hilfe des fluoreszierenden Proteins mikroskopisch detektiert werden sollte.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Wahl des Modellsystemes

Als Modellprotein für die peptid-vermittelte nachbarschaftsinduzierte Reaktion wurde die 10 kDa-große Proteindomäne KIX des CREB-bindenden Proteins (CBP) gewählt. Dieses Multidomänenprotein ist ein transkriptioneller Koaktivator der eukaryotischen Genregulation und besitzt neben einer katalytischen Histonacetylasedomäne (HAT) mehrere Domänen, die für Protein-Protein-Interaktionen mit mehr als 400 Interaktionspartnern verantwortlich sind (Abbildung 11a).¹³⁶⁻¹³⁸ Die KIX-Domäne interagiert mit etwa 20 dieser Proteine über zwei verschiedene Bindestellen. Sie umfasst die Aminosäuren (AS) 590 bis 670 des CBP und besteht aus drei α -Helices (AS 597-611, 623-642 und 646-669), welche in einem Helixbündel angeordnet sind (Abbildung 11b).¹³⁹ Dieses wird über eine Vielzahl hydrophober Aminosäuren in seinem Kern stabilisiert. Zusätzlich besitzt die KIX-Domäne zwei 3_{10} -Helices (AS 591-593 und 617-620), welche das Helixbündel an den Termini der α -Helices stabilisieren. Zwischen den Helices α_2 und α_3 liegt die c-Jun Bindestelle der KIX-Domäne.¹⁴⁰ Zwischen den Helices α_1 und α_3 befindet sich die c-Myb Bindestelle.¹³⁹ In dieser binden z. B. die Transaktivierungsdomäne (TAD) von c-Myb und die phosphorylierte KIX-interagierende Domäne (pKID) des *cyclic AMP-responsive element-binding protein* (CREB).^{136,139,141} In der c-Jun Bindestelle binden unter anderem die TADs des zellulären Jun-Proteins (c-Jun) und des *mixed-lineage leukemia* (MLL)-Proteins sowie des Tat-Proteins aus dem HIV-1.^{140,142-144} Außerdem gibt es einige Proteine wie p53 oder die E2A-Proteine, welche zwei Transaktivierungsdomänen in enger Nachbarschaft besitzen und mit jeweils einer an eine der Bindestellen der KIX-Domänen binden.^{145,146} Alle diese Wechselwirkungen werden über hydrophobe Interaktionen vermittelt, wobei häufig das Erkennungsmotiv $\Phi XX \Phi \Phi$ (Φ : große hydrophobe AS, X: beliebige AS) essentiell für die Bindung ist.^{138,147,148}

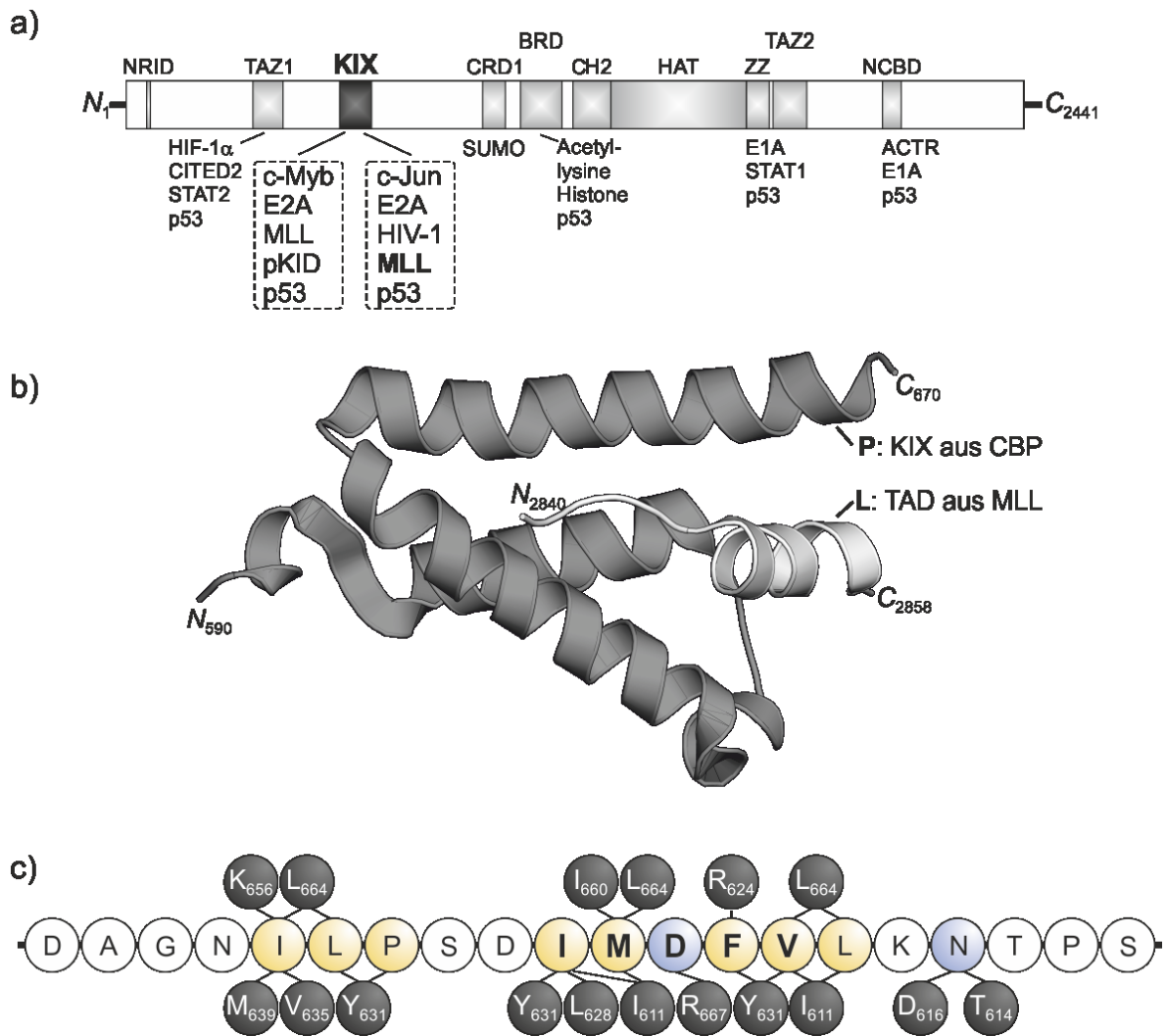


Abbildung 11: a) Schematische Darstellung des Proteins CBP mit seinen Domänen. Für jede Domäne sind einige Interaktionspartner angegeben. Die in dieser Arbeit verwendete KIX-Domäne (schwarz) besitzt zwei Bindestellen, die c-Myb- und die c-Jun-Bindestelle, welche mit unterschiedlichen Proteinen interagieren. b) NMR-Struktur der KIX-Domäne aus CBP mit in der c-Jun-Bindestelle gebundener Transaktivierungsdomäne (TAD) aus dem Protein *mixed lineage leukemia* (MLL) (Dateiname der Proteindatenbank (PDB): 2LXS).¹⁴⁴ c) Interaktionskarte der in b) dargestellten Struktur. Das TAD-Peptid in der Mitte bildet durch viele hydrophobe (gelb) und wenige polare (blau) Aminosäuren Interaktionen mit Seitenketten von KIX (schwarz) aus. Das für die Bindung wichtige $\Phi X X \Phi \Phi$ -Motiv der TAD (IMDFV) ist fett hervorgehoben.

Als peptidischer Ligand für das Modellsystem wurde die TAD von MLL gewählt, welche die Aminosäuren 2840 bis 2859 beinhaltet (Abbildung 11b).¹⁴⁴ Die Bindung von TAD und KIX wird durch eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen D₂₈₅₁ der TAD mit R₆₆₇ aus KIX initiiert,¹⁴⁹ bevor sie über hydrophobe Wechselwirkungen stabilisiert wird. Diese werden durch das $\Phi X X \Phi \Phi$ -Motiv der TAD, welches aus den Aminosäuren ²⁸⁴⁹IMDFV²⁸⁵³ besteht,¹⁴⁶ sowie durch die Aminosäuren I₂₈₄₄, L₂₈₄₅, P₂₈₄₆ und L₂₈₅₄ vermittelt.¹⁵⁰ Weitere hydrophile Wechselwirkungen werden von der Aminosäure N₂₈₅₆ ausgebildet. Die TAD

bindet mit einer Affinität von ca. 3 μM an ihre Hauptbindungsstelle in der KIX-Domäne.¹⁵¹ Zusätzlich kann sie mit einer Affinität von ca. 1 mM an die c-Myb Bindestelle binden.¹⁵²

Um aus diesem Protein-Ligand-Paar ein System für nachbarschaftsinduzierte Reaktionen zu erhalten, wurde zunächst die NMR-Struktur des KIX/TAD-Komplexes näher analysiert (Abbildung 12). Wie sich zeigte, befindet sich der C-Terminus der TAD außerhalb der Bindestelle, sodass eine N-terminale Modifizierung mit der elektrophilen Gruppe notwendig war. Somit blieb der C-Terminus frei, um die gewünschte Modifizierung anzubringen. Um den N-Terminus der TAD möglichst in der Mitte ihrer Bindestelle zu positionieren ohne ihre Affinität zu beeinflussen, wurde die Aminosäure I₂₈₄₄ als erste Aminosäure des Liganden ausgewählt. Als letzte Aminosäure wurde S₂₈₅₉ gewählt. Da bereits ab der Aminosäure N₂₈₅₆ keine Wechselwirkungen zwischen TAD und KIX mehr auftreten, ist so eine Beeinflussung durch C-terminale Modifizierungen sehr unwahrscheinlich.

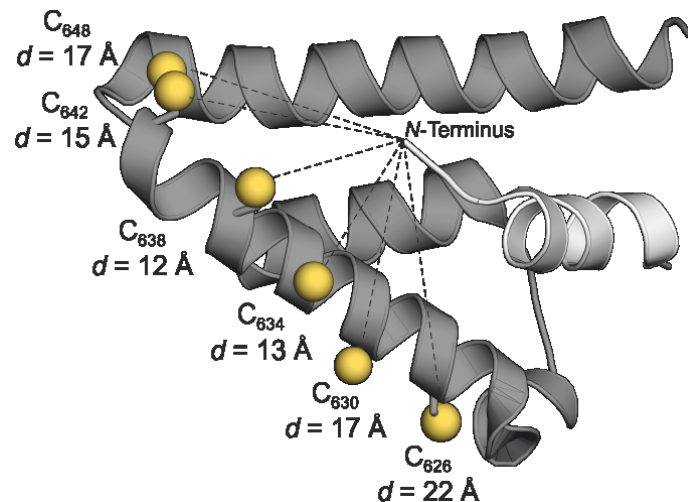


Abbildung 12: Darstellung der Modelldomäne KIX im Komplex mit ihrem Liganden TAD aus dem MLL-Protein. Da das Protein keine nativen Cysteinreste besitzt, wurden sechs verschiedene Cysteinvarianten generiert. Die Schwefelatome der eingebrachten Cysteine (gelb) sind unterschiedlich weit vom N-Terminus des Liganden entfernt. Ihr Insertionspunkt und ihr Abstand d vom N-Terminus in Ångstrom (Å) sind angegeben.

Zusätzlich wurden Positionen zur gezielten Einbringung nukleophiler Cysteine in die KIX-Domäne ausgewählt. Dazu wurden sechs Aminosäuren ausgetauscht, welche keine direkte Interaktion mit der TAD eingehen und auf der α_2 -Helix sowie im N-Terminus der α_3 -Helix liegen. Die Abstände d zwischen dem N-Terminus der TAD und den Schwefelatomen der eingebrachten Cysteine wurde mit Hilfe des Programmes *Pymol* und des NMR-Datensatzes 2LXS abgeschätzt.¹⁴⁴ Dazu wurden die linearen Abstände zwischen dem C_χ -Atom der nativen Aminosäure aus KIX und dem Stickstoff von I₂₈₄₄ gemessen. Da

in einem Fall ein Alanin ausgetauscht wurde, wurde bei diesem das Wasserstoffatom am C_{β} -Atom gewählt, welches in Richtung der TAD zeigte. NMR-Datensätze enthalten jeweils die 20 wahrscheinlichsten Konformationen der gezeigten Struktur. Daher wurden die Abstände in allen Strukturkonformationen ausgemessen und ihr Mittelwert berechnet. Die native KIX-Domäne wird im weiteren Verlauf **P(WT)** genannt, während die cysteinenthaltenen Varianten als **P(C626)**, **P(C630)**, etc. bezeichnet werden.

Nachdem als nukleophile Aminosäure Cystein gewählt worden war, wurde der elektrophile Reaktionspartner bestimmt. Damit die reaktive Gruppe ausschließlich mit den eingebrachten Cysteinen reagiert und so die Untersuchung der Abstandsabhängigkeit der nachbarschaftsinduzierten Reaktion nicht durch Nebenreaktionen erschwert wird, wurde eine reaktive Gruppe benötigt, die mit der Thiolgruppe aus der Cysteinseitenkette deutlich schneller reagiert als mit funktionellen Gruppen anderer proteinogener Aminosäureseitenketten. Von den in der Einleitung vorgestellten reaktiven Gruppen (Abschnitt 1.2.3), die sich für eine nachbarschaftsinduzierte Transferreaktion eignen, ist keine derart selektiv für Reaktionen mit Cysteinen. Daher wurde eine reaktive Gruppe aus den für Cystein spezifischen nachbarschaftsinduzierten Reaktionen nach dem Additionsmechanismus ausgewählt (Abbildung 13a). Hierbei wurde das α -Chloracetamid gewählt, da dieses in vorhergehenden Untersuchungen des Arbeitskreises zur templatvermittelten Peptidligation mit Hilfe der KIX-Domäne ein gutes Reaktivitätsprofil gezeigt und dabei nicht mit dem Wildtypprotein reagiert hatte.¹¹⁵ Zwischen diese reaktive Gruppe und den *N*-Terminus des Liganden wurden fünf verschiedene Abstandshalter in Form des β -Alanins sowie vier Polyethylenglycolketten (PEGs) unterschiedlicher Länge *l* eingebracht (Abbildung 13b). Der Abstand zwischen dem *N*-Terminus des peptidischen Teils des Liganden und dem α -Kohlenstoff der reaktiven Gruppe wurde mit dem Programm *Chem3D Pro* ermittelt und wird im Folgenden als Länge *l* des Abstandshalters bezeichnet. Die Länge der Abstandshalter wurde so gewählt, dass die reaktive α -Chloracetamidgruppe theoretisch entweder keines der in das Protein eingebrachten Cysteine, nur einige dieser Cysteine oder alle dieser Cysteine erreichen konnte.

Zusätzlich sollten zwei Änderungen an der nativen Sequenz des TAD-Peptides vorgenommen werden: Zum einen sollte das Methionin an Position 2850 durch ein Norleucin (B) ersetzt werden, um die Oxidationsstabilität der Liganden zu erhöhen. Zum anderen sollte ein Tryptophan an den *C*-Terminus angefügt werden, um die Aufreinigung

und Konzentrationsbestimmung der TAD durch dessen Absorption bei 280 nm zu erleichtern.

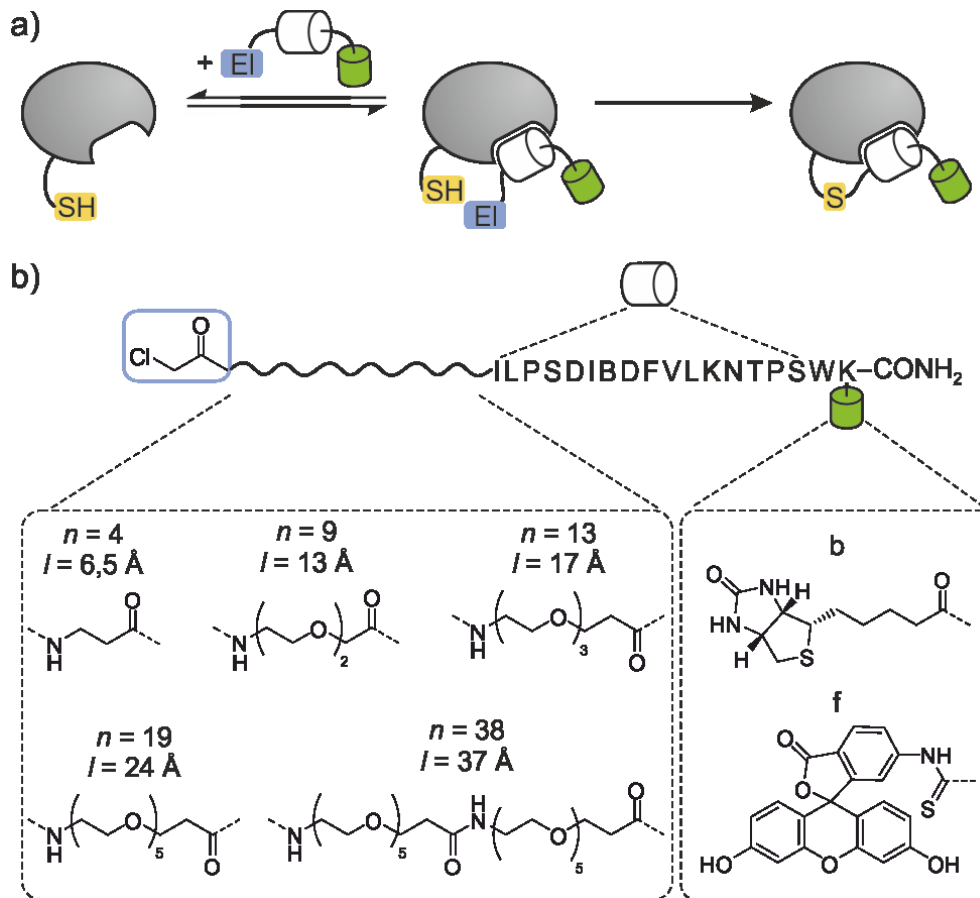


Abbildung 13: a) Schematische Darstellung der nachbarschaftsinduzierten Reaktion eines Proteins (grau) mit seinem Peptidliganden (weiß). Durch die Anlagerung des Liganden an das Protein wird die elektrophile Gruppe (blau) des Liganden in die Nachbarschaft einer nukleophilen Aminosäureseitenkette (hier Cystein, gelb) gebracht, wodurch die Reaktion der beiden Gruppen induziert wird. b) Schematischer Aufbau der reaktiven Liganden Cl-nL-b/f. Die Peptidsequenz wurde C-terminal z. B. mit Biotin **b** oder Fluoresceinisothiocyanat Isomer I **f** modifiziert. Am N-Terminus des Liganden wurden zunächst Abstandshalter verschiedener Atomzahlen n (4–38) und somit Längen l (6,5 – 37 Å) und anschließend das zur Reaktion benötigte Elektrophil in Form einer α -Chloracetamid-Gruppe (blau umrahmt) eingebracht.

Um eine übersichtliche Benennung zu ermöglichen, wird das TAD-Peptid im weiteren Verlauf dieser Arbeit als Ligand „L“ bezeichnet. Es wird ein „Cl-“ vorangestellt, wenn ein Ligand die reaktive α -Chloracetamidgruppe trägt, und ein „H-“, wenn er eine unreaktive Acetamidgruppe trägt. Um den Abstandshalter zwischen diesen beiden Gruppen und der Peptidsequenz anzugeben, wird die Anzahl n seiner Atome dem „L“ vorangestellt. Um Modifizierungen mit Fluoresceinisothiocyanat Isomer I (FITC), Biotin oder den Lokalisationssequenzen zu kennzeichnen, werden „f“, „b“ bzw. der Name der

Lokalisationssequenz vorne (*N*-terminale Modifizierung) oder hinten (*C*-terminale Modifizierung) angefügt. So wird z. B. ein *N*-terminal über β -Alanin ($n = 4$ Atome) α -chloracetylierter Ligand mit *C*-terminaler FITC-Modifizierung als „**Cl-4L-f**“ bezeichnet.

3.2 Expression und Charakterisierung von Proteinvarianten

3.2.1 Expression und Aufreinigung von Proteinvarianten

Die sieben Proteinvarianten wurden mit Hilfe eines modifizierten pGEX-4T1-Vektors als Fusionsprotein mit der Glutathion-S-Transferase (GST) in *Escherichia coli* (*E. coli*) BL21 gold (DE3) Zellen exprimiert (Abschnitt 5.3.1).¹⁵³ Die benötigten Vektoren wurden im Rahmen seiner Masterarbeit von Herrn H. Salamon erstellt, welcher von Herrn Dr. N. Brauckhoff betreut wurde.¹⁵⁴ Zunächst wurde mittels Testexpression (Abschnitt 5.3.1.2) und denaturierender Polyacrylamidelektrophorese (PAGE) mit Natriumdodecylsulfat (SDS) geprüft, ob mit diesem System alle Proteinvarianten korrekt und in ausreichender Menge exprimiert werden (Abbildung 14). Es zeigte sich, dass für alle Proteinvarianten eine stabile Überexpression des Fusionsproteins **GST-P** (37,5 kDa) erreicht werden konnte. Zusätzlich wurde auch eine leichte Überexpression von freier GST (26,3 kDa) detektiert, was darauf hindeutet, dass das Fusionsprotein entweder zu geringen Anteilen in den Zellen abgebaut oder die Translation nach der GST frühzeitig terminiert wird. Da die GST im Verlauf der Aufreinigung vom Zielprotein abgetrennt werden sollte (s. u.), war dies unproblematisch.

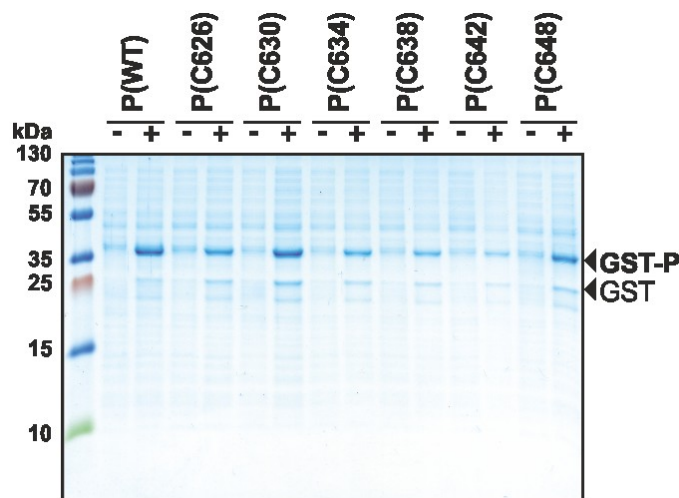


Abbildung 14: Coomassie gefärbtes 17%-iges SDS-Polyacrylamidgel zur Überprüfung der Expressionsrate aller sieben Proteinvarianten. Für jede Proteinvariante wurde eine Probe vor (-) und 24 Std. nach (+) der Induktion der Testexpressionskultur aufgetragen.

Um die Proteine in größeren Mengen zu isolieren, wurden 2,5 L-Expressionkulturen verwendet (Abschnitt 5.3.1.3). Während der gesamten Aufreinigung wurden die Puffer mit dem Reduktionsmittel Tris(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP) versetzt, um die in den Proteinvarianten enthaltenen Cysteine vor Oxidation zu schützen.¹⁵⁵ TCEP besitzt ein

ähnliches Reduktionspotential wie die üblicherweise verwendeten thiolbasierten Reagenzien 1,4-Dithiothreitol und β -Mercaptoethanol.¹⁵⁶ Während diese jedoch in der folgenden nachbarschaftsinduzierten Reaktion mit dem α -Chloracetamid Nebenreaktionen eingehen würden, sind Phosphinreagenzien weitgehend stabil gegenüber thiolmodifizierenden Substanzen.^{155–157} Durch die hohe Affinität der GST zu Glutathion (GSH) konnten die **GST-P**-Fusionsproteine mit Hilfe einer GSH-Affinitätschromatographie in hoher Reinheit aus *E. coli* gewonnen werden.^{153,158–160} Da die Dimerisierung der GST¹⁵⁸ und ihre endogenen Cysteine die nachbarschaftsinduzierten Reaktionen stören könnten, wurde sie durch Proteolyse entfernt, wobei jedoch die Aminosäuresequenz GAM als *N*-terminales Artefakt vor dem Zielprotein erhalten blieb. Der Verlauf dieser Aufreinigungsschritte wurde mittels SDS-PAGE überprüft (Abbildung A19a bis Abbildung A25a). Anschließend wurde eine Gelpermeationschromatographie durchgeführt, um die Protease (73,6 kDa) und das GST-Dimer (52 kDa) vom Zielprotein (10,5 kDa) abzutrennen. Wenn im zur Kontrolle durchgeführten SDS-Polyacrylamidgel (Abbildung A19b bis Abbildung A25b) noch GST-Fusionsproteine oder freie GST detektiert werden konnten, wurde eine reverse GSH-Affinitätschromatographie durchgeführt, bei welcher die GST-enthaltenden Verunreinigungen an das Säulenmaterial banden, während das Zielprotein im Durchfluss verblieb.¹⁶⁰ Auf einem abschließenden SDS-Polyacrylamidgel zeigten alle Proteinvarianten lediglich eine Bande auf Höhe des Zielproteins (10,5 kDa) und waren im Bereich von 10–130 kDa frei von detektierbaren Verunreinigungen (Abbildung 15).

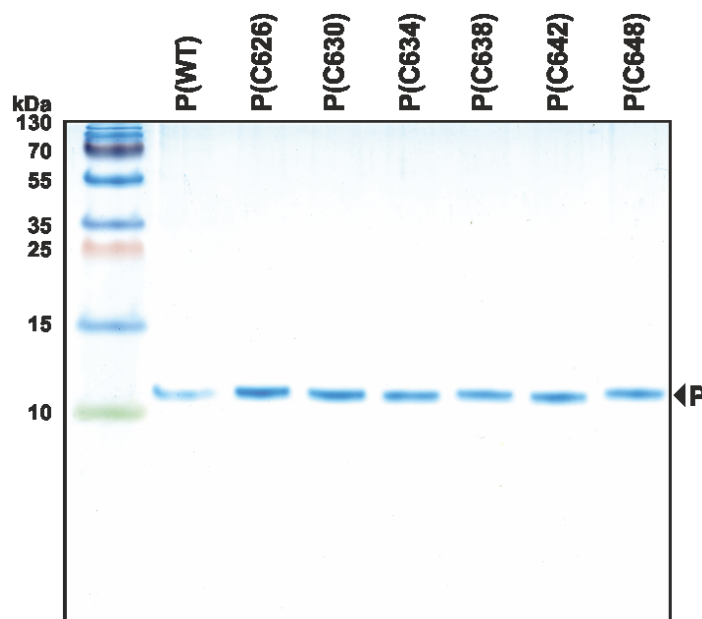


Abbildung 15: Coomassie gefärbtes 17%–iges SDS-Polyacrylamidgel aller sieben Proteinvarianten nach dem finalen Aufreinigungsschritt.

Somit ließen sich alle sieben Proteinvarianten in hoher Reinheit isolieren. Während die Ausbeuten für sechs der Proteinvarianten mit 6 – 14 mg aus 1 L Expressionskultur zufriedenstellend waren, ließen sich vom Protein **P(C648)** nur 0,6 mg Protein je 1 L Expressionskultur isolieren. Da dieses Protein zuvor eine gute Überexpression in *E. coli* gezeigt hatte, deutet dies auf einen strukturellen Defekt hin, durch den diese Proteinvariante während der Aufreinigung leichter ausfällt.

Im Anschluss an die Proteinaufreinigung sollten alle Proteinlösungen auf eine Konzentration von 1 mM ($10,5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) eingestellt werden, um in folgenden Experimenten für alle Proteinvarianten dasselbe Volumen verwenden zu können. Dies war für **P(C648)** nicht möglich, da es bereits ab einer Konzentration von ca. $3,5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ausfiel. Auch dies deutet auf eine vergleichsweise instabile Struktur dieser Proteinvariante hin, die ihre Aggregation und Präzipitation begünstigt. Dennoch wurde **P(C648)** gemeinsam mit den anderen Proteinvarianten charakterisiert und für die Reaktivitätstests verwendet.

3.2.2 Massenspektrometrische Charakterisierung der Proteinvarianten

Die während der Proteinaufreinigung angefertigten SDS-Polyacrylamidgels ermöglichen nur eine ungefähre Abschätzung des Molekulargewichts der Proteinvarianten,¹⁶¹ welches mit der erwarteten Proteingröße übereinstimmt. Von großem Interesse für die weiteren Experimente ist jedoch die korrekte Insertion des Cysteins an der gewünschten Position. Um dies zu überprüfen wurde zunächst von allen Proteinvarianten eine Analyse mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie (HPLC-MS) durchgeführt (Abschnitt 5.3.7). Dabei wurde in den Chromatogrammen der HPLC noch einmal die Reinheit der Proteinvarianten bestätigt (Abbildung A27 bis Abbildung A33). Mit Hilfe der MS wurde das Molekulargewicht der Proteine auf ca. 1 Da genau bestimmt, womit sich die Aminosäureaustausche zur Einbringung der Cysteine nachweisen ließen.

Um zu überprüfen, ob die Cysteine an der korrekten Stelle der Sequenz vorlagen, wurden die Proteinvarianten mittels tryptischem *In-Gel*-Verdau eines SDS-Polyacrylamidgels und anschließender HPLC gekoppelt mit Tandem-Massenspektrometrie (MS^2) analysiert (Abschnitt 5.3.8). Durch den tryptischen Verdau wurden die Proteine zu Peptiden hydrolysiert,¹⁶² welche mit Hilfe der HPLC aufgetrennt wurden. Die erste MS detektierte die unterschiedlichen Masse-zu-Ladungs- (m/z -)Verhältnisse, sobald Probenbestandteile von der HPLC eluierten. Anschließend wurden die Substanzen, welche zu einem gegebenen

Zeitpunkt die zehn intensivsten m/z -Verhältnisse lieferten, weiter fragmentiert und die m/z -Verhältnisse der Fragmente in der zweiten MS detektiert. Durch die Kombination der Daten ließen sich mit mathematischen Algorithmen und Referenzdatenbanken die in der Probe vorliegenden Proteine bestimmen. Diese HPLC-MS²-Analyse wurde mit Hilfe der *MaxQuant* Software von Frau Dr. P. Janning durchgeführt,¹⁶³ wobei sowohl das humane Referenzproteom der *Uniprot* Datenbank als auch eine Datenbank mit Kontaminationen und eine *FASTA*-Datei mit den Sequenzen für die sieben Proteinvarianten durchsucht wurden. Dabei wurde in jeder Probe die erwartete Proteinvariante als Hauptbestandteil mit einer Sequenzabdeckung von 89-100% detektiert (Abbildung A35). Zwar wurden häufig auch die korrespondierenden Peptide aus dem P(WT) detektiert, diese entsprachen jedoch der normalen Verschleppung des HPLC-MS²-Systems, welche bei aufeinanderfolgenden Proben auftreten kann.¹⁶⁴

3.2.3 Bestimmung der thermischen Proteinstabilität

Da das Protein-Ligand-System schlussendlich in humanen Zellen untersucht werden sollte, sollten alle vorhergehenden Charakterisierungen bei 37°C erfolgen. Um sicherzustellen, dass dies mit den sieben Proteinvarianten möglich war, wurden diese auf ihre thermische Stabilität untersucht (Abschnitt 5.3.9). Dazu wurden sie für 24 Stunden bei 37°C inkubiert und zu definierten Zeitpunkten Proben für analytische SDS-Polyacrylamidgele entnommen. Im Verlaufe dieser Untersuchung konnten keine Abbaubanden unterhalb der Bande des Zielproteins detektiert werden (Abbildung 16 sowie Abbildung A36).

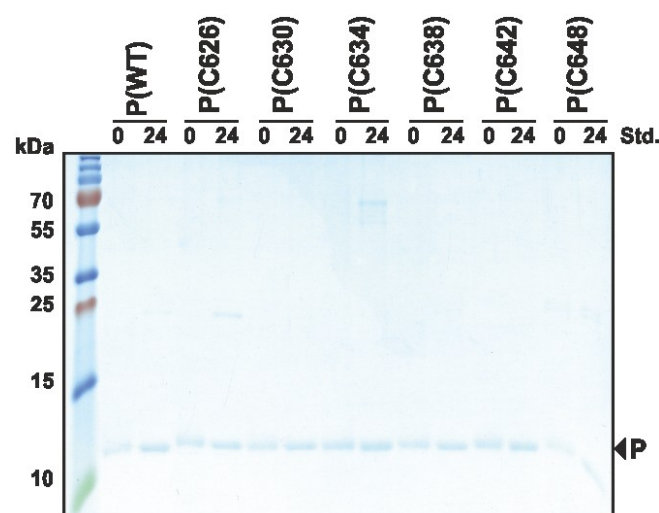


Abbildung 16: Coomassie gefärbtes 17%-iges SDS-Polyacrylamidgel zur Überprüfung der thermischen Stabilität aller sieben Proteinvarianten. Für jede Proteinvariante wurde eine Probe vor und nach 24 Stunden Inkubation bei 37°C aufgetragen.

Auch die Intensität der einzelnen Proteinproben variierte zwischen den einzelnen Proben kaum. Lediglich ein paar schwache Banden mit höheren Molekulargewichten traten in einigen der Proben auf. Da diese nach der Aufreinigung der einzelnen Proteinvarianten nicht detektiert wurden (vgl. Abbildung 15) und auch bei keiner Variante über die gesamte Inkubationszeit detektiert wurden (Abbildung A36), müssen diese Verunreinigungen im Verlaufe der Probenvorbereitung für die SDS-PAGE eingebracht worden sein und sind daher für die eigentliche Untersuchung nicht von Interesse.

3.3 Design und Synthese von Ligandvarianten

Alle Liganden wurden mittels manueller oder automatisierter Festphasenpeptidsynthese (SPPS) nach dem 9-Fluorenylmethyloxycarbonyl- (Fmoc-)Schema hergestellt (Abschnitt 5.4).^{165,166} Mit dieser Schutzgruppenstrategie wurden die Liganden schrittweise vom C- zum N-Terminus aufgebaut, indem die erste N-terminal mit Fmoc geschützte Aminosäure über ihren freien C-Terminus an ein Trägerharz gebunden wurde. Nach der Verankerung der ersten Aminosäure wurden nicht reagierte Aminogruppen acetyliert, um Nebenprodukte zu verringern. Anschließend wurde die Fmoc-Schutzgruppe entfernt und eine weitere Aminosäure an das Peptid gekuppelt. Zur Aufbringung weiterer Aminosäuren wurde der Zyklus aus Acetylierung, N_α -Entschützung und Aminosäuren-Kupplung wiederholt. Da die N_α -Entschützung in basischem Milieu erfolgte, wurden Aminosäuren mit säurelabile Schutzgruppen an den reaktiven Seitenketten (Tabelle 9) verwendet und auch der Abstandshalter zwischen Harz und Peptid wurde in stark saurem Milieu gespalten.¹⁶⁷ Um eine erhöhte Proteasestabilität zu erhalten, wurde ein modifizierter Rink-Amid-Abstandshalter verwendet, sodass alle Liganden nach der Abspaltung vom Harz eine C-terminale Amidgruppe trugen.^{168,169} Wie bereits erwähnt, sollten die Liganden C-terminal mit den gewünschten Modifizierungen versehen werden. Für nicht-peptidische C-terminale Modifikationen wurde daher ein Lysin hinzugefügt, dessen ϵ -Aminogruppe mit einer 4-Monomethoxytrityl-(Mmt)-Gruppe geschützt war. Diese Seitenkette konnte selektiv in schwach saurem Milieu entschützt und anschließend modifiziert werden (Abschnitt 5.4.1.10).^{170,171} Peptidische C-terminale Modifizierungen wie die Lokalisationssequenzen wurden über Fmoc-SPPS aufgebaut und über eine Diethylenglycol-Einheit (PEG2) linear mit der Ligandsequenz verbunden. Nach Abspaltung der Liganden vom Harz, wurden diese mittels präparativer Umkehrphasen-Flüssigkeitschromatographie (RP-LC) aufgereinigt und massenspektrometrisch charakterisiert (Abbildung A37 bis Abbildung A78 sowie Tabelle A5).

3.3.1 Norleucin-enthaltende Liganden

Die native Peptidsequenz des Liganden sollte leicht verändert werden, indem das Methionin an Position 2850 durch ein Norleucin ersetzt und ein Tryptophan an den C-Terminus angefügt wurde. Um den Einfluss dieser Änderungen auf die Bindung zwischen Protein und Ligand zu ermitteln, wurden zunächst zwei N-terminal mit FITC modifizierte Liganden, von

denen beide das Tryptophan und je einer das native Methionin (**f-9L(M)-W**) bzw. das oxidationsstabile Norleucin (**f-9L(B)-W**) enthielt, synthetisiert (Abbildung 17).

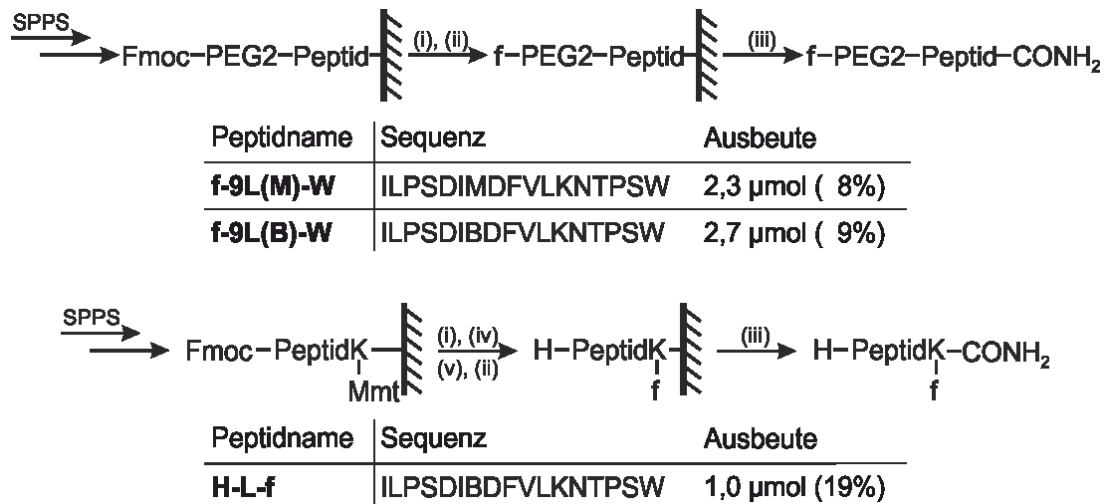


Abbildung 17: Festphasenpeptidsynthese (SPPS) zur Herstellung der Liganden **f-9L(M)-W** und **f-9L(B)-W**. Die Peptidsequenzen sowie die Ausbeute der Peptide sind aufgeführt. Nach Synthese der peptidischen Kernsequenz inklusive *N*-terminaler PEG2-Modifizierung wurden folgende Reaktionen durchgeführt: (i) Abspaltung der *N*-terminalen Fmoc-Gruppe; (ii) Modifizierung mit FITC; (iii) Vollabspaltung vom Harz; (iv) Acetylierung des *N*-Terminus; (v) Abspalten der Mmt-Gruppe vom *C*-terminalen Lysin.

Mittels Fluoreszenzpolarisationsspektroskopie wurde die Affinität der Liganden **f-9L(M)-W** und **f-9L(B)-W** gegenüber dem Protein **P(WT)** untersucht (Abschnitt 5.5.1). Die ermittelten Dissoziationskonstanten (K_d) lagen mit $0,7 \pm 0,1 \mu\text{M}$ für **f-9L(M)-W** und $0,3 \pm 0,03 \mu\text{M}$ für **f-9L(B)-W** unterhalb der publizierten Dissoziationskonstante des nativen Liganden von $2,8 \pm 0,4 \mu\text{M}$ (Abbildung A79).¹⁵¹ Da die publizierte Dissoziationskonstante mittels isothermer Titrationskalorimetrie an einem unmodifizierten Peptid gemessen wurde, könnte die etwas höhere Affinität der hier verwendeten Liganden durch Interaktionen der hydrophoben *N*-terminalen FITC-Modifizierung mit der hydrophoben Bindegrube des Proteins erklärt werden. Diese Untersuchung bestätigt die Annahme, dass weder eine *C*-terminale Verlängerung des Liganden um Tryptophan noch der Austausch von Methionin zu Norleucin seine Bindung negativ beeinflussen (Abschnitt 3.1). Daher enthielten alle weiteren Liganden diese Modifizierungen. Sie werden im weiteren Verlauf mit „L“ statt mit „L(B)-W“ bezeichnet.

Anschließend wurde der Ligand **H-L-f** hergestellt (Abbildung 17b). Mittels Fluoreszenz-polarisationsspektroskopie wurde seine Dissoziationskonstante gegenüber allen sieben Proteinvarianten bestimmt, um den Einfluss ihrer Punktmutationen auf die Bindung des Liganden zu untersuchen. Alle Dissoziationskonstanten lagen unterhalb des publizierten

Werts und unterschieden sich kaum voneinander (Abbildung 18, Abbildung A80). Lediglich die Affinitäten der Proteinvarianten **P(C626)** bzw. **P(C634)** wichen mit einer relativen Dissoziationskonstante von 0,2 bzw. 3,6 deutlicher von der des Wildtypproteins **P(WT)** ab.

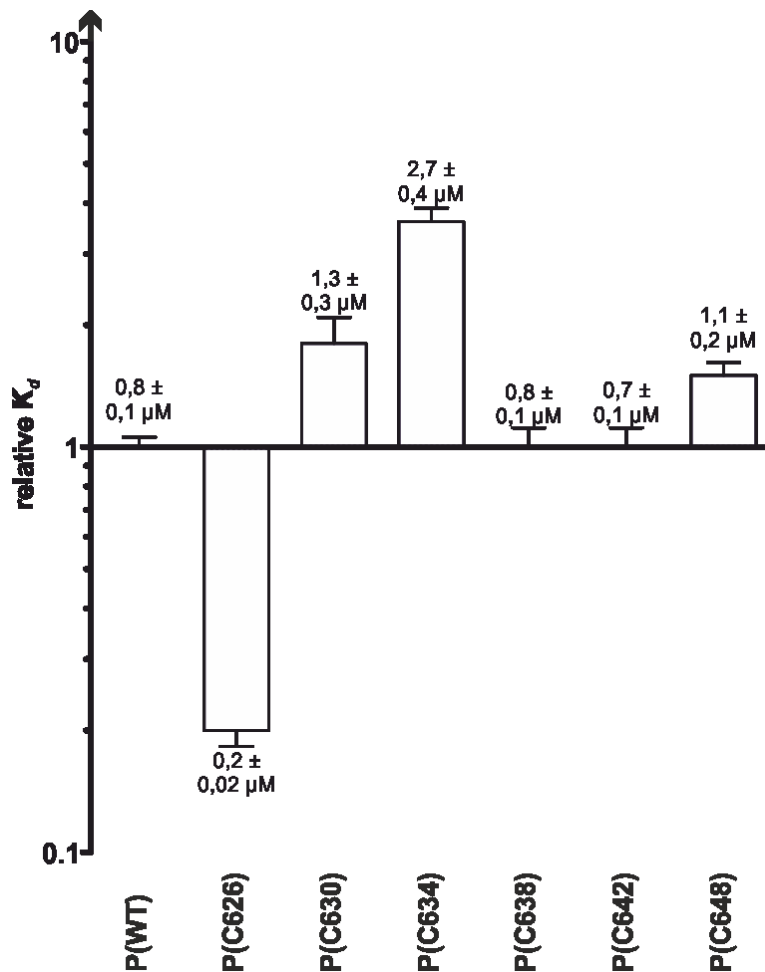


Abbildung 18: Relative Dissoziationskonstanten K_d des Liganden **H-L-f** mit den sechs cysteinhaltenden Proteinvarianten in Bezug auf die Dissoziationskonstante des Wildtypproteins **P(WT)** mit demselben Liganden. Über den Balken sind die absoluten Dissoziationskonstanten des jeweiligen Protein-Ligand-Paares aufgeführt.

Da das Protein-Ligand-System letzten Endes *in cellulo* verwendet werden sollte, wurden humane HeLa-Zellen mit dem Liganden **H-L-f** behandelt, um dessen Zellpermeabilität zu untersuchen (Abschnitt 5.8.2). Als vergleichende Kontrolle diente das Peptid Oktaarginin (**f-9R₈**), welches für seine gute Zellpermeabilität bekannt ist und von Frau L. Dietrich zur Verfügung gestellt wurde.¹⁷² Als Lösungsmittelkontrolle wurden Zellen mit Dimethylsulfoxid (DMSO) behandelt. Nach Waschen zur Entfernung nicht aufgenommener Peptide wurden die Zellen fixiert und ihre chromosomale DNS mit dem Interkalator 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) angefärbt. Durch sequentielle Detektion der Fluoreszenz des DAPI und der FITC-markierten Peptide wurde die Zellpermeabilität der

Liganden ermittelt (Abbildung 19). Wird ein Peptid von Zellen aufgenommen, so sind im FITC-Kanal Signale sichtbar, welche rund um die DAPI-gefärbten Zellkerne lokalisiert sind. Dies ist für das Kontrollpeptid f-9R₈ deutlich erkennbar. Da solche Signale für den Liganden **H-L-f** nicht detektiert wurden, besitzt dieser keine nennenswerte Zellpermeabilität.

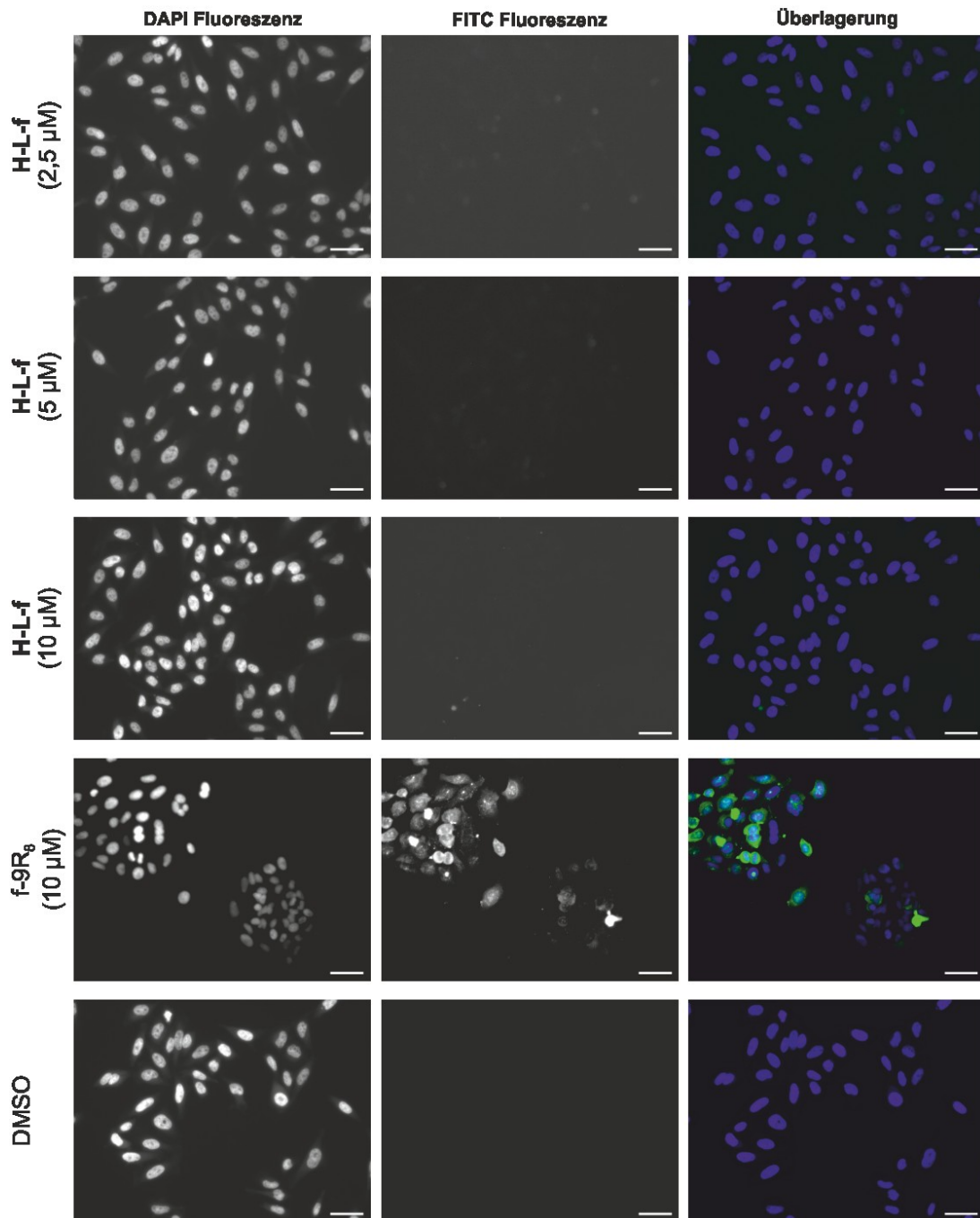


Abbildung 19: Representative Fluoreszenzaufnahmen von HeLa-Zellen zur Untersuchung der Zellpermeabilität des Liganden **H-L-f**. Gezeigt sind die DAPI-Fluoreszenz (Filter_{ex} = G365, Strahlteiler = FT395, Filter_{em} = BP445/50) und die FITC-Fluoreszenz (Filter_{ex} = BP450/50, Strahlteiler = FT480, Filter_{em} = BP510/50) sowie eine Überlagerung beider Bilder (DAPI = blau, FITC = grün). Der Maßstab (weiß) entspricht 50 µm. Das Experiment wurde von Frau L. Dietrich durchgeführt.

3.3.2 Kohlenwasserstoff-verbrückte Liganden

Als Kohlenwasserstoff-verbrückte Peptide werden Peptide bezeichnet, bei denen Alken-Seitenketten zweier α -methylierter unnatürlicher Aminosäuren mit Hilfe einer Ringschlussmetathesereaktion mit einander verbunden werden.^{169,173,174} Hierdurch entsteht ein Macrozyklus, welcher neben dem Peptidrückgrad eine Kohlenwasserstoffeinheit mit einer C=C-Doppelbindung enthält. Diese Technik wurde zur Stabilisierung von helikalen Peptiden entwickelt, da die Helixbildung bei korrekter Positionierung der Verbrückung und α -Methylierung begünstigt wird.^{135,175,176} Am effizientesten sind dabei Verbrückungen mit acht Kohlenstoffatomen über die Aminosäuren i und $i+4$ bzw. solche mit elf Kohlenstoffatomen über die Aminosäuren i und $i+7$, welche jeweils eine bzw. zwei Wendungen der zu induzierenden α -Helix verbrücken. Häufig weisen verbrückte Peptide neben einer erhöhten Helizität auch eine erhöhte Zellpermeabilität auf.¹⁷⁷

Um die Zellpermeabilität des Liganden zu erhöhen, wurden drei Kohlenwasserstoff-verbrückte Varianten (**H-L(s1)-f**, **H-L(s2)-f** und **H-L(s3)-f**) durch manuelle SPPS hergestellt und aufgereinigt (Abbildung 20). Da die Verbrückung zwischen den Aminosäuren i und $i+4$ erfolgen sollte, wurde die unnatürliche Aminosäure (S)-*N*-Fmoc-2-(4-pentenyl)alanine (Fmoc-S5-OH) verwendet und jeweils an zwei Positionen des Liganden insertiert. Dabei wurde darauf geachtet, dass die ausgetauschten Aminosäuren zum einen in der zu stabilisierende α -Helix des Liganden (AS 2847–2855) lagen und zum anderen ihre Seitenketten in der NMR-Struktur vom Protein weg zeigten. Durch diese Anforderungen war die Auswahl an austauschbaren Aminosäuren eingeschränkt, sodass z. T. Aminosäuren in die Verbrückung integriert wurden, welche im wichtigen Φ XX Φ Φ -Bindungsmotiv des Liganden liegen.^{138,147,148} Dieses interagiert hauptsächlich über hydrophobe Wechselwirkungen mit dem Zielprotein. Da die Kohlenwasserstoffverbrückung ebenfalls hydrophob ist, ist es möglich, dass sie anstelle der nativen Aminosäureseitenketten mit dem Protein interagiert und so die Bindung erhalten bleibt.¹⁷⁸

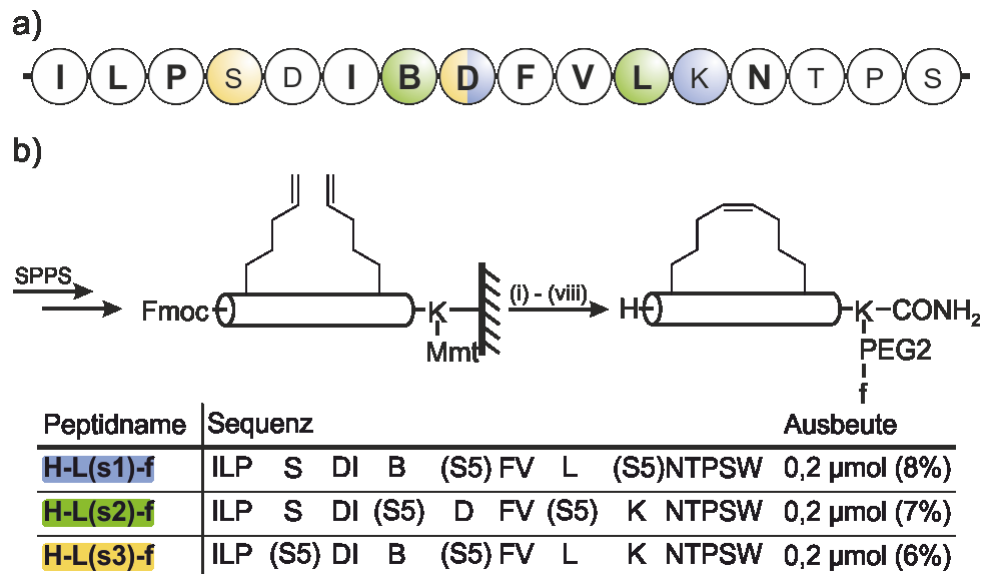
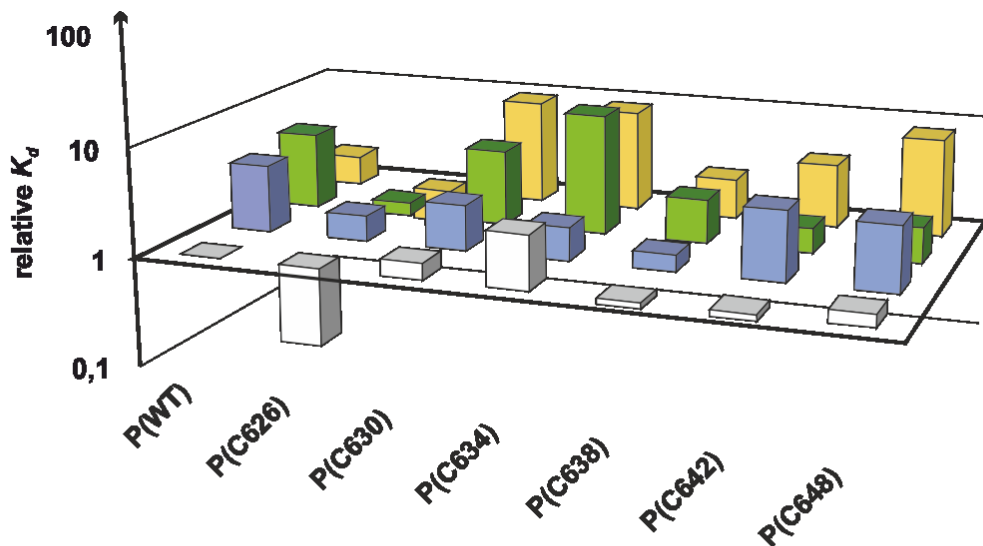


Abbildung 20: a) Sequenz des Liganden. Dieser bildet durch mehrere Aminosäuren (fett hervorgehoben) Interaktionen mit dem Zielprotein aus. Die Aminosäuren, die für die verbrückten Liganden **H-L(s1)-f**, **H-L(s2)-f** und **H-L(s3)-f** ausgetauscht wurden, sind jeweils blau, grün und gelb markiert. b) Festphasenpeptidsynthese (SPPS) mit integrierter Ringschlussmetathese (RSM) nach Grubbs zur Herstellung Kohlenwasserstoff-verbrückter Liganden. Die Peptidsequenz der Liganden sowie ihre Ausbeute sind aufgeführt. Nach Synthese der peptidischen Kernsequenz wurden folgende Reaktionen durchgeführt: (i) RSM zur Verbrückung der olefinischen S5-Seitenketten; (ii) Abspaltung der *N*-terminalen Fmoc-Gruppe; (iii) Acetylierung des *N*-Terminus; (iv) Abspaltung der Mmt-Schutzgruppe des *C*-terminalen Lysins; (v) Modifizierung des *C*-terminalen Lysins mit PEG2; (vi) Abspaltung der Fmoc-Gruppe des PEG2; (vii) Modifizierung des PEG2 mit FITC; (viii) Vollabspaltung vom Harz.

Mit den Kohlenwasserstoff-verbrückten Liganden wurde erneut eine Zellpermeabilitätsuntersuchung an HeLa-Zellen durchgeführt. Dabei stellte sich heraus, dass die Einführung der Kohlenwasserstoff-Verbrückung keine detektierbare Verbesserung der Zellpermeabilität zur Folge hatte (Abbildung A90). Während dieser Arbeit wurde eine Untersuchung veröffentlicht, welche die zur Verbesserung der Zellpermeabilität möglichen Modifizierungen im Kontext von Kohlenwasserstoff-verbrückten Peptiden analysiert.¹⁷⁹ In dieser wurde festgestellt, dass neben der Verbrückung vor allem eine positive Gesamtladung eines Peptides seine Zellpermeabilität erhöht. Da die hier untersuchten verbrückten Liganden eine Gesamtladung von 0 bzw. -1 aufweisen, hätte eine Erhöhung der Ladung ihre Zellpermeabilität möglicherweise positiv beeinflussen können.

Neben einer möglichen Erhöhung der Helizität und Zellpermeabilität von Peptiden können Kohlenwasserstoffverbrückungen auch die Proteasestabilität sowie die Affinität eines Peptides zu seinen Interaktionspartnern steigern.¹⁸⁰ Da die Spezifität nachbarschafts-

induzierter Reaktionen unter anderem von einer hohen Affinität des verwendeten Liganden profitiert,¹¹ wurde mittels Fluoreszenzpolarisationsspektroskopie die Affinität der verbrückten Liganden zu allen Proteinvarianten untersucht (Abbildung 21 und Abbildung A81). Es zeigte sich, dass keiner der verbrückten Liganden eine erhöhte Affinität gegenüber einer der Proteinvarianten aufweist. Dies könnte an der bereits diskutierten Verwendung von Aminosäuren des Liganden, die zum $\Phi X X \Phi \Phi$ -Bindungsmotiv gehören,^{138,147,148} für die Verbrückung liegen. Nachdem die verbrückten Liganden synthetisiert worden waren, wurde zudem die in den verbrückten Liganden **H-L(s1)-f** und **H-L(s3)-f** zu S5 ausgetauschte Aminosäure D₂₈₅₁ als Initiator für die Wechselwirkung mit dem Zielprotein identifiziert,¹⁴⁹ sodass ihr Austausch die Affinität ebenfalls negativ beeinflussen könnte. Da die Verbrückung des Liganden keinen positiven Einfluss auf seine Affinität oder Zellpermeabilität ausübte, wurde im weiteren Verlauf mit dem nicht-verbrückten Liganden gearbeitet.

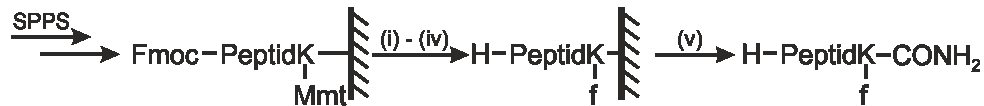


	P(WT)	P(C626)	P(C630)	P(C634)	P(C638)	P(C642)	P(C648)
H-L-f	0,2 ± 0,02	1,0 ± 0,3	2,4 ± 0,4	0,7 ± 0,1	0,6 ± 0,1	1,0 ± 0,2	0,8 ± 0,1 μM
H-L(s1)-f	1,3 ± 0,2	1,9 ± 0,4	1,5 ± 0,2	1,0 ± 0,1	3,3 ± 0,4	3,0 ± 0,2	3,1 ± 0,4 μM
H-L(s2)-f	1,0 ± 0,3	3,7 ± 2,4	9,5 ± 5,6	1,9 ± 0,6	1,3 ± 0,6	1,6 ± 0,4	3,8 ± 2,6 μM
H-L(s3)-f	0,4 ± 0,1	6,9 ± 4,0	6,6 ± 2,9	1,8 ± 0,6	2,9 ± 1,3	6,1 ± 2,3	1,4 ± 0,5 μM

Abbildung 21: Relative Dissoziationskonstanten K_d des Liganden **H-L-f** sowie der verbrückten Liganden **H-L(s1)-f**, **H-L(s2)-f** und **H-L(s3)-f** mit den sieben Proteinvarianten in Bezug auf die Dissoziationskonstante des Wildtypproteins **P(WT)** mit dem Liganden **H-L-f**. In der Tabelle sind die absoluten Dissoziationskonstanten des jeweiligen Protein-Ligand-Paares in μM aufgeführt.

3.3.3 Liganden mit verminderter Affinität

Um vom Peptid **H-L-f** einen nicht-affinen Ligand abzuleiten, wurden einzelne Aminosäuren des Liganden zu Alanin ausgetauscht (Abbildung 22). In der Nomenklatur dieser Liganden ist jeweils die Position dieses Alanins angegeben, d. h. im Liganden **L(A2844)** wurde I₂₈₄₄ zu Alanin ausgetauscht. Zusätzlich wurde der Ligand **H-iL-f** hergestellt, in welchem die Peptidsequenz des Liganden **H-L-f** invertiert wurde.



Peptidname	Sequenz	Ausbeute
H-L(A2844)-f	<u>A</u> LPSD BDFVLKNTPSWK	0,4 μmol (17%)
H-L(A2845)-f	I <u>A</u> PSD BDFVLKNTPSWK	0,3 μmol (13%)
H-L(A2848)-f	I LP <u>S</u> A BDFVLKNTPSWK	0,4 μmol (17%)
H-L(A2849)-f	I LP <u>S</u> D BDFVLKNTPSW	0,3 μmol (15%)
H-L(A2850)-f	I LP <u>S</u> D ADFVLKNTPSW	0,3 μmol (15%)
H-L(A2851)-f	I LP <u>S</u> D B <u>A</u> FVLKNTPSWK	0,3 μmol (13%)
H-L(A2852)-f	I LP <u>S</u> D B <u>D</u> A <u>V</u> LKNTPSW	0,3 μmol (15%)
H-L(A2853)-f	I LP <u>S</u> D BDF <u>A</u> LKNTPSWK	0,1 μmol (4%)
H-L(A2854)-f	I LP <u>S</u> D BDFV <u>A</u> KNTPSW	0,3 μmol (15%)
H-L(A2856)-f	I LP <u>S</u> D BDFVLK <u>A</u> TPSW	0,4 μmol (20%)
H-iL-f	SPTNKL <u>V</u> FDB DSPL W	0,1 μmol (5%)

Abbildung 22: Festphasenpeptidsynthese (SPPS) für Liganden mit verminderter Affinität zu den Proteinvarianten. Die Peptidsequenzen sowie die Ausbeute der Peptide sind aufgeführt. Nach Synthese der peptidischen Kernsequenz wurden folgende Reaktionen durchgeführt: (i) Abspaltung der *N*-terminalen Fmoc-Gruppe; (ii) Acetylierung des *N*-Terminus; (iii) Abspaltung der Mmt-Schutzgruppe des *C*-terminalen Lysins; (iv) Modifizierung des *C*-terminalen Lysins mit FITC; (v) Vollabspaltung vom Harz.

In der Fluoreszenzpolarisationsuntersuchung zeigte sich, dass einige Aminosäuren für die Bindung des Liganden wichtiger sind als andere (Abbildung 23). So haben Mutationen der polaren Aminosäuren D₂₈₄₈, D₂₈₅₁ und N₂₈₅₆ kaum Einfluss auf die Dissoziationskonstante. Dies bestätigt, dass die Bindung zwischen Ligand und Protein hauptsächlich über hydrophobe Wechselwirkungen vermittelt wird.^{144,150,151}

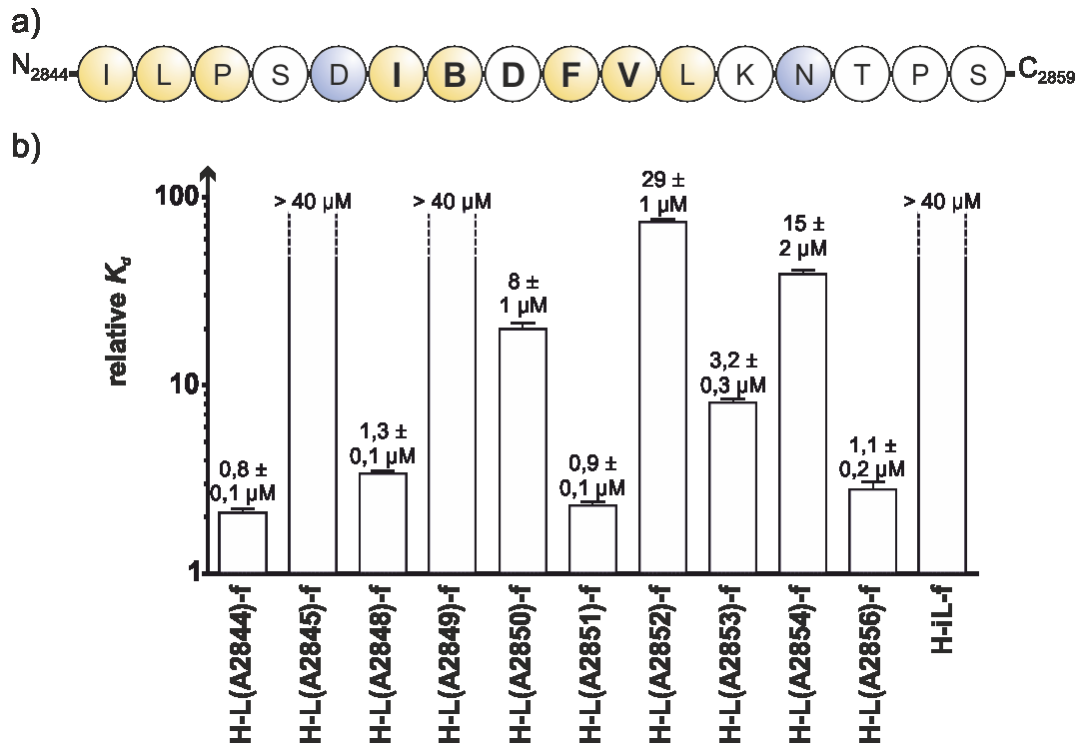


Abbildung 23: a) Sequenz des Liganden. Dieser bildet durch viele hydrophobe (gelb) und wenige polare (blau) Aminosäuren Interaktionen mit dem Zielprotein aus. Das für die Bindung wichtige $\Phi\text{XX}\Phi\Phi$ -Motiv ist fett hervorgehoben. b) Relative Dissoziationskonstanten K_d der Alaninvarianten des Liganden sowie des Liganden **H-iL-f** mit invertierter Peptidsequenz in Bezug auf die Dissoziationskonstante des Wildtypproteins **P(WT)** mit dem Liganden **H-L-f**. Über den Balken sind die absoluten Dissoziationskonstanten des jeweiligen Protein-Ligand-Paares aufgeführt.

3.4 Charakterisierung von Protein-Ligand-Paaren für nachbarschaftsinduzierte Reaktionen

3.4.1 Synthese reaktiver Liganden

Nachdem die Peptidsequenz des Liganden festgelegt worden war, wurden von diesem reaktive Varianten hergestellt, um den Einfluss der Länge fünf verschiedener Abstandshalter zwischen dem Liganden und der reaktiven Gruppe auf die Geschwindigkeit der nachbarschaftsinduzierten Reaktion mit verschiedenen Proteinvarianten zu untersuchen. Der Reaktionsfortschritt der Reaktion wurde dabei mit einer analytischen HPLC verfolgt, wobei die Produktausbeute mit Hilfe der Absorption eines C-terminal in die Liganden eingebrachten FITC bei 440 nm bestimmt wurde (Abschnitt 5.7.3).^{181,182} N-terminal wurde der Ligand **L-f** mit fünf Abstandshaltern unterschiedlicher Atomzahl n modifiziert. Die Abstandshalter wurden so gewählt, dass ihre Länge l zum einen kürzer (**CI-4L-f**, $l = 6,5 \text{ \AA}$) und zum anderen deutlich länger (**CI-38L-f**, $l = 37 \text{ \AA}$) als die Entfernung d der verschiedenen cysteinischen Thiole in den unterschiedlichen Proteinvarianten vom N-Terminus des Liganden ($d = 12\text{--}22 \text{ \AA}$, vgl. Abbildung 12 und Abbildung 13) ist. Nach C-terminaler Modifikation des Liganden mit FITC wurde die reaktive α -Chloracetamidgruppe mit α -Chloressigsäure, dem Kupplungsreagenz Benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphonium-hexafluorophosphat (PyBOP) und der Base N,N-Diisopropylethylamin (DIPEA) am N-Terminus des Abstandshalters aufgebaut (Abschnitt 5.4.1.14), um die fünf reaktiven Ligandvarianten **CI- n L-f** zu erhalten (Abbildung 24). Da sich im Verlauf erster Testexperimente herausstellte, dass der Ligand **CI-9L-f** Bestandteil des schnellsten Protein-Ligand-Paares war (Abschnitt 3.4.2), wurde von dem als Kontrolle genutzten inversen Liganden nur die Variante **CI-9iL-f** hergestellt.

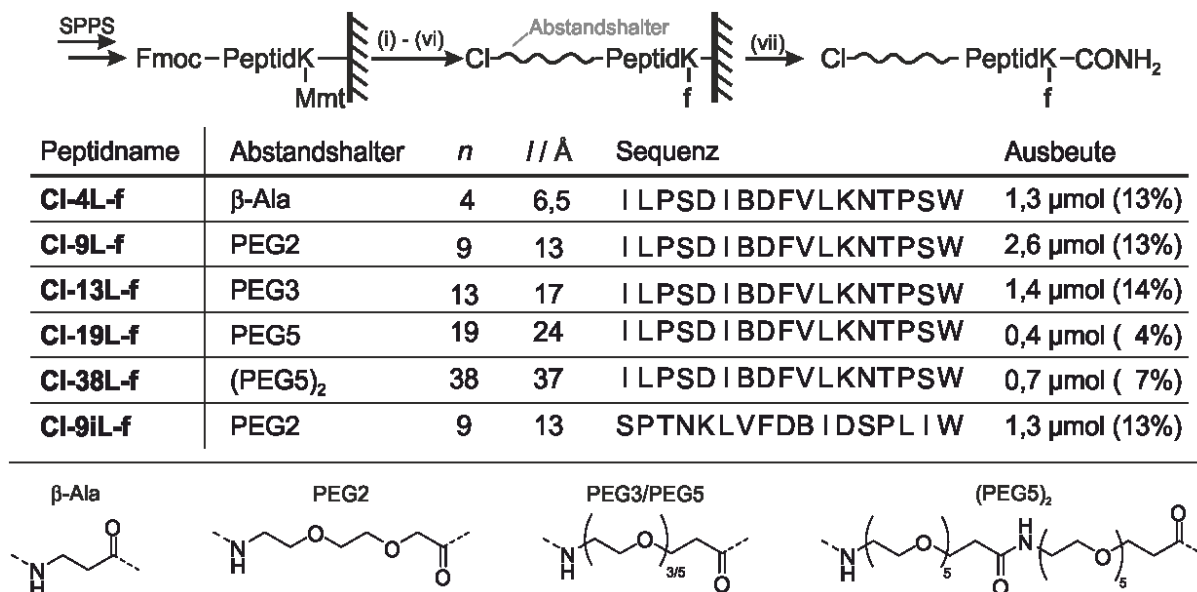


Abbildung 24: Festphasenpeptidsynthese (SPPS) zur Herstellung reaktiver Liganden **CI- n L-f** mit Abstandshaltern unterschiedlicher Atomzahl n sowie Länge l . Die Peptidsequenzen sowie die Ausbeute der Peptide sind aufgeführt. Nach Synthese der peptidischen Kernsequenz wurden folgende Reaktionen durchgeführt: (i) Abspaltung der N -terminalen Fmoc-Gruppe; (ii) Modifizierung des N -Terminus mit den fünf unterschiedlichen Fmoc-geschützten Abstandshaltern; (iii) Abspaltung der Mmt-Schutzgruppe des C -terminalen Lysins; (iv) Modifizierung des C -terminalen Lysins mit FITC; (v) Abspaltung der N -terminalen Fmoc-Gruppe; (vi) Kupplung von α -Chloressigsäure an den N -Terminus; (vii) Vollabspaltung vom Harz.

3.4.2 Reaktivitätstest

Um einen ersten Eindruck von den Reaktionsgeschwindigkeiten der diversen Protein-Ligand-Paare zu erhalten, wurde von Herrn M. Schmidt im Rahmen seiner Bachelorarbeit ein Reaktivitätstest durchgeführt, in dem alle sechs Cystein-enthaltenen Proteinvarianten mit allen fünf reaktiven Liganden **CI- n L-f** umgesetzt wurden (Abschnitt 5.7.1), um die initiale Reaktionsgeschwindigkeit der einzelnen Protein-Ligand-Paare abzuschätzen. Die Protein- und Ligandkonzentrationen ($c_P = 20 \mu\text{M}$, $c_L = 10 \mu\text{M}$) lagen dabei oberhalb der zuvor bestimmten Dissoziationskonstanten ($K_d = 0.2\text{--}2.4 \mu\text{M}$), um eine quantitative Assoziation der Reaktionspartner zu gewährleisten.^{115,183} Die Reaktion wurde durch Ansäuern der Reaktionslösung und damit einhergehender Absenkung der Nukleophilie des Thiols¹¹⁵ gestoppt und die Ausbeute der Reaktion mittels analytischer HPLC und spektroskopischer Detektion bei 440 nm bestimmt (Abschnitt 5.7.3).^{181,182} Wie in diesem Experiment müssen zur Optimierung eines nachbarschaftsinduzierten Reaktionssystems oft verschiedene Protein-Ligand-Paare verglichen werden, was einen erheblichen experimentellen Aufwand mit sich bringt.^{9,10,15,16,82,90} Um eine rationale Designstrategie zu entwickeln, wurden

molekulardynamische (MD) Simulationen von Herrn Dr. D. M. Krüger durchgeführt (Abschnitt 5.6), mit denen die Reaktivität der verschiedenen Protein-Ligand-Paare vorhergesagt werden sollte. Dabei wurde als Vorhersage für die initiale Reaktionsgeschwindigkeit v die prozentuale Aufenthaltswahrscheinlichkeit P des α -Kohlenstoffs der reaktiven Gruppe am Liganden innerhalb von 5 Å um das Thiol des proteinogenen Cysteins verwendet (Abbildung 25a, Tabelle A6).

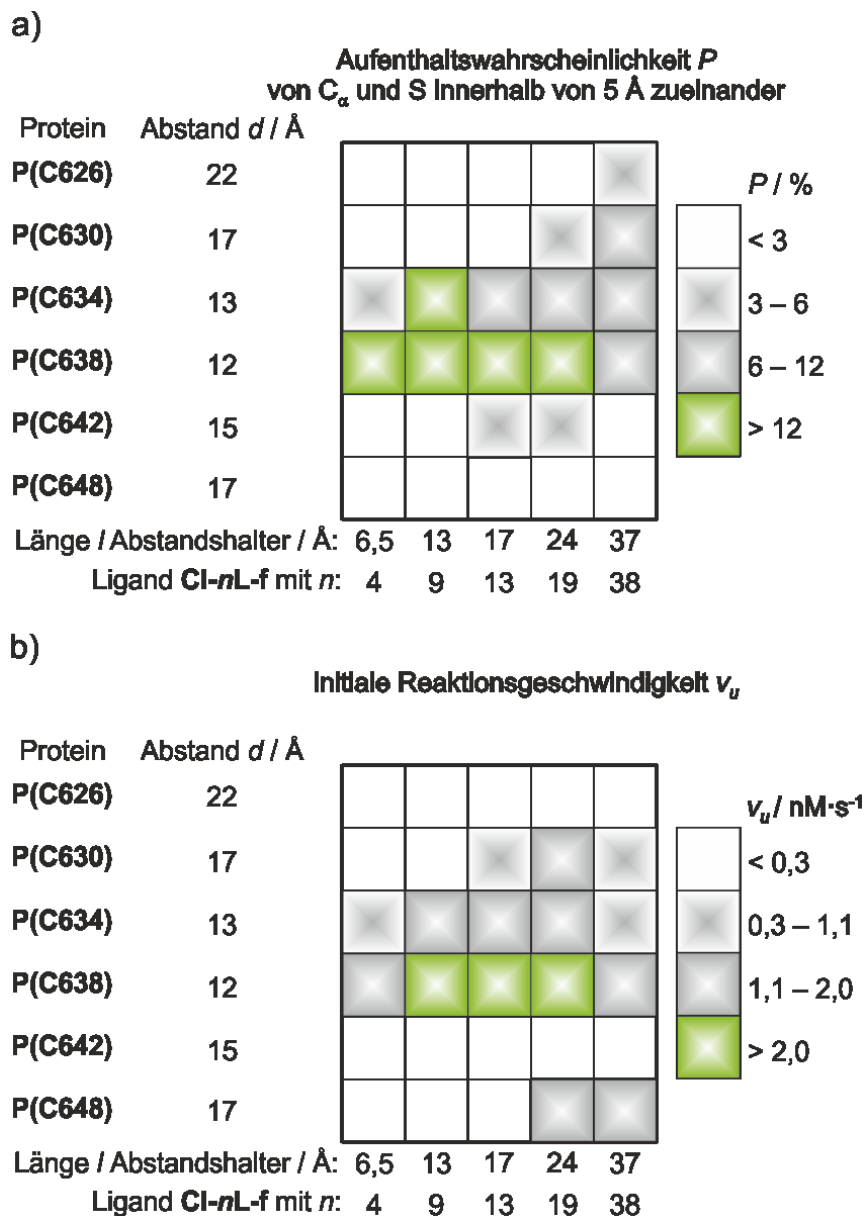


Abbildung 25: Vergleich der Ergebnisse der molekulardynamischen Simulationen mit denen des initialen Reaktivitätstests. a) *Heatmap* der molekulardynamischen Simulationen. Für jedes Protein-Ligand-Paar ist die prozentuale Aufenthaltswahrscheinlichkeit P des α -Kohlenstoffs der reaktiven Gruppe am Liganden innerhalb von 5 Å um das Schwefelatom des proteinogenen Cysteins aufgetragen. b) *Heatmap* des Reaktivitätstests. Für jedes Protein-Ligand-Paar ist die abgeschätzte initiale Reaktionsgeschwindigkeit v_u dargestellt.

Die Auswertung der molekulardynamischen Simulationen zeigte, dass Proteinvarianten mit möglichst geringem Abstand d zwischen dem N -Terminus des Liganden und dem Thiol des eingebrachten Cysteins theoretisch schneller reagieren als solche mit größeren Abständen. Dabei muss die Länge l des Abstandshalters am Liganden zudem optimal gewählt sein. Ist dieser zu kurz, wie z. B. beim Protein-Ligand-Paar **P(C634)+CI-4L-f**, ist die Wahrscheinlichkeit für ein Treffen der beiden reaktiven Gruppen niedrig. Auch wenn der Abstandshalter zu lang ist (z. B. **P(C638)+CI-38L-f**), ist die Wahrscheinlichkeit für eine Annäherung der reaktiven Gruppen vermindert. Dies lässt sich durch die erhöhte Anzahl an Freiheitsgraden und somit Konformationen der längeren Abstandshalter erklären.

Ein Vergleich dieser theoretischen Daten mit den Ergebnissen der experimentellen Messung (Abbildung 25b) zeigt, dass die beiden Datensätze eine gute Korrelation zueinander haben (Pearson-Koeffizient $r = 0,75$, Abbildung A85). Insbesondere ist wichtig, dass die Vorhersage der Proteinvarianten **P(C634)** und **P(C638)** als Bestandteile der effektivsten Reaktionspaare korrekt war. Für das Protein **P(C638)** mit den Liganden **CI-9L-f**, **CI-13L-f** und **CI-19L-f** war die Reaktion bereits nach einer Stunde vollständig. Das Protein **P(C634)** erreichte zu diesem Zeitpunkt mit denselben Abstandshaltern Ausbeuten von etwa 50% (Tabelle A7). Somit bestätigten diese Versuche die MD Simulation, welche postulierte, dass die Proteinvariante **P(C638)** reaktiver als die Variante **P(C634)** ist. Da die beiden dort eingebrachten Thiole laut der Abstandsbestimmung mittels *Pymol* ähnlich weit vom N -Terminus des Liganden entfernt sein sollten, zeigte sich hier, dass die molekulardynamische Simulation eine genauere Vorhersage der Reaktivität ermöglicht als eine bloße Abstandsmessung innerhalb statischer Strukturdaten. Dies liegt unter anderem daran, dass die Simulation strukturelle Änderungen in der Interaktion zwischen den Proteinvarianten und Liganden berücksichtigt. Dennoch sind die Vorhersagen der Simulation nicht vollkommen verlässlich, da sie vorhersagte, dass die Proteinvariante **P(C626)** mit dem Liganden **CI-38L-f** reagiert. Dieses Protein-Ligand-Paar zeigt jedoch im Experiment keinerlei Reaktivität. Dies gilt z. B. auch für die Proteinvariante **P(C642)**, welche laut Vorhersage mit den Liganden **CI-13L-f** und **CI-19L-f** reagieren sollte. Möglicherweise ist in diesen beiden Proteinvarianten die Reaktivität der Thiole durch ihre Mikroumgebung beeinflusst (herabgesetzt).^{111,112,129,184,185} Da der Mutationspunkt der Proteinvariante **P(C642)** die C -terminale Aminosäure der α_2 -Helix des Proteins (AS 623-642) betrifft, könnte ihre Nukleophilie durch den wegen des Helixdipols partiell negativ geladenen C -Terminus herabgesetzt sein.¹⁸⁵ Auch die Proteinvariante **P(C648)** zeigt

deutliche Abweichungen zwischen der Vorhersage und dem experimentellen Ergebnis. So wurden bei den beiden längsten Abstandshaltern experimentell Reaktionsumsätze ermittelt, obwohl diese Proteinvariante laut den molekulardynamischen Simulationen mit keinem Liganden reagieren sollte. Da für diese Proteinvariante bereits während der Proteinaufreinigung Hinweise auf eine veränderte Proteinstabilität und somit –struktur bemerkt wurden (vgl. Abschnitt 3.2.1), ist es möglich, dass in ihr gravierende strukturelle Änderungen auftreten, die im Rahmen der molekulardynamischen Simulation nicht vorhergesagt werden konnten.

3.4.3 Bestimmung der initialen Reaktionsgeschwindigkeit einzelner Protein-Ligand-Paare

Im Reaktivitätstest war das Protein **P(C638)** mit den drei Liganden **CI-9L-f**, **CI-13L-f** und **CI-19L-f** am reaktivsten (Abschnitt 3.4.2). Daher wurden für diese Kombinationen die initialen Reaktionsgeschwindigkeiten in unabhängigen Triplikaten ermittelt (Abschnitt 5.7.2). Hierzu wurde zunächst mittels Fluoreszenzpolarisationsspektroskopie überprüft, ob der als Kontrolle ausgewählte Ligand **H-iL-f** für die Proteinvariante **P(C638)** eine ausreichend verminderte Affinität besitzt. In der Messung war es nicht möglich, das zur Auswertung benötigte obere Plateau zu erreichen (Abschnitt 5.5.1, Abbildung A82). Eine Abschätzung der Dissoziationskonstante K_d ergab jedoch, dass der Ligand **H-iL-f** mindestens 75-fach schlechter an das Protein **P(C638)** bindet als der Ligand **H-L-f**, sodass dieser als Kontrolle für die nicht-nachbarschaftsinduzierte Reaktion zwischen der reaktiven Gruppe des Liganden und dem Thiol des proteinogenen Cysteins geeignet ist.

Zur Bestimmung der initialen Reaktionsgeschwindigkeiten wurden Protein- und Ligandkonzentrationen analog zum Reaktivitätstest verwendet ($c_P = 20 \mu\text{M}$, $c_L = 10 \mu\text{M}$). Unter diesen Reaktionsbedingungen ist das reaktivste Protein-Ligand-Paar **P(C638)+CI-9L-f** bereits nach 15 Minuten vollständig umgesetzt (Abbildung 26a&b, Tabelle A9), was einer initialen Reaktionsgeschwindigkeit v von $34 \pm 1,9 \text{ nM}\cdot\text{s}^{-1}$ entspricht. Die initialen Reaktionsgeschwindigkeiten der beiden anderen Liganden liegen mit $v = 8,9 \pm 0,59 \text{ nM}\cdot\text{s}^{-1}$ für **CI-13L-f** bzw. $v = 7,6 \pm 0,83 \text{ nM}\cdot\text{s}^{-1}$ für **CI-19L-f** deutlich darunter. Die entsprechenden Reaktionen sind erst nach ca. einer Stunde vollständig (Abbildung 26b, Tabelle A10&A11). Da die verschiedenen Studien zu nachbarschaftsinduzierten Reaktionen unterschiedliche Reaktionsbedingungen verwenden, ist ein direkter Vergleich ihrer initialen Reaktionsgeschwindigkeiten schwierig. Jedoch liegen die publizierten Halbwertszeiten in Bereichen

von etwa zehn Minuten bis 48 Stunden.⁵⁻¹⁷ Die hier erzielte Halbwertszeit von fünf Minuten liegt somit im oberen Bereich für nachbarschaftsinduzierte Reaktionen (Tabelle A9). Hierdurch wurde gezeigt, dass auch von Protein-Protein-Interaktionen abgeleitete peptidische Liganden ihre Zielproteine in nachbarschaftsinduzierten Reaktionen effizient modifizieren. Zudem kann auch mit einem relativ schwach-affinen Liganden in einer nachbarschaftsinduzierten Reaktion eine hohe Reaktionsgeschwindigkeit erreicht werden.

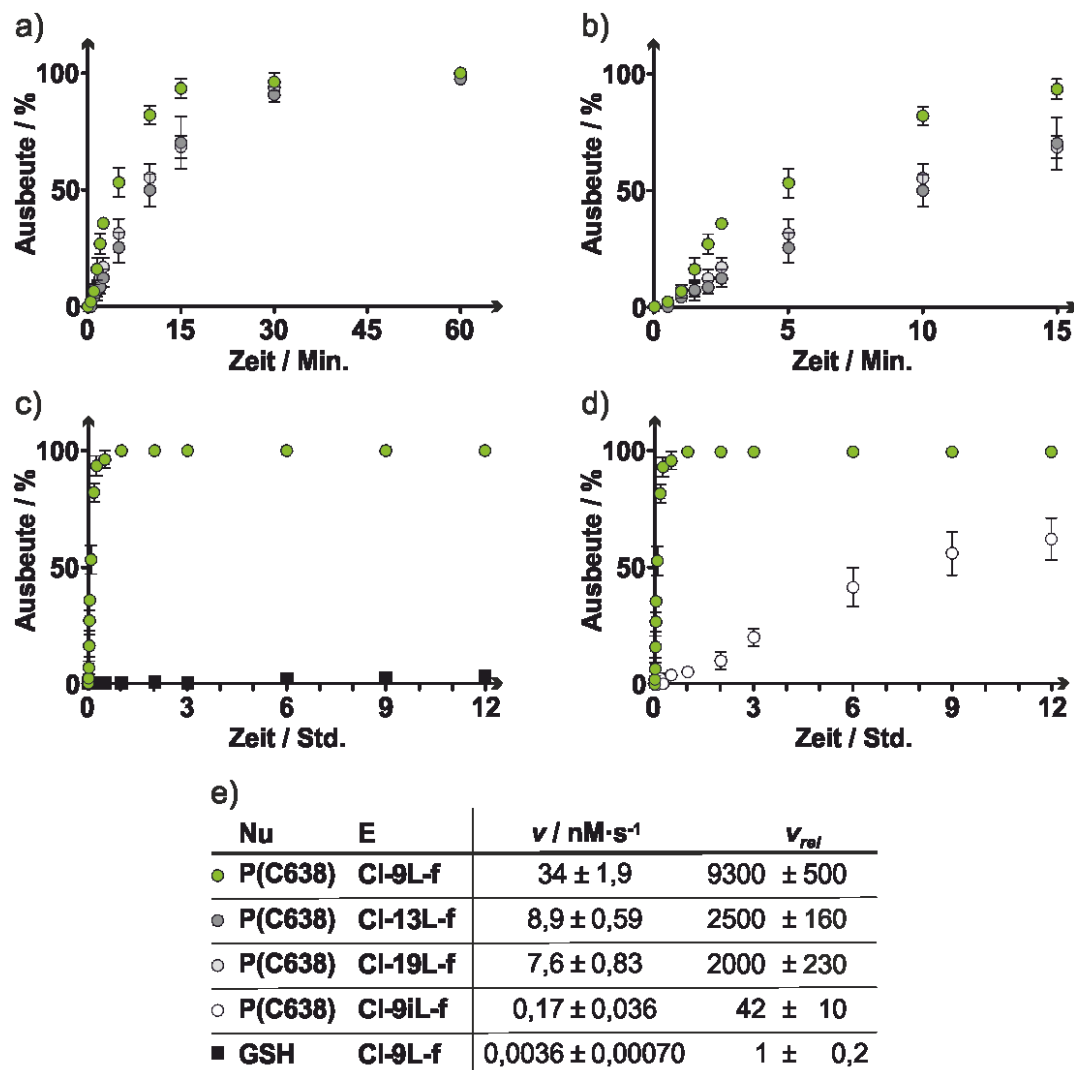


Abbildung 26: a) Graphische Darstellung der Reaktionsausbeuten zur Bestimmung der initialen Reaktionsgeschwindigkeit zwischen dem Protein P(C638) und den elektrophilen Liganden Cl-9L-f, Cl-13L-f und Cl-19L-f über 1 Stunde. b) Vergrößerung der ersten 15 Minuten der Daten in a). c) Graphische Darstellung der Reaktionen zur Bestimmung der initialen Reaktionsgeschwindigkeit zwischen den Nukleophilen P(C638) und GSH mit dem Liganden Cl-9L-f über 12 Stunden. d) Graphische Auswertung der Reaktionsausbeuten zur Bestimmung der initialen Reaktionsgeschwindigkeit zwischen dem Protein P(C638) mit den Liganden Cl-9L-f und Cl-9iL-f über 12 Stunden. e) Initiale Reaktionsgeschwindigkeiten v und relative Geschwindigkeiten v_{rel} im Vergleich zur nicht nachbarschaftsinduzierten Reaktion des Paares GSH und Cl-9L-f für die in a)-d) gezeigten Reaktionspaare.

Um die initiale Reaktionsgeschwindigkeit einer nicht durch den Nachbarschaftseffekt beschleunigten Reaktion der α -Chloracetamidgruppe mit Thiolen zu bestimmen, wurde eine Messung mit Glutathion ($c_{GSH} = 20 \mu\text{M}$) durchgeführt. Dieses wurde anstelle des Proteins **P(C638)** mit dem Liganden **CI-9L-f** inkubiert, während alle weiteren Reaktionsbedingungen beibehalten wurden (Abbildung 26c). In dieser Reaktion wurden erst nach drei Stunden Spuren von Produkt detektiert, sodass die Inkubationszeit auf insgesamt zwölf Stunden verlängert wurde, um die initiale Reaktionsgeschwindigkeit zu bestimmen. Diese liegt bei $v = 0,0036 \pm 0,0007 \text{ nM}\cdot\text{s}^{-1}$. Die nachbarschaftsinduzierte Reaktion zwischen **P(C638)** und **CI-9L-f** ist somit um einen Faktor 9300 ± 500 schneller als die nicht-nachbarschaftsinduzierte Vergleichsreaktion.

Als zusätzliche Kontrolle der Hintergrundaktivität von Thiolen mit der α -Chloracetamidgruppe wurde der Ligand **CI-9iL-f** verwendet. Dieser hatte bei gleichen Konzentrationen der Reaktionspartner eine deutlich höhere initiale Reaktionsgeschwindigkeit ($v = 0,17 \pm 0,036 \text{ nM}\cdot\text{s}^{-1}$) als die soeben beschriebene Reaktion mit GSH (Abbildung 26c&d). Es kann also davon ausgegangen werden, dass dieser Ligand eine Restaffinität für das Protein besitzt. Dies lässt sich durch die vielen verschiedenen peptidischen Interaktionspartner der verwendeten Proteindomäne erklären, welche allesamt über hydrophobe Wechselwirkungen binden und dabei nicht nur mit zwei verschiedenen Bindestellen interagieren, sondern in diesen auch noch verschiedene Interaktionsgeometrien aufweisen.¹³⁸ Da die initiale Reaktionsgeschwindigkeit des schnellsten Protein-Ligand-Paares **P(C638)+CI-9L-f** mit einem Faktor von $v_{rel} = 200 \pm 11$ trotzdem deutlich oberhalb der Geschwindigkeit dieser Kontrollreaktion lag, wurde der Ligand **iL** *in cellulo* als Kontrolle für unspezifische Reaktionen verwendet (Abschnitt 3.5).

Als Kontrolle auf Reaktionen des α -Chloracetamids mit den Seitenketten anderer Aminosäuren als Cystein wurde das nicht-mutierte Protein **P(WT)** mit allen Liganden inkubiert. Hierbei konnte auch nach zwölf Stunden kein Reaktionsumsatz detektiert werden, wodurch die hohe Spezifität der α -Chloracetamidgruppe für Thiole bestätigt wurde.

3.4.4 Massenspektrometrische Analyse des P(C638)-L9-Konjugates

Um nachzuweisen, dass der im Verlauf der Reaktionen zur Ermittlung der initialen Reaktionsgeschwindigkeit entstehende neue Signalausgang in der analytischen HPLC dem kovalenten Produkt **P(C638)-9L-f** aus dem Protein **P(C638)** mit dem Liganden **CI-9L-f** entsprach, wurden massenspektrometrische Untersuchungen durchgeführt. Zunächst wurden

die beiden Reaktionspartner analog zu den Reaktionen zur Bestimmung der initialen Reaktionsgeschwindigkeit zu vollständigem Umsatz gebracht und mittels HPLC-MS untersucht (Abschnitt 5.7.4). Hierbei konnte das kovalente Proteinkonjugat **P(C638)-9L-f** als Hauptprodukt der Reaktion identifiziert werden (Abbildung A87).

Anschließend wurde ein tryptischer *In-Gel*-Verdau durchgeführt und mittels HPLC-MS² analysiert, um die im kovalenten Protein-Ligand-Konjugat modifizierte Aminosäure zu identifizieren (Abschnitt 5.7.5). Da das Reaktionsprodukt **P(C638)-9L-f** im Vergleich zum unmodifizierten Protein **P(C638)** nur einen sehr geringen Massenzuwachs (ca. 2,7 kDa) aufweist, laufen die korrespondierenden Banden auf denaturierenden SDS-Polyacrylamidgelen sehr dicht beieinander. Daher wurde für diesen Versuch mit einem Überschuss an **Cl-9L-f** inkubiertes **P(C638)** verwendet, um die Konjugatprobe nicht mit unmodifiziertem Protein zu verunreinigen. Diese Probe wurde mit separat auf das SDS-Polyacrylamidgel aufgetragenem, unmodifiziertem Protein verglichen. Nach der elektrophoretischen Trennung der Reaktionslösung war auf dem Coomassie-gefärbten SDS-Polyacrylamidgel eine geringe Verschiebung der Bande des Proteinkonjugates **P(C638)-9L-f** zu höheren Molekulargewichten im Vergleich zum nicht-modifizierten Protein **P(C638)** sichtbar (Abbildung A88). Nach dem tryptischen *In-Gel*-Verdau wurden die erhaltenen Peptide mittels HPLC-MS² analysiert. Um das Konjugat mit Hilfe der automatischen Analysesoftware *MaxQuant* zu finden wurden die beiden möglichen Modifikationen durch den Liganden **Cl-9L-f** angegeben (Abbildung A89). Dieser bindet theoretisch vollständig an das Protein. Da der Ligand jedoch eine Schnittstelle für die verwendete Endopeptidase Trypsin aufweist,¹⁶² können auch mit dem entsprechend hydrolysierten Liganden modifizierte Peptide entstehen. Tatsächlich wurden in der Probe des Konjugates **P(C638)-9L-f** hauptsächlich mit diesem verkürzten Liganden modifizierte Peptide detektiert. Keines dieser Peptide konnte in der Kontrollreaktion mit dem unmodifizierten Protein **P(C638)** gefunden werden. Stattdessen waren die korrespondierenden Peptidfragmente in dieser Probe am Cystein carbamidomethyliert (Abbildung 27). Da diese Modifikation in der Konjugatprobe nicht detektiert werden konnte, muss das Cystein bereits vor dem tryptischen *In-Gel*-Verdau modifiziert gewesen sein. Dies zeigt, dass in der hier entwickelten nachbarschaftsinduzierten Reaktion spezifisch und in hoher Ausbeute das Cystein der Proteinvariante **P(C638)** modifiziert wird.

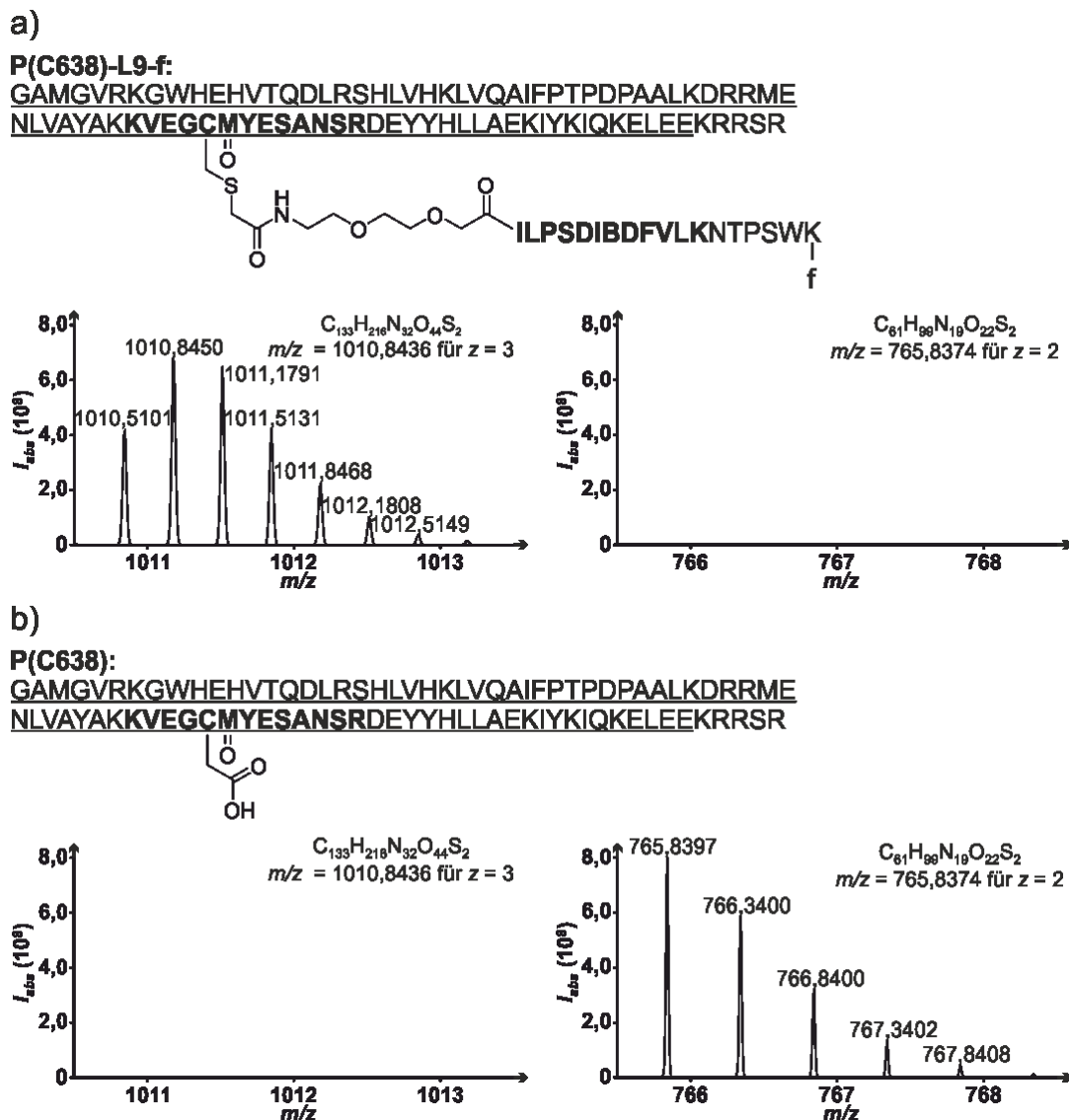


Abbildung 27: Charakterisierung a) des kovalenten Protein-Ligand-Konjugates **P(C638)-9L-f** im Vergleich mit b) dem nicht modifizierten Protein **P(C638)**. Für beide Proben ist die vollständige Proteinsequenz dargestellt. Die in der MS²-Messung nachgewiesenen Sequenzabschnitte sind unterstrichen. Unterhalb der Sequenzen sind exemplarische Spektren der hochauflösten Massenspektrometrie (HRMS) gezeigt. Links ist dabei jeweils der Spektrenbereich des in a) fett markierten, Ligand-modifizierten Peptides aus dem Protein-Ligand-Konjugat gezeigt, rechts der Bereich des in b) fett markierten carbamidomethylierten Peptides. Beide Peptide wurden mit einfach oxidiertem Methionin detektiert.

3.4.5 Evaluierung von Nebenreaktionen

Bevor das nachbarschaftsinduzierte Reaktionssystem für Experimente in humanen Zellen adaptiert wurde, wurden zwei weitere *in vitro* Analysen vorgenommen, um mögliche Nebenreaktionen zu untersuchen. Da Glutathion (GSH) das häufigste zelluläre Thiol ist,^{156,186} wurde seine Reaktivität mit dem Liganden **CI-9L-f** erneut untersucht. Dabei wurde

eine Konzentration von 5 mM verwendet, welche im Rahmen der in humanen Zellen vorkommenden Konzentrationen liegt (Abschnitt 5.7.2).^{156,186} Auch nach zwölf Stunden Inkubationszeit erreichte der Ligand **CI-9-f** keinen vollständigen Umsatz mit 5 mM GSH (Abbildung 28). Die initiale Reaktionsgeschwindigkeit betrug $v = 0,015 \pm 0,030 \text{ nM}\cdot\text{s}^{-1}$. Die nachbarschaftsinduzierte Reaktion läuft mit einem Faktor von $v_{rel} = 200 \pm 13$ deutlich schneller ab, sodass Nebenreaktionen mit zellulärem GSH vernachlässigbar sein sollten.

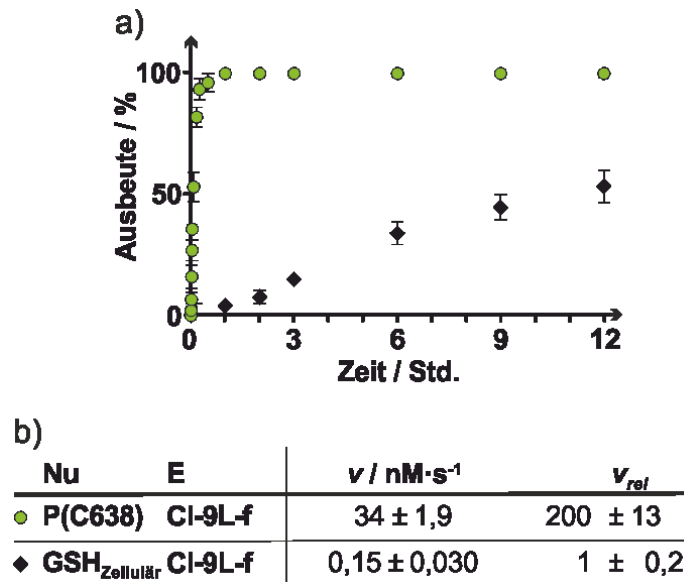


Abbildung 28: Graphische Darstellung der Reaktionsausbeute zur Bestimmung der initialen Reaktionsgeschwindigkeit zwischen einer zellulären Konzentration an GSH mit dem elektrophilen Liganden **CI-9L-f** über 12 Stunden. Zum Vergleich wird das schnellste nachbarschaftsinduzierte Reaktionspaar **CI-9L-f** mit **P(C638)** gezeigt. In der Tabelle sind die berechneten initialen Reaktionsgeschwindigkeiten v für die beiden Reaktionspaare sowie die relative Geschwindigkeit v_{rel} im Vergleich zur nicht-nachbarschaftsinduzierten Reaktion des Paares GSH und **CI-9L-f** aufgeführt.

Anschließend wurden Markierungsreaktionen der Proteine **P(WT)** und **P(C638)** mit dem Liganden **CI-9L-f** in künstlich versetzten *E. coli*-Zelllysaten durchgeführt (Abschnitt 5.7.6.1). Dabei wurden abgesehen vom Reaktionsmedium dieselben Bedingungen wie in den Reaktionen zur Bestimmung der initialen Reaktionsgeschwindigkeit verwendet und über drei Stunden Proben entnommen. Diese wurden mittels SDS-PAGE und Fluoreszenzdetektion der FITC-Modifizierung des Liganden ausgewertet (Abbildung 29). Als Kontrolle für die Laufhöhe des kovalenten Protein-Ligand-Konjugates **P(C638)-9L-f** wurde mit einem Überschuss des Liganden **CI-9L-f** versetztes aufgereinigtes Protein **P(C638)** aufgetragen. Obwohl für das **P(C638)**-versetzte Lysat leichte Nebenreaktionen detektiert werden, nehmen diese im Verlaufe der Reaktion kaum zu. Zudem ist die deutlich sichtbare kovalente Modifizierung des Proteins **P(C638)** nach fünf bis zehn Minuten

vollständig, da die Intensität der Bande des **P(C638)-9L-f**-Konjugates nicht weiter zunimmt. Obwohl in dem mit **P(WT)** versetzten Lysat die reaktive Gruppe des Liganden nicht durch Reaktion mit dem Cystein seines Zielprotein abreagieren kann, sind die dort auftretenden Signale der Nebenreaktionen nicht intensiver als im mit **P(C638)**-versetzten Lysat. Auch treten keine zusätzlichen Banden unspezifisch modifizierter Proteine auf. Dies zeigt, dass die untersuchte nachbarschaftsvermittelte Reaktion zwischen **P(C638)** und **Cl-9L-f** auch in komplexen Reaktionsmedien schnell und spezifisch abläuft, während die α -Chloracetamidgruppe in nicht-nachbarschaftsinduzierten Reaktionen kaum reagiert.

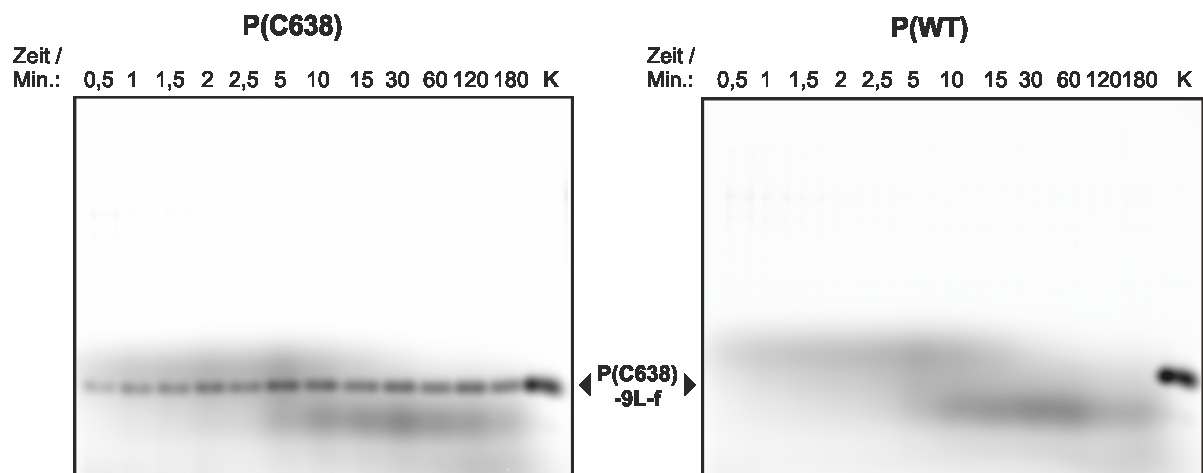


Abbildung 29: Fluoreszenzaufnahmen 17%-iger SDS-Polyacrylamidgele der Markierungsexperimente in mit **P(C638)**- (links) bzw. **P(WT)**-versetzten (rechts) *E. coli*-Zelllysaten mit dem Liganden **Cl-9L-f**. Das Fluorophor FITC wurde bei $\lambda_{ex} = 488$ nm angeregt und seine Emission bei $\lambda_{em} > 526$ nm detektiert. Die Aufnahme wurde mit einer Pixelgröße von 50 μm aufgenommen. K: Kontrolle für die Laufhöhe der Bande des kovalenten Protein-Ligand-Konjugates **P(C638)-9L-f**.

3.5 Zelluläre Translokation des Zielproteins

3.5.1 Systemübertragung auf humane Zellen

3.5.1.1 Herstellung geeigneter Vektoren zur humanen Proteinexpression

Um die Proteinvarianten in humanen Zellen exprimieren zu können, wurden Vektoren benötigt, die eukaryotische Enhancer- und Promotorsequenzen vor der DNS-Sequenz des Zielproteins enthielten. Da eukaryotische Promotoren in verschiedenen Zelllinien und z. T. in Abhängigkeit des exprimierten Proteins für unterschiedlich starke Expressionslevel sorgen können,^{187–191} wurde der Cytomegalovirus (CMV-)Promotor ausgewählt, welcher in vielen kommerziellen Vektoren erhältlich ist und i. d. R. zellunabhängig zuverlässige Expressionsraten zeigt.^{191–193}

Da die Lokalisation der Proteinvarianten innerhalb der Zellen detektiert werden sollte, sollten diese als Fusionsproteine mit einem fluoreszierenden Protein (FP) exprimiert werden. Um ein geeignetes FP zu identifizieren wurden Vektoren für die *N*- und *C*-terminale Fusion der Proteine **P(WT)** und **P(C638)** mit den FPs mCherry, mTurquoise2 und eGFP mittels Restriktions-Ligations-Klonierung hergestellt (Abschnitt 5.2.8).^a

Durch konfokale Mikroskopie von HeLa-Zellen, welche die verschiedenen fluoreszierenden Proteine transient exprimierten, wurde ermittelt, dass unter den zur Mikroinjektion verwendeten Bedingungen mit diesem Mikroskop am besten mCherry-Fusionsproteine visualisiert werden konnten.^b Daher wurden alle weiteren Versuche mit den *N*- oder *C*-terminal mCherry-modifizierten Zielproteinen **P(WT)** und **P(C638)** durchgeführt.

^a Dazu wurden zunächst die gewünschten Zielvektoren aus *E. coli* DH5 α -Zellen isoliert und die benötigten Inserts mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) amplifiziert und aufgereinigt. Anschließend wurde für jede Klonierung ein Restriktionsverdau des Vektors und des Inserts mit zwei Restriktionsendonukleasen vorgenommen, welche jeweils einen Einzelstrangüberhang produzieren. Dadurch war je eine Seite des Vektors komplementär zu einer Seite des Inserts, sodass dieses nur in der gewünschten Orientierung eingebaut werden konnte. Zusätzlich wurde der Vektor mit der alkalischen Phosphatase fast-AP inkubiert, um in der Ligationsreaktion eine Selbstligation des Vektors zu verhindern.^{232,291,292}

^b Die verwendeten Injektionsmarker benötigten dieselben Laser und Detektoreinstellungen wie eGFP, sodass diese nicht kombiniert werden konnten. Zudem konnte die Emission von mTurquoise2 mit den vorhandenen Filtern nicht von der Emission der Injektionsmarker getrennt werden.

3.5.1.2 Herstellung geeigneter Zelllinien zur Proteinexpression

Zur Gewinnung homogener Zelllysate sollten stabil transfizierte Zelllinien für die Fusionsproteine **P(C638)-mCherry**, **P(WT)-mCherry**, **mCherry-P(C638)** und **mCherry-P(WT)** generiert werden. Hierzu wurden zunächst HeLa-Zellen verwendet, da auch Mikroinjektionsexperimente mit diesen Zelllinien stattfinden sollten und HeLa-Zellen eine dafür günstige Morphologie aufweisen.¹⁹⁴ Zunächst wurden Testtransfektionen mit dem Transfektionsreagenz Lipofectamin[®] und den Vektoren pmCherry C1 und pP(WT)-mCherry an HeLa-Zellen durchgeführt. Dabei verminderte sich die Expressionsrate und somit die mCherry-Fluoreszenz der **P(WT)-mCherry** exprimierenden HeLa-Zellen innerhalb von 48 Stunden stark, während die mCherry exprimierenden Zellen keine Veränderung zeigten. Dies könnte am verwendeten CMV-Promotor liegen, dessen Aktivität von HeLa-Zellen vermindert werden kann, wenn er für die Zellen toxische Proteine reguliert.¹⁸⁷ Da die als Modellsystem verwendete Proteindomäne KIX ein wichtiger Mediator von Protein-Protein-Interaktionen in der Genregulation ist und mit Transaktivierungsdomänen verschiedenster Proteine in diversen Signalwegen wechselwirkt,^{138,195} kann ihre Überexpression in humanen Zellen deren Homöostase beeinflussen.

Da viele zelltoxische Substanzen einen konzentrationsabhängigen Effekt aufweisen, wurde zunächst versucht die Expressionsverminderung des **P(WT)-mCherry**-Proteins in HeLa-Zellen zu verringern, indem diese mit einer geringeren DNS-Menge transfiziert wurden. Dabei stellte sich heraus, dass mit einer DNS-Menge von 200 ng eine höhere Transfektionseffizienz erzielt werden konnte. Die Runterregulation des CMV-Promotors nach etwa 24 Stunden blieb jedoch bestehen. Daher wurden weitere Testtransfektionen an den humanen Zelllinien A549, BJ H-Ras, DU145, HCT116, Hek293, HepG2, HT29, MCF7, U2-OS, U373 und U87 durchgeführt (Abschnitt 5.8.3.2). Von diesen Zelllinien zeigten lediglich die Hek293-Zellen sowohl eine hohe Transfektionseffizienz als auch eine von der Kultivationszeit unabhängige Expressionsrate und somit Fluoreszenz (Abbildung A91 bis Abbildung A102).

Die Selektion der mit den Vektoren pmCherry-P(C638), pmCherry-P(WT), pP(C638)-mCherry und pP(WT)-mCherry transfizierten Hek293-Zellen zur Gewinnung stabil transfizierter Zelllinien zeigte jedoch deutlich, dass Zellpopulationen mit unterschiedlichen Fluoreszenzintensitäten unterschiedliche Wachstumsgeschwindigkeiten aufwiesen. Ungewöhnlich dabei war, dass die intensiver fluoreszierenden Zellen schneller

wuchsen als die schwächer fluoreszierenden.^a Dies deutete darauf hin, dass auch die Hek293-Zellen empfindlich auf die Überexpression der Zielproteine reagieren und die intensiver fluoreszierenden, schnell-wachsenden Zellen hauptsächlich reines mCherry anstatt des jeweiligen Fusionsproteins exprimieren. Die schwächer fluoreszierenden Zellen exprimieren hingegen das mCherry-fusionierte Zielprotein, welches ihre Wachstumsgeschwindigkeit im Gegensatz zum nicht-toxischen reinen mCherry verringert. Zum Nachweis dieser Vermutung wurden die Zellen mit Hilfe einer Durchflusszytometrie in je zwei neue polyklonale Zelllinien unterschiedlicher Fluoreszenzintensität aufgeteilt und expandiert (Abschnitt 5.8.6.1). Eine Expressionsanalyse mittels Western Blot (Abschnitt 5.8.6.4) bestätigte, dass in den intensiver fluoreszierenden Zellen im Verhältnis zu den gewünschten Fusionsproteinen deutlich mehr reines mCherry vorlag als in den schwächer fluoreszierenden Zellen (Abbildung A103). Da jedoch auch in der jeweils dunkleren Zelllinie freies mCherry oder verkürzte Fusionsprodukte exprimiert wurden, wurden aus jeder der dunkleren Zelllinien einzelne Zellen isoliert und monoklonale Zelllinien etabliert (Abschnitt 5.8.6.2 und 5.8.6.3). Anhand der Bandenmuster der Western Blots einer weiteren Expressionsanalyse wurden jeweils die Klone 2 der Konstrukte **mCherry-P** und die Klone 1 der Konstrukte **P-mCherry** für alle weiteren Experimente mit Hek293-Zellen verwendet, da diese den geringsten Anteil an verkürzten Fusionsproteinen oder reinem mCherry exprimierten (Abbildung A104 & Abbildung A105).

3.5.1.3 Identifizierung geeigneter Zelllinien zur Mikroinjektion

Die Liganden sollten mittels Mikroinjektion in humane Zellen eingebracht werden. Die zur Lysatgewinnung genutzten Hek293-Zellen sind für Mikroinjektionsexperimente durch ihre geringe Größe und schwache Adhäsion wenig geeignet.^{196,197} Obwohl sich die Adhäsion der Hek293-Zellen an die zur Mikroinjektion benötigten Glasoberflächen durch eine Poly-D-Lysin-Beschichtung verbessern ließ, konnte keine akzeptable Zahl adhärierter Zellen erzielt werden. Daher wurde die transiente Transfektion der HeLa-Zellen optimiert, indem das für diese Zelllinie besser geeignete Transfektionsreagenz X-tremeGENE verwendet wurde (Abschnitt 5.8.3.3). Hierdurch war es möglich eine Transfektionseffizienz von etwa 35% zu erreichen, welche für die folgenden Mikroinjektionsversuche ausreichend war.

^a Für gewöhnlich wachsen Zellen mit einer hohen Überexpression und somit in diesem Fall intensiver Fluoreszenz langsamer, da durch die Expression des transfizierten Zielgens viel Energie verbraucht wird, welche somit nicht für das Zellwachstum zur Verfügung steht.

3.5.1.4 Evaluierung von Nebenreaktionen in humanen Zellen

Durch die Beteiligung des Modellsystems an der eukaryotischen Transkriptionsmaschinerie ist es möglich,^{138,195} dass in Lysaten humaner Zellen andere Nebenreaktionen stattfinden als in den zuvor untersuchten *E. coli*-Zelllysaten (vgl. Abschnitt 3.4.5). Daher wurden die Markierungsexperimente für Lysate der monoklonalen Hek293-Zelllinien adaptiert (Abschnitt 5.7.6.2). Zur Bestimmung der Bandenlage von mit **CI-9L-f** umgesetztem **P(C638)-mCherry** wurde ein aufgereinigtes **P(C638)-mCherry**-Fusionsprotein benötigt. Daher wurde ein pGEX-4T5-Expressionvektor zur Expression eines **GST-P(C638)-mCherry**-Fusionsproteins in *E. coli*-Zellen mittels *in vivo*-Klonierung hergestellt (Abschnitt 5.2.9).^a

Die Expression und Aufreinigung des **P(C638)-mCherry**-Fusionsproteins erfolgte zunächst analog zu der der sieben freien KIX-Proteinvarianten mittels GSH-Affinitätschromatographie und TEV-Protease-Verdau (Abschnitt 5.3.2). Jedoch war eine Gelpermeationschromatographie zur Abtrennung der TEV-Protease (73,6 kDa) und des GST-Dimers (52 kDa) nicht möglich, da deren Molekulargewichte zu nah an dem des **P(C638)-mCherry**-Fusionsproteins (37,7 kDa) lagen. Stattdessen wurden eine reverse Maltose- sowie eine reverse GSH-Affinitätschromatographie durchgeführt, um Protease und GST-Dimer abzutrennen. Um die reverse GSH-Affinitätschromatographie zu ermöglichen, wurde zuvor das aus dem Elutionspuffer der ersten GSH-Affinitätschromatographie stammende GSH parallel zum TEV-Protease Verdau mittels Dialyse aus der Proteinlösung entfernt. Anschließend wies das Fusionsprotein **P(C638)-mCherry** noch Verunreinigungen auf, sodass eine Gelpermeationschromatographie und eine zweite reverse GSH-Affinitätschromatographie durchgeführt wurden. Da die Hauptbande im als Kontrolle durchgeführten SDS-Polyacrylamidgel (Abbildung A26) eindeutig dem Fusionsprotein zugeordnet werden konnte, sodass dieses als Kontrolle der Markierungsexperimente in Hek293-Zelllysaten dienen konnte, wurden die verbleibenden Verunreinigungen toleriert.

^a Diese Klonierungsstrategie war notwendig, da der Ausgangsvektor mit der Restriktionsendonuklease *NcoI* geschnitten werden musste und die mCherry-Gensequenz ebenfalls eine Schnittstelle für dieses Enzym enthält (Abbildung A6). Daher wurde nur der Zielvektor mit Hilfe zweier Restriktionsendonukleasen geschnitten, während das mCherry-Insert lediglich mittels PCR amplifiziert wurde. Dabei besaßen beide Primer an ihrem 5'-Ende einen Überhang, welcher komplementär zum Zielvektor war. Nachdem die beiden Reaktionen aufgereinigt worden waren, wurden sie gemeinsam in *E. coli* Omnimax-Zellen transformiert. In diesen fand die Ligationreaktion zum vollständigen pGEX-4T5-P-mCherry-Vektor statt.²³³

Da die mCherry-Konzentration in den Hek293-Zelllysaten mit Hilfe der intrinsischen mCherry-Fluoreszenz zu $2\ \mu\text{M}$ bestimmt wurde (Abschnitt 5.3.3), wurde in den Markierungsexperimenten die Ligandkonzentration auf $1\ \mu\text{M}$ herabgesetzt um das für die *in vitro* Experimente verwendete Verhältnis der Reaktionspartner beizubehalten. Nach Inkubation der Reaktionslösungen bei 37°C für 3 Stunden wurden die erhaltenen Proben mit SDS-PAGE und Fluoreszenzanalyse der erhaltenen Gele analysiert (Abbildung 30). In den Lysaten der Hek293-Zellen reagierten wesentlich mehr Proteine unspezifisch mit dem Liganden **CI-9L-f** als in den *E. coli*-Zelllysaten. Zudem konnte auf Höhe der Kontrollprobe keine Bande für das **P(C638)-9L-f-mCherry**-Konjugat detektiert werden.

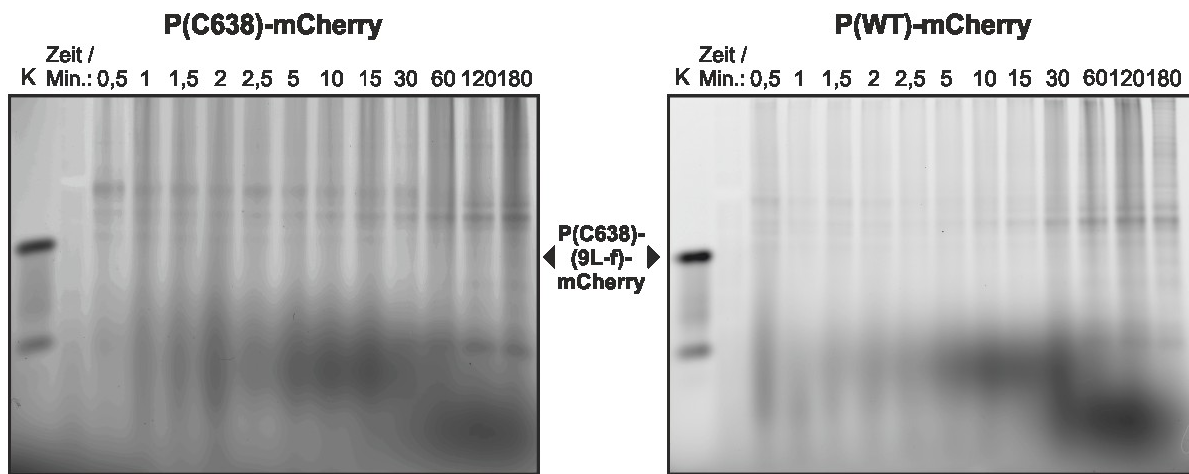
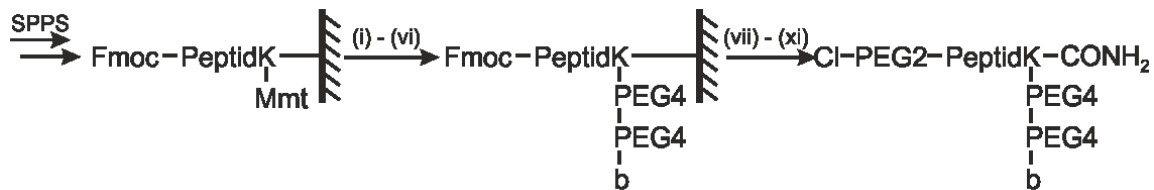


Abbildung 30: Fluoreszenzaufnahme der SDS-Polyacrylamidgels des Lysatlabels in Hek293-Zelllysaten mit exprimiertem **P(WT)-** oder **P(C638)-mCherry** und dem zugegebenem Liganden **CI-9L-f**. Das Fluorophor FITC wurde bei $\lambda_{ex} = 488\ \text{nm}$ angeregt und seine Emission bei $\lambda_{em} > 526\ \text{nm}$ detektiert. Die Aufnahme wurde mit einer Pixelgröße von $50\ \mu\text{m}$ aufgenommen. K: Kontrolle für die Laufhöhe der Bande des kovalenten Protein-Ligand-Konjugates **P(C638)-9L-f-mCherry**.

Das zur Kontrolle der Bandenlage aus *E. coli*-Zellen aufgereinigte **P(C638)-mCherry**-Fusionsprotein reagiert effizient mit dem Liganden **CI-9L-f** (Abbildung 30, Bahn K). Es besitzt auf Grund der unterschiedlichen Expressionsvektoren als Verbindung zwischen den beiden Fusionspartnern eine andere Aminosäuresequenz als das in den Hek293-Zellen exprimierte Fusionsprotein, wodurch die beiden Fusionsproteine unterschiedliche tertiäre Strukturen aufweisen könnten. Daher wurde zunächst überprüft, ob das in den Hek293-Zellen exprimierte Fusionsprotein korrekt gefaltet vorliegt und an den Liganden binden kann. Hierzu wurden *Pulldown*-Experimente mit Streptavidin (STV-)modifizierten magnetischen Polymerkügelchen durchgeführt (Abschnitt 5.7.7).^{198,199} An diese sollte der Ligand über eine Biotinmodifizierung gebunden werden, um anschließend das Zielprotein aus den Hek293-Zelllysaten zu isolieren. Dabei sollte auch evaluiert werden, ob das

optimierte Protein-Ligand-Paar **P(C638)+CI-9L** trotz der geringen Zielproteinkonzentration und den damit verbundenen Nebenreaktionen in humanen Zellen selektiv angesprochen werden kann. Aus diesem Grund wurden neben dem reaktiven, affinen Liganden **CI-9L-b** auch die Liganden **H-9L-b** und **CI-9iL-b** synthetisiert (Abbildung 31).



Peptidname	Sequenz	Ausbeute
H-9L-b	I L P S D I B D F V L K N T P S W	2,2 μ mol (22%)
CI-9L-b	I L P S D I B D F V L K N T P S W	2,7 μ mol (27%)
CI-9iL-b	S P T N K L V F D B I D S P L I W	1,1 μ mol (11%)

Abbildung 31: Festphasenpeptidsynthese (SPPS) zur Herstellung verschiedener Biotin-modifizierter Liganden. Nach Synthese der peptidischen Kernsequenz wurden folgende Reaktionen durchgeführt: (i) Abspaltung der Mmt-Schutzgruppe des C-terminalen Lysins; (ii) Modifizierung des C-terminalen Lysins mit PEG4(Mmt); (iii) Abspaltung der Mmt-Schutzgruppe; (iv) Modifizierung des ersten PEG4 mit einem weiteren PEG4(Mmt); (v) Abspaltung der Mmt-Schutzgruppe, (vi) Biotinylierung des zweiten PEG4; (vii) Abspaltung der N-terminalen Fmoc-Gruppe; (viii) Modifizierung des N-Terminus mit PEG2(Fmoc); (ix) Abspaltung der N-terminalen Fmoc-Gruppe; (x) Kupplung von α -Chloressigsäure an den N-Terminus, um die reaktive Gruppe zu installieren oder Acetylierung des N-Terminus; (xi) Vollabspaltung vom Harz.

Zur Etablierung des *Pulldowns* wurde zunächst mit den aufgereinigten Proteinen **P(WT)** und **P(C638)** gearbeitet (Abschnitt 5.7.7.1). Da in Zellen und somit in Zelllysaten Biotin vorliegt,^{200,201} wurden zuerst die biotinylierten Liganden auf dem Trägermaterial immobilisiert und anschließend die Proteine zugegeben, um im später angestrebten *Pulldown* aus Hek293-Zelllysaten eine Konkurrenz zwischen den biotinylierten Liganden und freiem Biotin aus dem Lysat um das immobilisierte Streptavidin zu verringern.

Bei den *Pulldowns* mit den aufgereinigten Zielproteinen **P(C638)** und **P(WT)** zeigte sich, dass unter allen vom Hersteller angegebenen Elutionsbedingungen (Tabelle 1) neben den Zielproteinen auch STV vom Trägermaterial eluierte. Da die Untereinheit von STV (14 kDa)²⁰² ein ähnliches Molekulargewicht wie das Protein-Ligand-Konjugat **P(C638)-9L-b** (13,5 kDa) aufweist, liefen diese auf den zur Analyse des *Pulldowns* verwendeten denaturierenden SDS-Polyacrylamidgelen auf nahezu derselben Höhe, sodass eine Auswertung der *Pulldowns* nicht möglich war.

Tabelle 1: Vom Hersteller empfohlene Elutionsbedingungen für die STV-modifizierte Polymerkügelchen. Für jede Bedingung sind die zur Elution verwendete Lösung, die Inkubationszeit und -temperatur angegeben.

Bedingung	Lösung	Zeit / Min.	Temperatur / °C
1	PD-Elutionspuffer 2	5	65
2	PD-Elutionspuffer 2	2	95
3	PD-Elutionspuffer 3	5	95
4	ddH ₂ O	1	95
5	1x SDS-Probenpuffer	5	95
6	1x SDS-Probenpuffer	15	95

Veränderungen des Acrylamidanteils im SDS-Polyacrylamidgel und ein Wechsel auf STV-modifiziertes Trägermaterial eines anderen Herstellers brachten keine Verbesserung, sodass diverse Elutionsmethoden untersucht wurden, um solche zu identifizieren, unter denen nur die STV-Biotin-Bindung bricht und nicht die Bindung des STV an das Trägermaterial. Dazu wurde mit **P(C638)-9L-b** modifiziertes STV-Trägermaterial verschiedenen Elutionsbedingungen unterzogen (Tabelle 2). Nach Auftrennung aller Proben mittels SDS-PAGE zeigten nur die Elutionsbedingungen 3 und 6, bei welchen das Trägermaterial mit einer salzfreien gesättigten Biotinlösung bei 100°C inkubiert wurde,²⁰³ keine STV-Bande. Da die Elutionseffizienz bei Bedingung 6 auf Grund der längeren Inkubationszeit höher war, wurde diese für die folgenden *Pulldown*-Experimente verwendet.

Tabelle 2: Elutionsbedingungen für die Elution des Protein-Ligand-Konjugates **P(C638)-9L-b** von Streptavidin-modifiziertem Trägermaterial. Für jede Bedingung sind die verwendete Lösung, die Inkubationszeit und -temperatur angegeben. ^{a)}Proben, die nur eine Elution des **P-L**-Konjugates zeigten.

Bedingung	Lösung.	Zeit / Min.	Temperatur / °C
1	PD-Elutionspuffer 4	1	25
2	PD-Elutionspuffer 4	1	50
3 ^{a)}	PD-Elutionspuffer 4	1	100
4	PD-Elutionspuffer 4	5	25
5	PD-Elutionspuffer 4	5	50
6 ^{a)}	PD-Elutionspuffer 4	5	100
7	PD-Elutionspuffer 5	1	25
8	PD-Elutionspuffer 5	1	50
9	PD-Elutionspuffer 5	1	100
10	PD-Elutionspuffer 5	5	25
11	PD-Elutionspuffer 5	5	50
12	PD-Elutionspuffer 5	5	100
13	PD-Elutionspuffer 6	1	25
14	PD-Elutionspuffer 6	1	50
15	PD-Elutionspuffer 6	1	100
16	PD-Elutionspuffer 6	5	25
17	PD-Elutionspuffer 6	5	50
18	PD-Elutionspuffer 6	5	100

Probe	Lösung.	Zeit / Min.	Temperatur / °C
19	PD-Elutionspuffer 7	5	25
20	PD-Elutionspuffer 8	5	25
21	PD-Elutionspuffer 9	5	25
22	PD-Elutionspuffer 10	5	25
23	PD-Elutionspuffer 11	5	25
24	PD-Elutionspuffer 12	5	25

Beim Pulldown der aufgereinigten Zielproteine **P(C638)** und **P(WT)** zeigte sich, dass die rein affinitätsvermittelte Bindung des Liganden **H-9L-b** selbst unter den verwendeten milden Waschbedingungen (500 mM NaCl, 50 mM HEPES, pH 7.4, 0,01% Tween, RT) nicht ausreicht, um das Protein **P(C638)** am Trägermaterial zu immobilisieren (Abbildung 32). Analog wird das Protein **P(WT)** nicht durch den reaktiven Liganden **CI-9L-b** immobilisiert, da auch dieses Protein-Ligand-Paar keine kovalente Bindung ausbilden kann. Im Gegensatz dazu lässt sich das reaktive Protein **P(C638)** mit dem affinen und reaktiven Liganden **CI-9L-b** an das Trägermaterial binden. Wie die Kontrolle mit dem reaktiven, aber nicht-affinen Liganden **CI-9iL-b** in Kombination mit dem reaktiven Protein **P(C638)** zeigt, ist diese Immobilisierung nicht auf die Anwesenheit der beiden reaktiven Gruppen allein zurückzuführen, da auch in dieser Probe kein Protein immobilisiert werden konnte. Für einen effizienten *Pulldown* ist somit die nachbarschaftsinduzierte Ausbildung der kovalenten Bindung essentiell.

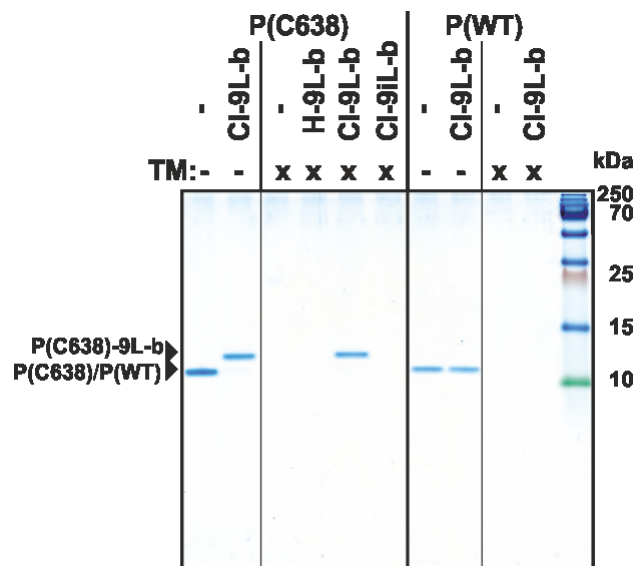


Abbildung 32: Coomassie gefärbtes 17%-iges SDS-Polyacrylamidgel des *Pulldowns* der aufgereinigten Proteine **P(C638)** und **P(WT)** mit den Liganden **H-9L-b**, **CI-9L-b** und **CI-9iL-b**.

Nach der Etablierung der *Pulldown*-Experimente mit den aufgereinigten Proteinen **P(WT)** und **P(C638)** wurden analoge Experimente mit Lysaten von Hek293-Zelllinien, welche die

Fusionsproteine **mCherry-P(WT)-**, **mCherry-P(C638)-**, **P(WT)-mCherry-** und **P(C638)-mCherry** exprimierten, durchgeführt. Dazu wurden Aliquots der Lysate genutzt, die bereits für die Markierungsexperimente in Hek293-Zelllysaten verwendet worden waren. Auch in diesem *Pulldown* ermöglicht nur der affine und reaktive Ligand **CI-9L-b** eine gut detektierbare Immobilisierung der Fusionsproteine **P(C638)-mCherry** bzw. **mCherry-P(C638)** (Abbildung 33 oben). Da unter identischen Bedingungen eine größere Menge des **P(C638)-mCherry**-Fusionsproteins aus dem Lysat isoliert werden kann als beim **mCherry-P(C638)**-Fusionsprotein, wurde ersteres für alle weiteren Experimente genutzt.

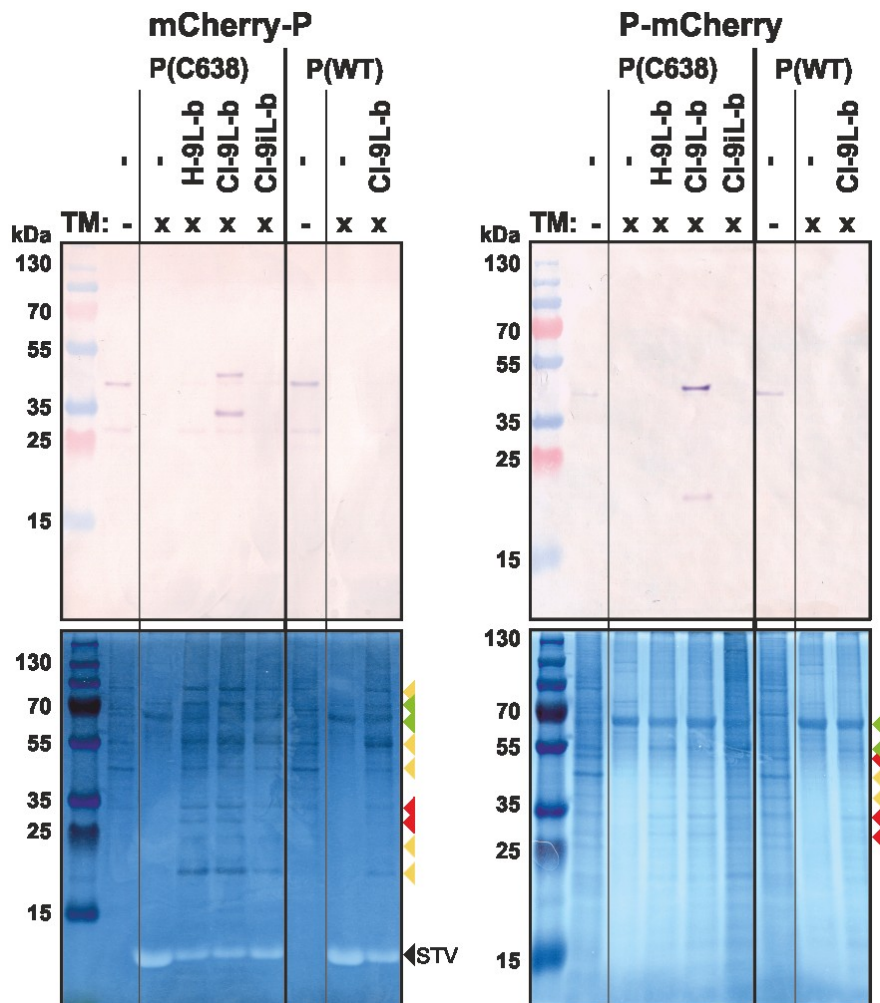
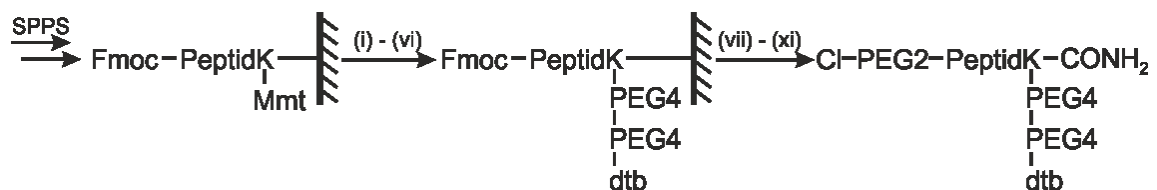


Abbildung 33: Western Blot (oben) und Zink-Imidazol-Färbung (unten) des Pulldowns aus Hek293-Zelllysaten, in denen **mCherry-P(C638)-**, **mCherry-P(WT)-**, **P(C638)-mCherry-** oder **P(WT)-mCherry**-Fusionsproteine exprimiert worden waren, mit den Liganden **H-9L-b**, **CI-9L-b** und **CI-9iL-b**. STV: Streptavidin; TM: STV-beschichtetes Trägermaterial; grüne Pfeilspitze: unspezifische Bindung ans TM; gelbe Pfeilspitze: unspezifische Bindung an peptidmodifiziertes TM; rote Pfeilspitze: Bindung an mit nativer Ligandsequenz modifiziertes TM bevorzugt.

Aus der zur Ladekontrolle verwendeten Zink-Imidazol-Färbung der Gele unmittelbar vor dem Western Blot (Abschnitt 5.3.5.5) wird deutlich, dass im *Pulldown*-Experiment nicht ausschließlich das Zielprotein immobilisiert wurde (Abbildung 33 unten). So fanden sich Proteine, die unspezifisch an das Trägermaterial banden (grüne Pfeilspitzen), Proteine, welche unspezifisch bei allen mit Peptiden modifizierten Trägermaterialien auftraten (gelbe Pfeilspitzen), und Proteine, welche bevorzugt an mit nativem Liganden (**CI-9L-b** und **H-9L-b**) modifiziertes Trägermaterial (rote Pfeilspitzen) banden. Einige dieser Proteine könnten zelluläre Interaktionspartner der als Ligand verwendeten TAD aus MLL sein. Es könnten jedoch auch Interaktionspartner der als Zielprotein verwendeten KIX-Domäne, welche in die c-Myb-Bindestelle binden und somit nicht mit dem Liganden konkurrieren, co-immobilisiert werden.²⁰⁴

Da die im Pulldown verwendeten Waschbedingungen sehr mild waren und auch der verwendete PD-Elutionspuffer Proteine in ihrer nativen Faltung eluieren kann,²⁰⁵ wurde als Analyse des *Pulldowns* aus den Hek293-Zelllysaten eine native PAGE mit Fluoreszenzdetektion der mCherry-Fusionsproteine etabliert. Um die Elution bei RT zu ermöglichen, wurden Liganden mit Desthiobiotinmodifizierung synthetisiert (Abbildung 34). Desthiobiotin (dtb) bindet ebenso wie Biotin an Streptavidin, hat jedoch eine geringere Affinität, sodass es unter milderer Bedingungen freigesetzt werden kann.^{205–207}



Peptidname	Sequenz	Ausbeute
H-9L-dtb	I L P S D I B D F V L K N T P S W	1,7 μ mol (17%)
CI-9L-dtb	I L P S D I B D F V L K N T P S W	1,3 μ mol (13%)
CI-9iL-dtb	S P T N K L V F D B I D S P L I W	1,6 μ mol (16%)

Abbildung 34: Festphasenpeptidsynthese (SPPS) zur Herstellung verschiedener mit Desthiobiotin modifizierter Liganden. Nach Synthese der peptidischen Kernsequenz wurden folgende Reaktionen durchgeführt: (i) Abspaltung der Mmt-Schutzgruppe des C-terminalen Lysins; (ii) Modifizierung des C-terminalen Lysins mit PEG4(Mmt); (iii) Abspaltung der Mmt-Schutzgruppe; (iv) Modifizierung des ersten PEG4 mit einem weiteren PEG4(Mmt); (v) Abspaltung der Mmt-Schutzgruppe, (vi) Desthiobiotinylierung des zweiten PEG4; (vii) Abspaltung der N-terminalen Fmoc-Gruppe; (viii) Modifizierung des N-Terminus mit PEG2(Fmoc); (ix) Abspaltung der N-terminalen Fmoc-Gruppe; (x) Kupplung von α -Chloressigsäure an den N-Terminus, um die reaktive Gruppe zu installieren oder Acetylierung des N-Terminus; (xi) Vollabspaltung vom Harz.

Die mit Desthiobiotin modifizierten Liganden ermöglichten einen nativen *Pulldown* von **P(C638)-mCherry**-Fusionsproteinen aus Hek293-Zelllysaten (Abbildung 35), in welchem erneut bestätigt wurde, dass nur die Kombination des reaktiven Proteins **P(C638)** mit dem reaktiven, affinen Liganden **Cl-9L-dtb** eine detektierbare Isolation des Zielproteins aus den Hek293-Zelllysaten ermöglicht. Die Detektion mit Hilfe der intrinsichen mCherry-Fluoreszenz des kovalenten **P(C638)-9L-dtb-mCherry**-Konjugates zeigt, dass die in den *Pulldowns* verwendeten Wasch- und Elutionsbedingungen native Proteinfaltungen erhalten. Durch etwas stringenteren Waschschritten ließen sich daher wahrscheinlich unspezifisch isolierte Proteine, wie sie im denaturierenden *Pulldown* aus den Hek293-Zelllysaten detektiert werden konnten (vgl. Abbildung 33 unten), verringern.

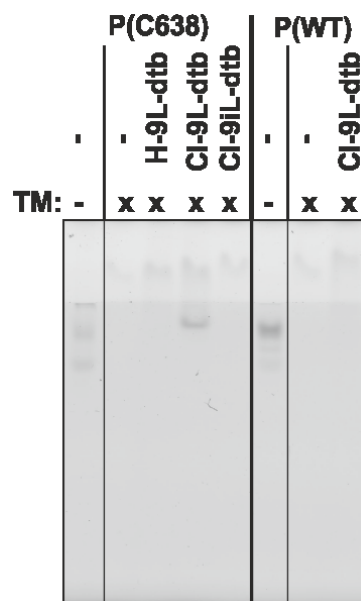


Abbildung 35: Fluoreszenzaufnahme des nativen Polyacrylamidgels des Pulldowns aus Hek293-Zelllysaten, in denen **P(C638)-mCherry**- oder **P(WT)-mCherry**-Fusionsproteine exprimiert worden waren, mit den Liganden **H-9L-dtb**, **Cl-9L-dtb** und **Cl-9iL-dtb**. Das fluoreszierende Protein mCherry wurde bei $\lambda_{ex} = 532$ nm angeregt und seine Emission bei $\lambda_{em} > 580$ nm detektiert. Die Aufnahme wurde mit einer Pixelgröße von 50 μm aufgenommen.

3.5.2 Identifizierung geeigneter Lokalisationssequenzen

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die **P-mCherry**-Fusionsproteine in humanen Zellen funktionsfähig exprimiert werden, wurde eine Translokation des Fusionsproteins **P(C638)-mCherry** angestrebt. Hierzu wurden ein NLS und drei verschiedene potentielle Membrananker ausgewählt, mit *N*-terminaler FITC-Modifizierung synthetisiert (Abbildung 36) und auf ihre Lokalisationsfähigkeit in HeLa-Zellen untersucht. Dazu wurde zum einen die NLS aus dem Protein SV40 *large T-Antigen* gewählt.²² Da bereits gezeigt wurde, dass diese durch Verbindung mit hydrophoben Peptidsequenzen zu amphipatischen zellpermeablen Peptiden führen kann,²⁰⁸ wurde versucht durch Kombination dieses Lokalisationssignals mit dem hydrophoben Liganden einen zellpermeablen und lokalisierenden Liganden zu erhalten. Zusätzlich wurden drei Membrananker als Lokalisationssignale ausgewählt. Diese leiteten sich aus folgenden Gründen nicht von nativen Erkennungssequenzen zur Anbringung von Membranankern ab:

- 1) Modifizierungen mit endogenen Enzymen waren unerwünscht, da diese für ihre Reaktion an den Liganden binden müssten. Dabei kann nicht ausgeschlossen werden, dass diese Bindung eine nachbarschaftsinduzierte Reaktion mit dem Enzym ermöglichen würde.
- 2) Die *N*-Myristoylierung erfolgt am *N*-Terminus, welcher im Liganden bereits durch die reaktive Gruppe belegt ist.
- 3) Eine künstliche S-Prenylierung im Rahmen der Festphasenpeptidsynthese führt Doppelbindungen in das Peptid ein. Diese sind unter den Bedingungen der hier verwendeten Vollabspaltung u. U. nicht stabil.²⁰⁹ Eine komplexere Synthesestrategie, um dieses Problem zu lösen, sollte vermieden werden.
- 4) Eine S-Palmitoylierung erfolgt über labile Thioester. Diese können innerhalb der Zelle hydrolysieren und somit die Membranaffinität verloren gehen.

Daher wurde eine künstliche Palmitoylierung über ein *C*-terminales Lys(Mmt) vorgenommen. Dabei bildet sich eine Amidbindung aus, welche unter physiologischen Bedingungen stabil ist.³⁴ Da eine einzelne Palmitoylierung i. d. R. keine stabile Membranlokalisierung ermöglicht,²¹⁰ wurden drei verschiedene MA's synthetisiert. Zusätzlich zum MA1, welcher lediglich aus dem palmitoylierten Lysin bestand, enthielt der MA2 vier und der MA3 sechs weitere Lysine, welche ähnlich zum polybasischen Schalter eine dauerhafte Anlagerung an Membranen mit negativgeladenen Lipidkopfguppen ermöglichen sollten.^{47,211}

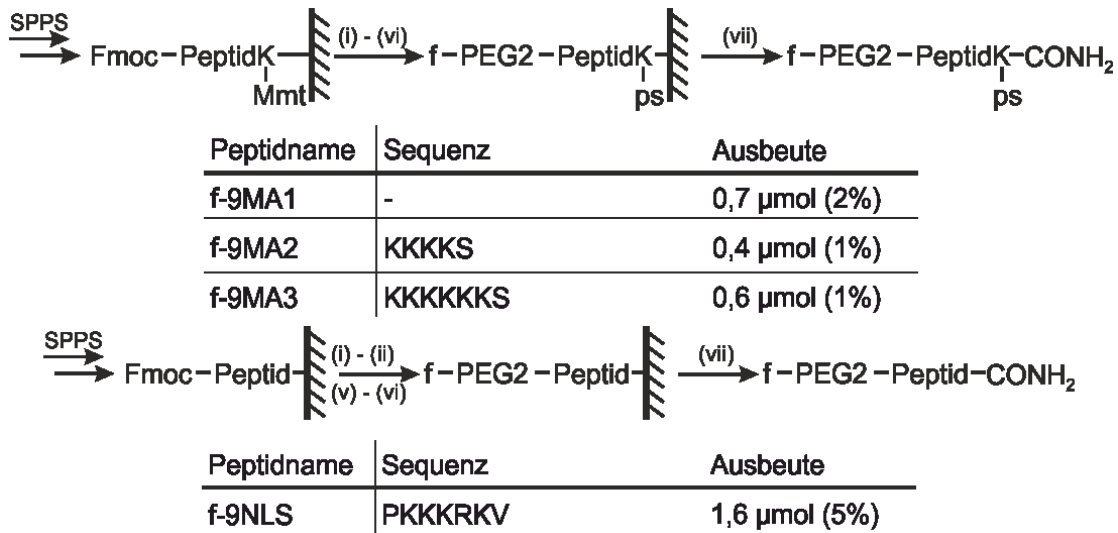


Abbildung 36: Festphasenpeptidsynthese (SPPS) zur Herstellung verschiedener potentieller Lokalisationssignale. Nach Synthese der peptidischen Kernsequenz wurden folgende Reaktionen durchgeführt: (i) Abspaltung der *N*-terminalen Fmoc-Gruppe; (ii) Kupplung von PEG2(Fmoc) an den *N*-Terminus; (iii) Abspalten der Mmt-Gruppe vom *C*-terminalen Lysin; (iv) Modifizierung mit Palmitinsäure (ps); (v) Abspaltung der *N*-terminalen Fmoc-Gruppe; (vi) Modifizierung des *N*-Terminus mit FITC; (vii) Vollabspaltung vom Harz.

Die vier Lokalisationssequenzen wurden zunächst auf ihre Lokalisationsfähigkeit in HeLa-Zellen untersucht, indem sie mikroinjiziert und die Fluoreszenz ihrer FITC-Markierung verfolgt wurde (Abschnitt 5.8.8.2). Es stellte sich heraus, dass der Membrananker f-9MA1 in der gesamten Zelle verteilt war (Abbildung 37). Im Gegensatz dazu zeigten die Membrananker f-9MA2 und f-9MA3 stabile Lokalisationssignale im Bereich der Plasmamembran bzw. des endoplasmatischen Membransystems mit Fokussierung auf die Kernmembran. Auch die Lokalisationssequenz f-9NLS zeigte kurz nach der Injektion^a eine erhöhte Lokalisation innerhalb des Nukleus, welche sich auf Grund der passiven Diffusion des Peptides durch die Kernmembranporen jedoch schnell in der gesamten Zelle ausbreitete.

^a Da die Fluoreszenz der FITC-Markierung im zur Anregung verwendeten Laserlicht schnell gebleicht wurde, konnte sie auf den Bildern eine Stunde nach der Injektion nicht mehr detektiert werden, sodass für die Auswertung dieser Experimente die Aufnahmen fünf Minuten nach der Injektion verwendet wurden.

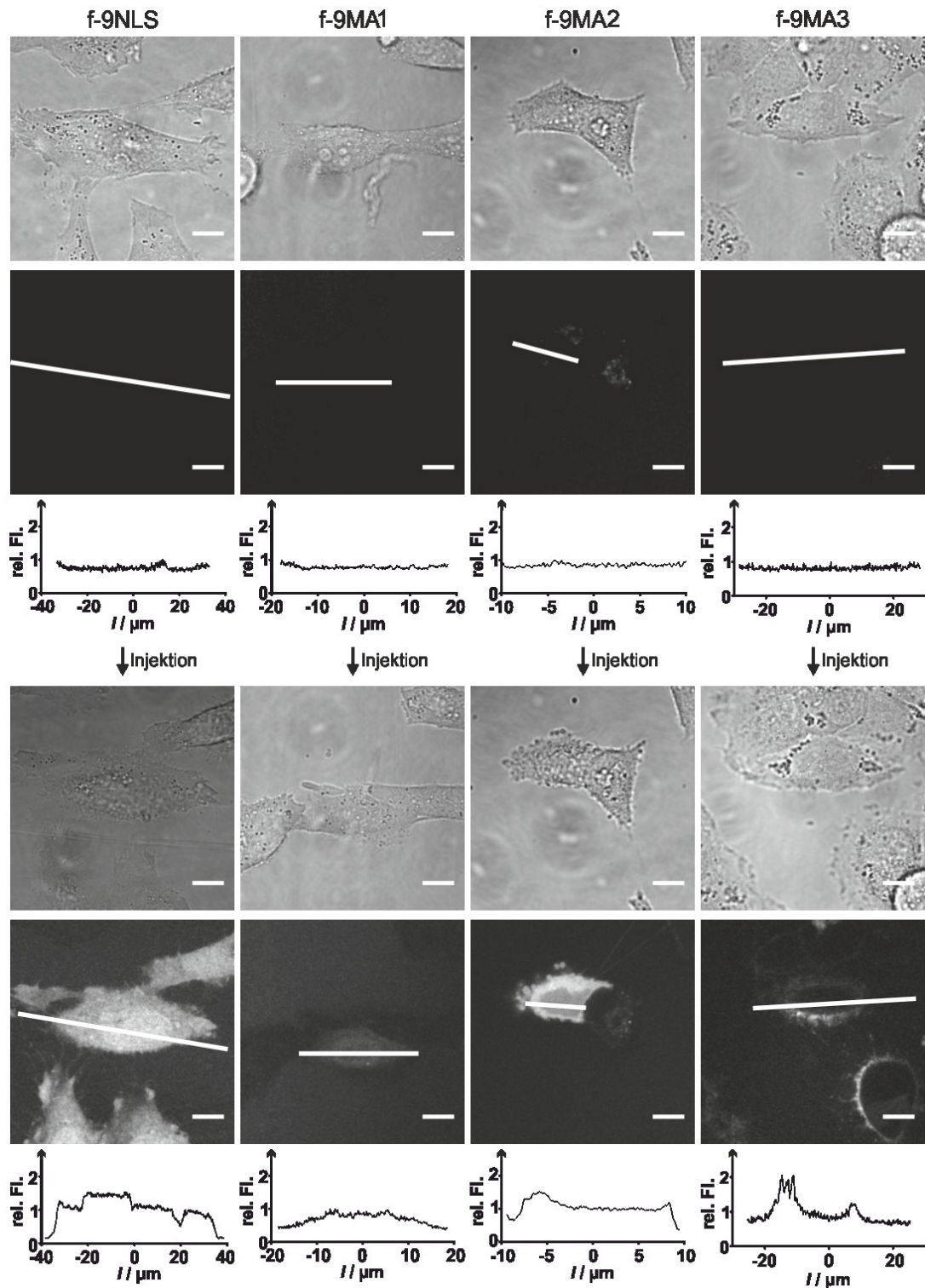


Abbildung 37: Konfokale Mikroskopaufnahmen von HeLa Zellen, die mit den FITC-modifizierten Lokalisationssignalen f-9NLS, f-9MA1, f-9MA2 und f-9MA3 injiziert wurden. Für jedes Signal ist die Fluoreszenzaufnahme der FITC-Markierung ($\lambda_{ex} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 505\text{--}550 \text{ nm}$), der Durchlichtchannel und ein Graph mit der Fluoreszenzintensität entlang der weißen Linie vor (oben) und 5 Minuten nach (unten) der Injektion einer Zelle gezeigt. Weißer Maßstab = $10 \mu\text{m}$.

3.5.3 Zelluläre Translokation von P(C638)-mCherry

3.5.3.1 Analyse der Zellpermeabilität lokalisierender Liganden

Nachdem für die drei Lokalisationssequenzen NLS, MA2 und MA3 eine spezifische Lokalisation in HeLa-Zellen ermittelt worden war, wurden sie C-terminal an die peptidische Sequenz des Liganden angebracht. Da die so modifizierten Liganden eine hohe positive Gesamtladung besitzen (**L-MA2**: +3, **L-MA3**: +5, **L-NLS**: +4), besteht die Chance, dass sie im Vergleich zum unmodifizierten Liganden eine erhöhte Zellpermeabilität besitzen.¹⁷⁹ Daher wurden sie zunächst N-terminal mit FITC modifiziert (Abbildung 38) und auf ihre Zellpermeabilität getestet.

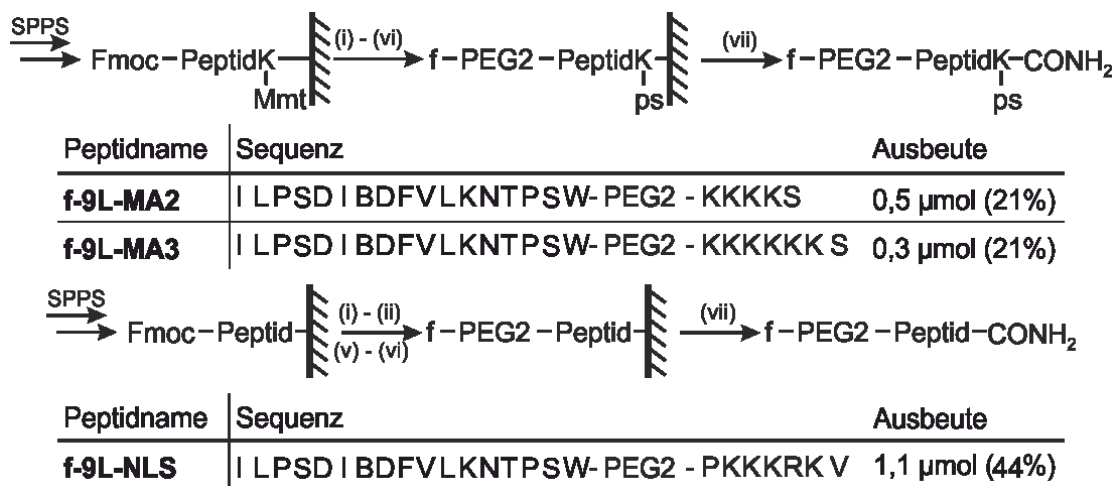


Abbildung 38: Festphasenpeptidsynthese (SPPS) zur Herstellung verschiedener FITC-modifizierter Liganden **f-L**, die C-terminal mit den in HeLa-Zellen lokalisierenden Peptidsequenzen MA2, MA3 und NLS konjugiert wurden. Nach Synthese der peptidischen Kernsequenz wurden folgende Reaktionen durchgeführt: (i) Abspaltung der N-terminalen Fmoc-Gruppe; (ii) Kupplung von PEG2(Fmoc) an den N-Terminus; (iii) Abspalten der Mmt-Gruppe vom C-terminalen Lysin; (iv) Modifizierung mit Palmitinsäure (ps); (v) Abspaltung der N-terminalen Fmoc-Gruppe; (vi) Modifizierung des N-Terminus mit FITC; (vii) Vollabspaltung vom Harz.

Inkubation von HeLa-Zellen mit den Liganden **f-9L-NLS**, **f-9L-MA2** und **f-9L-MA3** zeigte, dass keiner der lokalisierenden Liganden von den Zellen aufgenommen wurde (Abbildung 39). Während der Ligand **f-9L-NLS** durch Waschschrte wieder entfernt werden kann, binden die Liganden **f-9L-MA2** und **f-9L-MA3** unspezifisch an die Oberfläche der Zellkulturmikrotiterplatte, was sich an der unregelmäßigen Verteilung der FITC-Fluoreszenz unabhängig von der DAPI-Fluoreszenz erkennen lässt. Im Gegensatz dazu zeigt das für seine gute Zellpermeabilität bekannte Peptid **f-9R₈**,¹⁷² eine deutliche ovale FITC-Fluoreszenz rund

um die mit DAPI gefärbten Zellkerne, welche dem Cytoplasma der Zellen entspricht. Die unspezifische Bindung war für **f-9L-MA3** ausgeprägter als für **f-9L-MA2**, sodass sie wahrscheinlich auf die Kombination der Palmitinsäure mit der Polylysinsequenz dieser Liganden zurückgeführt werden kann und durch die beiden zusätzlichen Lysine der **MA3**-Sequenz verstärkt wird.

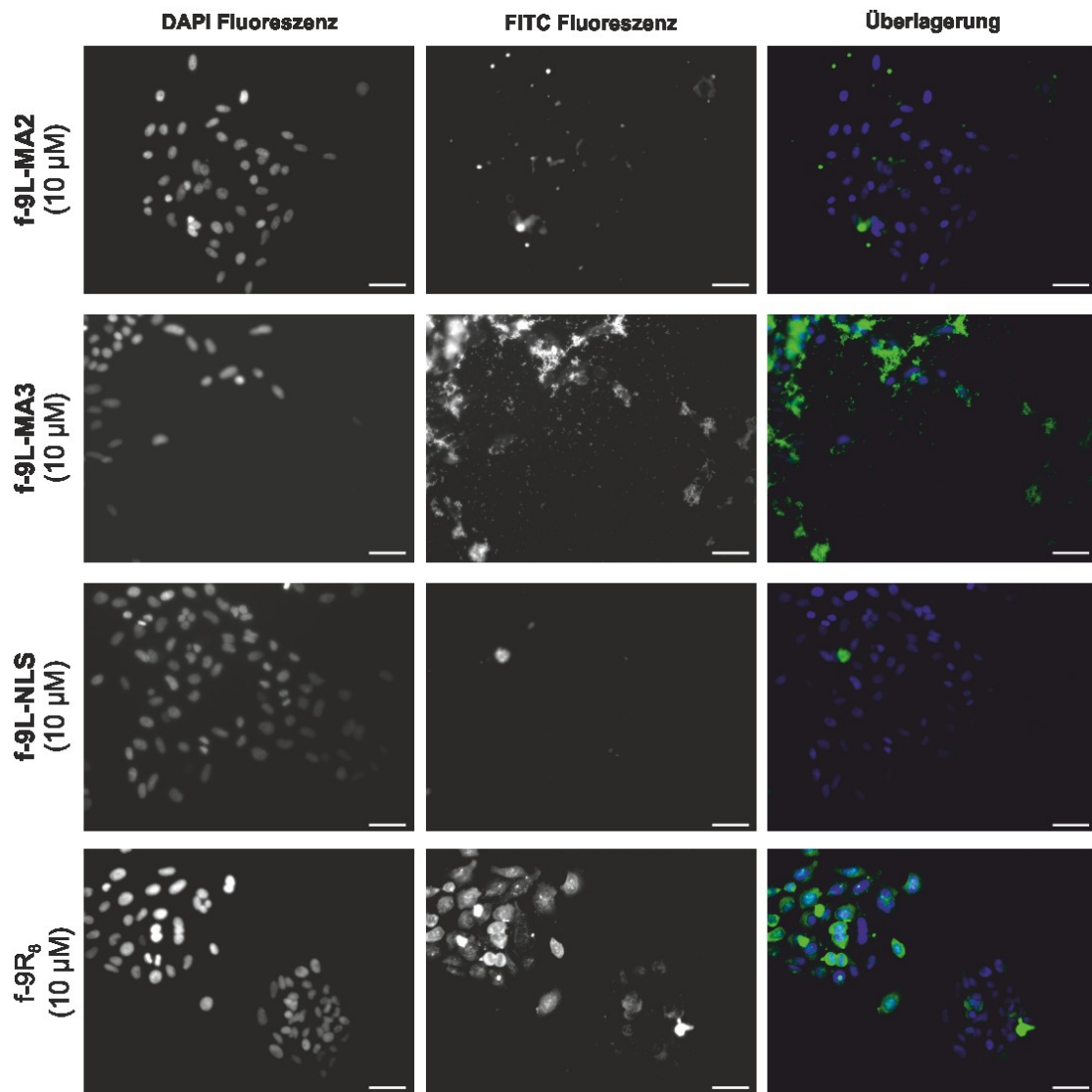


Abbildung 39: Representative Fluoreszenzaufnahmen von HeLa-Zellen zur Untersuchung der Zellpermeabilität der FITC-modifizierten Liganden mit lokalisierenden Peptidsequenzen **f-9L-MA2**, **f-9L-MA3** und **f-9L-NLS**. Gezeigt sind die DAPI-Fluoreszenz (Filter_{ex} = G365, Strahlteiler = FT395, Filter_{em} = BP445/50), die FITC-Fluoreszenz (Filter_{ex} = BP450/50, Strahlteiler = FT480, Filter_{em} = BP510/50) sowie eine Überlagerung der beiden Bilder (DAPI = blau, FITC = grün). Der Maßstab (weiß) entspricht 50 µm.

3.5.3.2 Zelluläre Translokation von P(C638)-mCherry

Um das Fusionsprotein **P(C638)-mCherry** in humanen Zellen zu translokalisieren wurde der Ligand erneut *C*-terminal mit den Lokalisationsignalen MA2, MA3 und NLS sowie *N*-terminal mit der reaktiven α -Chloracetamidgruppe versehen (Abbildung 40). Zur Untersuchung des Effektes der α -Chloracetamidgruppe ohne nachbarschaftsinduzierte Reaktion wurde der inverse Ligand analog modifiziert.

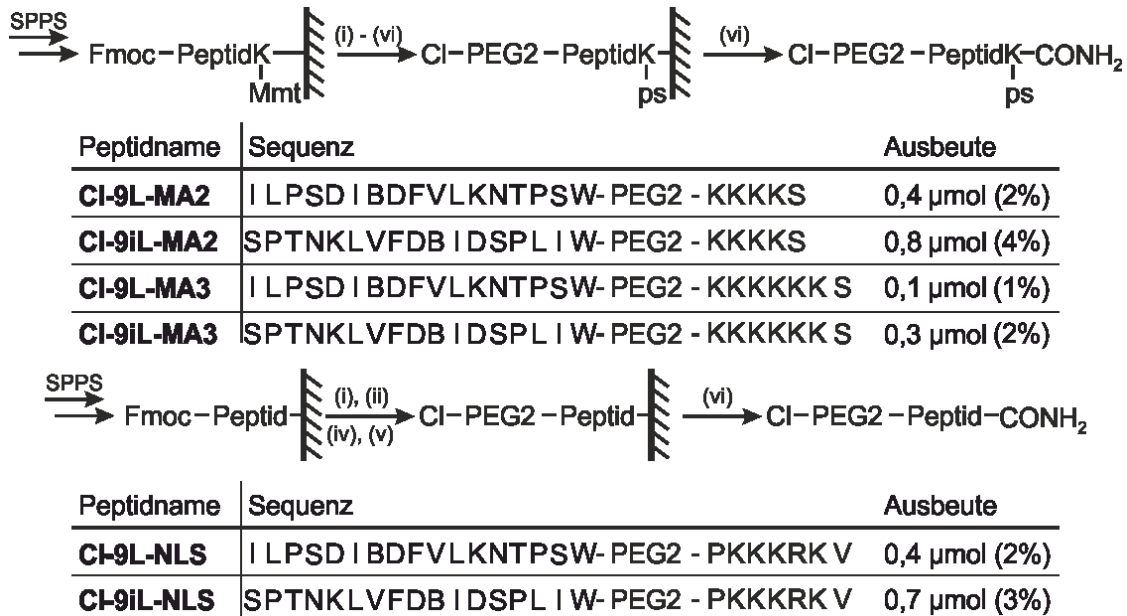


Abbildung 40: Festphasenpeptidsynthese (SPPS) zur Herstellung verschiedener reaktiver Liganden, die *C*-terminal mit den in HeLa-Zellen lokalisierenden Peptidsequenzen MA2, MA3 und NLS konjugiert wurden. Nach Synthese der peptidischen Kernsequenz wurden folgende Reaktionen durchgeführt: (i) Abspaltung der *N*-terminalen Fmoc-Gruppe; (ii) Kupplung von PEG2(Fmoc) an den *N*-Terminus; (iii) Abspalten der Mmt-Gruppe vom *C*-terminalen Lysin; (iv) Modifizierung mit Palmitinsäure (ps); (v) Abspaltung der *N*-terminalen Fmoc-Gruppe; (vi) Modifizierung des *N*-Terminus mit α -Chloressigsäure; (vi) Vollabspaltung vom Harz.

Anschließend wurden die Liganden in HeLa-Zellen injiziert, welche transient die Fusionsproteine **P(C638)-mCherry** oder **P(WT)-mCherry** exprimierten. Dabei wurde bei jeder Lokalisationssequenz die Kombination **P(C638)-mCherry** mit dem Liganden **CI-9iL** verwendet, um nachzuweisen, dass nur ein affiner Ligand die Translokation hervorrufen kann. Als Kontrolle für die Notwendigkeit der kovalenten Bindung zwischen dem Fusionsprotein und dem Liganden diente die Kombination aus **P(WT)-mCherry** mit **CI-9L-f**. Als Hintergrundkontrolle wurde der reine Injektionspuffer verwendet.

Da die zur Translokation verwendeten Liganden kein fluoreszierendes Label enthielten, mit welchem ihre Injektion überprüft werden konnte, wurde den Ligandlösungen jeweils ein

Injektionsmarker zugegeben. Hierzu wurde zunächst Fluorescein-modifiziertes Dextran verwendet, wobei jedoch die Injektionsnadel nach wenigen Sekunden verstopfte und die Injektion unmöglich wurde. Da vermutet wurde, dass die reaktive Gruppe der Liganden mit den Hydroxyl-Gruppen des Dextrans reagieren könnte, wurden weitere Injektionsmarker unter diversen Pufferbedingungen untersucht. Hierzu zählten zum einen aufgereinigtes GFP, Fluorescein und Fluoresceinisothiocyanat in PBS-Puffern mit variierenden Anteilen an DMSO (bis zu 100%). Mit allen Bedingungen trat die Propfenbildung an der Spitze der Injektionsnadel auf, jedoch war dieser Effekt unterschiedlich stark. Am besten funktionierte die Injektion der Peptide mit einer Fluorescein-enthaltenen DMSO-Lösung (ohne Zugabe eines wässrigen Puffers), weshalb dieser Injektionsmarker in allen folgenden Mikroinjektionsexperimenten verwendet wurde.

Für die mit der NLS-modifizierten Liganden konnten einige Zellen identifiziert werden, welche nach der Injektion eine erhöhte Fluoreszenzintensität des mCherrys im Zellkern aufwiesen (Abbildung A112). Dieser Effekt trat bei etwa 6% der mit **mCherry-P(C638)** transfizierten und mit **CI-9L-NLS** injizierten Zellen auf. Im Vergleich zeigte er sich bei den Protein-Ligand-Kontrollpaaren etwas seltener (5% für **P(C638)** mit **CI-9iL-f** bzw. 4% für **P(WT)** mit **CI-9L-f**). Die Pufferkontrolle zeigte mit 3% eine ähnliche Anzahl translokalisierender Zellen, was dafür spricht, dass die Translokalisierung mit diesem Lokalisationssignal nicht sehr effizient erfolgt. Das Konjugat aus **mCherry-P** und den Liganden liegt mit einem Molekulargewicht von etwa 41,6 kDa im Größenbereich von Molekülen, die passiv durch die Kernporen diffundieren können.^{19,21} Es ist möglich, dass dieser Effekt der Lokalisation durch das enthaltene NLS entgegenwirkt. Auch könnte die Bindung der NLS an das für den Kernimport notwendige Importin durch sterische Abschirmung behindert werden, sodass keine effiziente Translokalisierung stattfinden kann.

Tabelle 3: Prozentuale Anteile der HeLa-Zellen mit verstärkter Lokalisation in der Kern- oder Plasmamembran sowie dem Nukleus, wie sie für die unterschiedlichen Protein-Ligand-Paare der Mikroinjektionsexperimente zur Translokalisierung des Zielproteins in den Zellkern erhalten wurde.

Protein-variante	Injiziertes Peptid	Prozentualer Anteil an Zellen mit verstärkter Lokalisation in		
		Kernmembran	Plasmamembran	Nukleus
P(C638)	CI-9L-NLS	-	-	6
P(C638)	CI-9iL-NLS	-	-	5
P(WT)	CI-9L-NLS	-	-	4
P(C638)	-	8	2	3

Bei der Injektion des Liganden **CI-9L-MA2** in **P(C638)-mCherry** transfizierte Zellen konnte keine Translokation beobachtet werden. Eine genaue Ursache konnte hierfür nicht identifiziert werden. Bei der Injektion der Liganden mit der MA3-Lokalisationssequenz zeigten einige mit **P(C638)-mCherry** transfizierte Zellen eine rundliche Lokalisation der mCherry-Fluoreszenz (Tabelle 4), welche mit dem Endomembransystem um den Zellkern in den Durchlichtaufnahmen korrelierte (Abbildung 41). Durch Erstellung eines Intensitätsprofils entlang einer Zellachse (Abschnitt 5.8.8.4) lässt sich die Zunahme der Fluoreszenz an zwei definierten Schnittstellen mit der Kernmembran der Zelle noch deutlicher erkennen.

Tabelle 4: Prozentuale Anteile der HeLa-Zellen mit verstärkter Lokalisation in der Kern- oder Plasmamembran sowie dem Nukleus, wie sie für die unterschiedlichen Protein-Ligand-Paare der Mikroinjektionsexperimente zur Translokation des Zielproteins in die Kernmembran erhalten wurde.

Protein-variante	Injiziertes Peptid	Prozentualer Anteil an Zellen mit verstärkter Lokalisation in		
		Kernmembran	Plasmamembran	Nukleus
P(C638)	CI-9L-MA3	37	-	-
P(C638)	CI-9iL-MA3	25	-	-
P(WT)	CI-9L-MA3	11	-	-
P(C638)	-	17	2	3

Insgesamt zeigten 32% der **P(C638)-mCherry** exprimierenden und mit **CI-9L-MA3** injizierten Zellen eine kreisförmige Translokation in die endosomale Membran. Im Vergleich lag die Zahl der Zellen, die durch **CI-9iL-MA3** das Fusionsprotein **P(C638)-mCherry** translokalisierten nur bei 25%. Daraus lässt sich schließen, dass die Translokation mit dem affinen und reaktiven Liganden im Vergleich zum nicht-affinen, reaktiven Liganden deutlich verbessert ist. Der Anteil der **P(WT)-mCherry** exprimierenden und mit **CI-9L-MA3** injizierten Zellen, welche eine Translokation der mCherry-Fluoreszenz zeigten, betrug nur 11% und lag sogar unterhalb der Menge an Zellen, welche als Kontrollgruppe mit dem reinen Puffer injiziert wurden und eine Translokation zeigten (17%). Somit scheint für die Translokation die Ausbildung der kovalenten Bindung zwischen der Proteinvariante **P(C638)** und den Liganden **CI-9L-MA3** und **CI-9iL-MA3** wichtiger zu sein als die rein affinitätsvermittelte Bindung des Proteins **P(WT)** mit dem Liganden **CI-9L-MA3**.

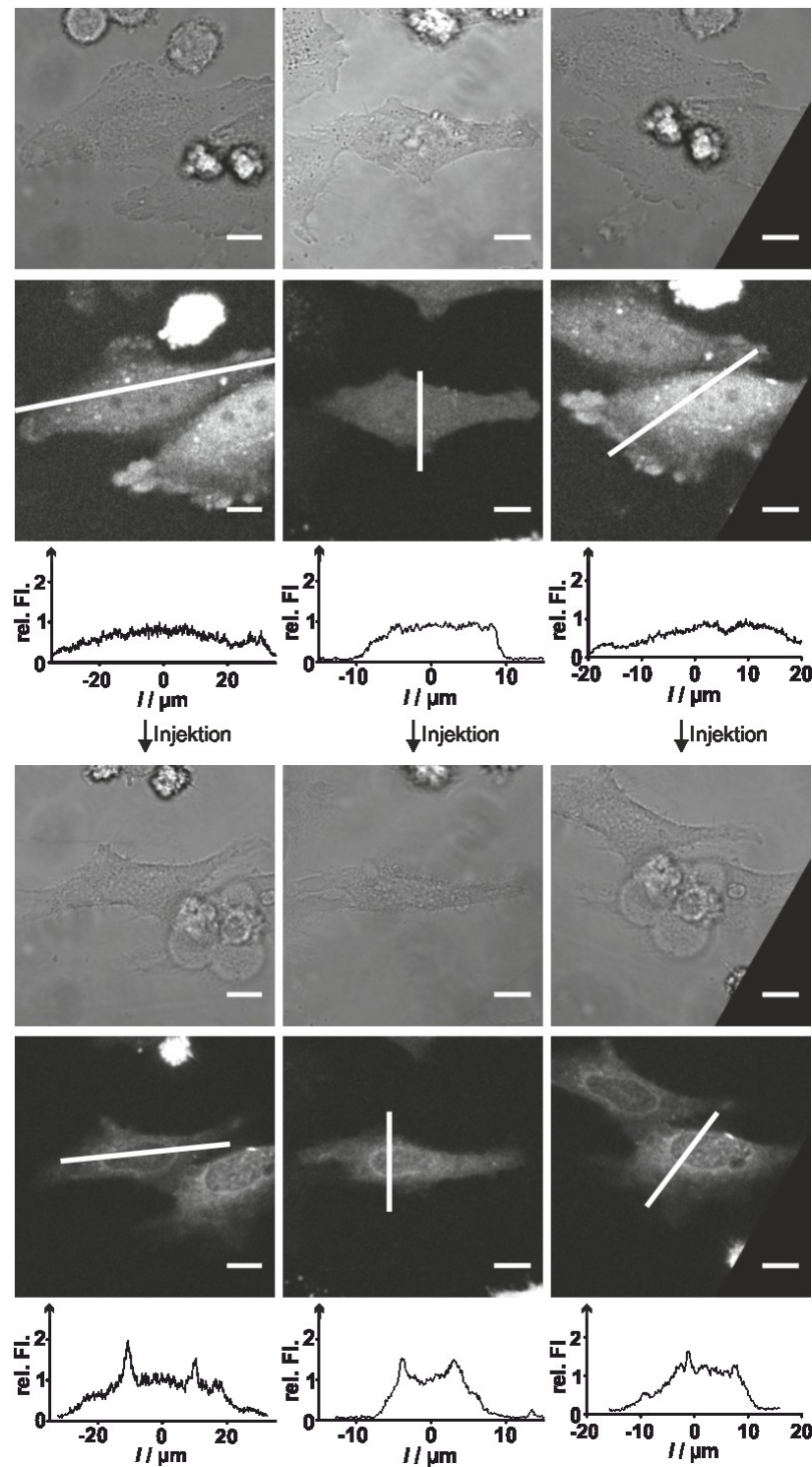


Abbildung 41: Konfokale Mikroskopaufnahmen von transient **P(C638)-mCherry** exprimierenden HeLa-Zellen, die mit dem Liganden **CI-9L-MA3** injiziert wurden. Für jede Zelle ist die konfokale und die Fluoreszenzaufnahme des mCherry-Proteins ($\lambda_{ex} = 561 \text{ nm}$, $\lambda_{em} > 575 \text{ nm}$) sowie ein Graph mit dem Intensitätsprofil der Fluoreszenz entlang der weißen Linie vor (oben) und 60 Minuten nach (unten) der Injektion gezeigt. Maßstab = 10 μm .

3.6 Diskussion

Die zelluläre Proteinlokalisierung spielt eine bedeutende Rolle in der Regulation der Zellfunktion. Zur Steuerung des Aufenthaltsortes eines Proteins in der Zelle werden in der Natur u. a. peptidische Lokalisationssignale verwendet.¹ Um die Translokalisierung von Proteinen künstlich zu steuern werden hauptsächlich genetisch codierte Systeme verwendet, wobei ein besonderer Fokus auf Dimerisierungssystemen liegt.² Um die genetische Manipulation des zu untersuchenden Proteins zu vermeiden, werden im Rahmen der Chemischen Biologie Möglichkeiten zur kovalenten Modifikation endogener Proteine untersucht.³ Ein besonders vielversprechendes Konzept stellen nachbarschaftsinduzierte Reaktionen dar, wie sie in dieser Arbeit verwendet wurden. Bei dieser Methode bringt ein Ligand des Zielproteins eine reaktive Gruppe in räumliche Nähe zu proteinogenen Aminosäureseitenketten und modifiziert diese kovalent.⁴ Dabei kann durch die neu entstehende kovalente Bindung entweder wie in dieser Arbeit gezeigt in einer Verknüpfung der vollständige Ligand an das Zielprotein gebunden werden oder in einer Transferreaktion nur die gewünschte Modifikation auf das Zielprotein übertragen werden.

Die Entwicklung neuer nachbarschaftsinduzierter Reaktionssysteme scheitert häufig an der fehlenden Verfügbarkeit von geeigneten Liganden für das Zielprotein. Bisher publizierte nachbarschaftsvermittelte Reaktionen, welche *in cellulo* oder *in vivo* angewendet wurden, basieren auf niedermolekularen oder sehr kurzen peptidischen Liganden, die in definierte Bindetaschen des jeweiligen Zielproteins binden.^{4,109} Hierdurch wurden Enzyme und Membranrezeptoren in bzw. auf der Oberfläche von Zellen modifiziert. Im Rahmen dieser Arbeit wurde zum ersten Mal ein Protein ohne definierte Bindetasche mit Hilfe einer nachbarschaftsinduzierten Reaktion modifiziert. Dazu wurde ein Modellsystem etabliert, welches auf Protein-Protein-Interaktionen beruht und einen peptidischen Liganden verwendet, welcher mit einer langgestreckten Grube auf der Oberfläche des Proteins interagiert. Durch die gute Oberflächenerkennung von Peptiden und Hochdurchsatzverfahren wie das Phage-Display sollte die Entwicklung weiterer Liganden für bisher nicht adressierbare Proteine erleichtert werden,^{134,135,212,213} sodass nachbarschaftsinduzierte Reaktionen für weitere Proteine entwickelt werden können.

Wie bei vielen Methoden zur Proteinmodifizierung wird auch bei den nachbarschaftsinduzierten Reaktionen die Adaption neuer Systeme für die Anwendung *in cellulo* oder

in vivo durch das komplexe Reaktionsmedium erschwert. So muss z. B. die Reaktivität des Liganden an das jeweilige System angepasst werden,^{7,9,112–120,214} da sowohl die Reaktivität der elektrophilen Gruppe am Liganden als auch die Reaktivität der nukleophilen Aminosäureseitenketten im Zielprotein durch die jeweilige Mikroumgebung beeinflusst werden können.^{8,10,111,112,129,184,185} Durch die Unterrepräsentation von peptidischen Liganden sind bisher nur wenige der potentiellen reaktiven Gruppen für nachbarschaftsinduzierte Reaktionen auf ihre Kompatibilität mit der Festphasenpeptidsynthese untersucht worden.^{6,12,115,120,215–217} So sind bisher nur reaktive Gruppen, die sich für Verknüpfungsreaktionen eignen, mit Hilfe einer Fmoc-basierten Festphasenpeptidsynthese in peptidische Liganden eingebracht worden.^{115,120,215–217} Transferreaktionen sind jedoch bevorzugt, da bei einer Transferreaktion der Ligand nach Übertragung der gewünschten Modifikation nicht irreversibel gebunden ist, sodass prinzipiell eine Beeinflussung der Proteinfunktion minimiert wird.^{4,18,109} Im Rahmen dieser Arbeit wurden bereits erste Versuche unternommen, um das entwickelte Modellsystem in eine nachbarschaftsinduzierte Reaktion nach dem Transfermechanismus unter Nutzung reaktiver Tosylat- oder Acylimidazolgruppen umzuwandeln, welche bisher jedoch aufgrund synthetischer Herausforderungen nicht erfolgreich waren. Die bisher publizierten nachbarschaftsinduzierten Transferreaktionen zeigen zudem oft langsame Reaktionsraten und/oder eine hohe Hydrolysetendenz,^{5–9} sodass es wünschenswert ist neue transferfähige reaktive Gruppen für die Festphasenpeptidsynthese zu entwickeln, um diese Form der nachbarschaftsinduzierten Reaktionen in Zukunft zuverlässiger anwenden zu können.

Die geometrische Anordnung der drei Einheiten des Liganden, d. h. der proteinbindenden Einheit, der reaktiven Gruppe und der gewünschten Modifizierung, ist von großer Bedeutung für eine effiziente nachbarschaftsinduzierte Reaktion, da die Lage modifizierbarer Aminosäureseitenketten des Zielproteins zur Ligandenbindestelle in jedem System anders ist. Deshalb wird die Lage der reaktiven Gruppen zueinander häufig empirisch durch die Untersuchung einer Protein- und/oder Ligandenserie optimiert,^{8,10,129} was viel Zeit in Anspruch nehmen kann.^{16,82} Zwar wurden bereits Systeme mit Hilfe von geometrischen Berechnungen optimiert,^{16,82,125} jedoch wurde bisher keine allgemeine Methode entwickelt, um optimale Protein-Ligand-Paare vorherzusagen. Daher wurde für das hier untersuchte Modellsystem eine molekulardynamische Vorhersage durchgeführt und mit experimentell gewonnenen Daten verglichen. Zu diesem Zweck wurden sechs Proteinvarianten mit gezielt eingebrachten Cysteinen, die in unterschiedlichem Abstand d zum N -Terminus des Liganden

liegen, generiert. Ebenso wurden fünf Ligandvarianten synthetisiert, welche zwischen dem *N*-Terminus und der reaktiven Gruppe Abstandshalter mit unterschiedlicher Länge l besitzen. Parallel wurde für jede der 30 Protein-Ligand-Kombinationen eine molekulardynamische Simulation durchgeführt, in welcher die Aufenthaltswahrscheinlichkeit der beiden an der Reaktion beteiligten Atome, nämlich dem α -Kohlenstoff der α -Chloracetamidgruppe des Liganden und dem Schwefelatom der Cysteinseitenkette am Protein, innerhalb von 5 Å zu einander untersucht wurde. Dabei stellte sich heraus, dass die Reaktivität der einzelnen Protein-Ligand-Paare nicht allein auf die Überbrückung der berechneten Abstände d zwischen dem Liganden und den eingebrachten proteinogenen Cysteinen durch die Abstandshalter verschiedener Längen l zwischen dem Liganden und der reaktiven Gruppe zurückgeführt werden kann. Stattdessen werden die Proteinvarianten mit dem kürzesten Abstand d zum Liganden als Bestandteile der reaktivsten Protein-Ligand-Paare vorhergesagt. Die Länge l des Abstandshalters am Liganden ist weniger wichtig, jedoch werden auch hier kürzere Abstandshalter bevorzugt, da sie weniger Freiheitsgrade besitzen als die längeren Varianten und somit weniger Konformationen einnehmen können, was die an ihnen befestigte reaktive Gruppe häufiger in geringem Abstand zum Schwefelatom des proteinogenen Cysteins positioniert. Im vergleichenden Reaktivitätstest wurde die Vorhersage der molekulardynamischen Simulation überprüft. Hierbei zeigte sich, dass insbesondere die beiden reaktivsten Proteinvarianten **P(C634)** und **P(C638)** durch die Simulationen zutreffend vorausgesagt werden konnten. Auch die geringere Abhängigkeit von der Länge l der Abstandshalter stimmt zwischen molekulardynamischen Simulationen und Experiment gut überein. Zwar reagiert der Ligand **CI-9L-f** mit dem kürzesten Abstandshalter, der das proteinogene Cystein in **P(C638)** erreichen kann am schnellsten mit dieser Proteinvariante, jedoch liegen die relativen Geschwindigkeiten der Liganden **CI-13L-f** und **CI-19L-f**, welche längere Abstandshalter enthalten, mit $v_{rel} = 0,3 \pm 0,02$ bzw. $v_{rel} = 0,2 \pm 0,02$ kaum darunter. Die Korrelation zwischen Aufenthaltswahrscheinlichkeit P und initialer Reaktionsgeschwindigkeit v_u liefert einen *Pearson*-Korrelationskoeffizienten von 0,75. Abweichungen zwischen der Vorhersage aus den molekulardynamischen Simulationen und der experimentellen Messung könnten sich z. B. durch die Beeinflussung der Reaktivität eines Cysteins durch seine Mikroumgebung oder strukturelle Veränderungen in einzelnen Proteinvarianten erklären.^{111,112,129,184,185}

Durch Bestimmung der Reaktionsausbeute verschiedener Protein-Ligand-Paare zu diversen Zeitpunkten wurde anschließend das reaktivste nachbarschaftsinduzierte Protein-Ligand-

Paar **P(C638)+CI-9L-f** ermittelt, welches mit einer Halbwertszeit von 5 Minuten und einer Markierungseffizienz von 100% nach 15 Minuten sowie einer relativen Geschwindigkeit von $v_{rel} = 9300 \pm 500$ gegenüber einer nicht-nachbarschaftsinduzierten Vergleichsreaktion mit GSH zu den schnellsten und effizientesten bisher publizierten nachbarschaftsvermittelten Reaktionen überhaupt gehört.⁵⁻¹⁷ Auch im Vergleich zu zellulären GSH-Konzentrationen ($c_{GSH} = 5 \text{ mM}$)^{156,186} zeigt das hier entwickelte nachbarschaftsinduzierte Reaktionspaar eine hohe relative Geschwindigkeit von $v_{rel} = 200 \pm 13$, sodass seine Anwendung in zellulärem Kontext möglich ist.

Zur Untersuchung der Leistungsfähigkeit des Modellsystems in humanen Zellen wurden u. a. *Pulldown*-Experimente mit den aufgereinigten Proteinvarianten **P(C638)** und **P(WT)** sowie aus Hek293-Zelllysaten, welche diese Proteinvarianten in Fusion mit dem fluoreszierenden Protein mCherry exprimierten, durchgeführt. Das Cystein-enthaltende Zielprotein **P(C638)** ließ sich hoch spezifisch nur von dem mit der reaktiven Gruppe versehenen Liganden **CI-9L-b** isolieren, während sowohl das unreaktive, affine Peptid **H-9L-b** als auch das reaktive, weniger affine Peptid **CI-9iL-b** keine detektierbare Menge desselben Proteins binden konnten. Diese Experimente zeigen deutlich, dass Protein-Ligand-Systeme mit vergleichsweise geringer Affinität zueinander von einer kovalenten Bindung profitieren ohne Selektivität zu verlieren.

Motiviert durch die schnelle initiale Reaktionsgeschwindigkeit und die somit innerhalb kurzer Zeit erreichbare hohe Modifizierungsrate wurde das Modellsystem zur Translokalisierung von mCherry-Fusionsproteinen in humanen HeLa-Zellen verwendet. Hierzu wurde der Ligand **CI-9L** C-terminal mit diversen Lokalisationssignalen modifiziert, von denen der Membrananker MA3 eine Translokalisierung des **P(C638)-mCherry**-Fusionsproteins in das Endomembransystem der Zellen induzierte. Dies ist das erste Beispiel, in dem eine nachbarschaftsinduzierte Reaktion zur Translokalisierung eines Proteins *in cellulo* genutzt wird.^{4,18} In dieser Arbeit konnte die Translokalisierung des Zielproteins nach etwa einer Stunde visualisiert werden. Gängige Dimerisierungssysteme translokalisieren im Sekunden- bis Minutenbereich, was vermutlich auf die hohe Affinität der verwendeten Dimerisierer und die damit verbundenen schnellen Assoziationsraten zurückzuführen ist. Das in dieser Arbeit etablierte Modellsystem ist also zur Translokalisierung von Proteinen geeignet, jedoch im Vergleich gegenüber gängigen Dimerisierungssystemen langsamer,^{2,218,219} sodass z. B. Untersuchungen zellulärer Signalwege, welche eine Translokalisierung im Sekunden- bis Minutenbereich erfordern,² mit

dem hier beschriebenen System vermutlich nicht durchgeführt werden könnten. Durch die Verwendung einer nachbarschaftsinduzierten Reaktion könnte auf die komplexe genetische Modifizierung des zu untersuchenden Proteins verzichtet werden. Ein Beispiel für die erfolgreiche Translokalisierung endogener Proteine stellen selbstlokalisierende Liganden dar.^{57,108} Bei dieser Methode werden die Zielproteine auf Grund von nicht-kovalenten Wechselwirkungen mit ihrem Liganden, welcher ein Lokalisationssignal trägt, translokalisiert. Bisher publizierte selbstlokalisierende Liganden benötigen 20 bis 90 Minuten zur Translokalisierung *in cellulo*.¹⁰⁸ Sie sind also ähnlich schnell wie das hier etablierte System, nutzen jedoch Liganden mit Affinitäten im (sub)nanomolaren Bereich für ihre jeweiligen Zielproteine. Wie in dieser Arbeit gezeigt, ist diese hohe Affinität essentiell, um die Zielproteine zu translokalisieren. So ist der hier verwendete Ligand **CI-9L-MA3** mit einer Affinität von ca. 1 μM kaum in der Lage das unreaktive Zielprotein **P(WT)** zu translokalisieren. Um die Translokalisationsrate zu verbessern ist die kovalente Bindung im **P(C638)-9L-MA3**-Konjugat notwendig, welche die geringere Affinität des peptidischen Liganden ausgleicht. Somit könnten nachbarschaftsinduzierte Reaktionen ein wichtiges Werkzeug für Translokalisierungsexperimente von endogenen Zielproteinen, für welche nur Liganden mit Affinitäten oberhalb des nanomolaren Bereichs zur Verfügung stehen, darstellen.

Ein Nachteil des hier verwendeten Systems ist die Notwendigkeit der Mikroinjektion der Liganden in die untersuchten Zellen. Dies schränkt seine Anwendung auf mikroskopische Untersuchungen einzelner Zellen aus zur Mikroinjektion geeigneter Zelllinien ein. Um dieses Problem zu lösen wurden im Rahmen dieser Arbeit bereits α -methylierte, kohlenwasserstoff-verbrückte Derivate des Liganden synthetisiert, da diese Modifizierung die Zellpermeabilität von Peptiden erhöhen kann.^{135,175,176} Obwohl die verbrückten Liganden keine detektierbare Zellpermeabilität aufwiesen, könnten sie durch Einführung positiv-geladener Aminosäureseitenketten weiter optimiert werden.¹⁷⁹ Alternativ könnten die Liganden zusätzlich zu den Lokalisationssignalen mit zellpenetrierenden Peptidsequenzen wie R₈ modifiziert werden, um Zellpermeabilität zu vermitteln.²²⁰ Da es zellpermeable Peptide gibt, die nach der Permeation bevorzugt in den Nukleus lokalisieren, könnte durch ihre Verwendung die Verbesserung der Zellpermeabilität mit einer Lokalisation innerhalb der Zelle einhergehen.^{208,221–223}

Eine praktische Anwendung der hier gezeigten zellulären Translokalisierung von Proteinen in humanen Zellen wäre wünschenswert. Hierbei könnten zum Beispiel endogene Proteine

angesprochen werden, welche ein natives Cystein in der Nähe der Bindetasche ihres Liganden aufweisen, und in unterschiedlichen Zellkompartimenten unterschiedliche Funktionen erfüllen. Da die Aminosäure Cystein jedoch relativ selten in Proteinen auftritt,¹¹¹ besitzt nicht jedes potentielle Zielprotein ein Cystein in der Nähe seiner Ligandenbindestelle. Daher ist es wünschenswert nachbarschaftsinduzierte Reaktionen für weitere Aminosäureseitenketten zu etablieren. Einen Startpunkt für diese Untersuchungen stellen die in der Einleitung aufgeführten Lysin-reaktiven Gruppen dar.^{121,122} Noch interessanter wäre die Verwendung von reaktiven Gruppen, welche nach dem Transfermechanismus die gewünschte Modifizierung auf das Zielprotein übertragen und anschließend ihre Bindestelle am Zielprotein verlassen können, sodass die Proteinfunktion weniger beeinflusst wird. Im Kontext des hier gezeigten Modellsystems ist insbesondere die Entwicklung von reaktiven Gruppen, welche unter den Bedingungen der Festphasenpeptidsynthese stabil sind, notwendig.

Zusätzlich zu den Verbesserungen des hier etablierten Protein-Ligand-Systems und einer Übertragung auf andere Zielproteine ist es von Interesse, die Vorhersage der molekulardynamischen Simulationen anhand weiterer Protein-Ligand-Paare zu testen. Hierbei könnten sowohl weitere von Protein-Protein-Interaktionen abgeleitete Protein-Peptid-Systeme als auch Proteine mit niedermolekularen Verbindungen als Ligand getestet werden. Da für einige Protein-Ligand-Systeme bereits Daten zur experimentellen Optimierung der Geometrie und Länge des verwendeten Abstandshalters verfügbar sind,^{8,10,16,82,125,129} könnte man in einem ersten Schritt die Vorhersagbarkeit dieser mit der hier gezeigten Methode überprüfen.

4 Zusammenfassung

Um die Lokalisation eines Proteins in einer Zelle zu steuern werden in der Natur u. a. peptidische Lokalisationssignale verwendet.¹ Zur artifiziellen Steuerung der Lokalisation von Proteinen werden hauptsächlich Dimerisierungssysteme genutzt.² Um die dazu notwendige genetische Manipulation der Zielproteine zu vermeiden, wird an der Modifikation endogener Proteine durch chemische Reaktionen geforscht.³ Ein besonders vielversprechendes Konzept stellen dabei nachbarschaftsinduzierte Reaktionen dar. Bei ihnen bindet ein Ligand, welcher eine reaktive Gruppe trägt, an sein Zielprotein, wodurch eine Reaktion mit in räumlicher Nähe angeordneten Aminosäureseitenketten des Zielproteins induziert wird.⁴

Die meisten publizierten nachbarschaftsvermittelten Reaktionen verwenden niedermolekulare Liganden oder Peptide, die in definierte Bindetaschen ihres Zielproteins binden. Im ersten Teil dieser Arbeit wurde ein Modellsystem zur nachbarschaftsinduzierten Modifikation eines Proteins ohne Bindetasche mit Hilfe eines peptidischen Liganden etabliert. Dadurch wurde das Konzept der nachbarschaftsinduzierten Reaktion auf die Bindung an flache Proteinoberflächen erweitert, welche häufig Protein-Protein-Interaktionen vermitteln. Im Rahmen dieser Untersuchungen wurde der peptidische Ligand mit einer α -Chloracetamidgruppe modifiziert, welche mit im Zielprotein installierten Cysteinen hoch spezifisch reagierte. Hierbei wurde besonderer Wert auf eine durch molekulardynamische Simulationen gestützte Optimierung der Lage der proteinogenen Cysteine und der Ligandstruktur gelegt. Ein Vergleich der berechneten Vorhersagen mit einem experimentellen Reaktivitätstest lieferte einen *Pearson*-Korrelationskoeffizienten von 0,75, wobei insbesondere die Vorhersage der effizientesten Protein-Ligand-Paare korrekt war. Die schnellste nachbarschaftsvermittelte Reaktion zwischen der Proteinvariante **P(C638)** und dem Liganden **CI-9L-f** zeigte *in vitro* eine hohe initiale Reaktionsgeschwindigkeit ($v = 34 \pm 1,9 \text{ nM} \cdot \text{s}^{-1}$), eine Halbwertszeit von fünf Minuten und einen vollständigen Umsatz nach 15 Minuten (Abbildung 42a). Mit einer relativen Geschwindigkeit von $v_{rel} = 9300 \pm 500$ war die hier entwickelte Reaktion deutlich schneller als eine nicht-nachbarschaftsinduzierten Reaktion mit Glutathion (GSH) (Abbildung 42b, $c_{GSH} = 20 \text{ } \mu\text{M}$). Auch im Vergleich zur Reaktion mit zellulären GSH-Konzentrationen (Abbildung 42b, $c_{GSH} = 5 \text{ mM}$) war die nachbarschaftsvermittelte Reaktion zwischen **P(C638)** und **CI-9L-f** deutlich schneller ($v_{rel} = 200 \pm 13$). Die hier untersuchte Reaktion liegt mit diesen

Charakteristika im oberen Bereich bisher publizierter nachbarschaftsvermittelter Reaktionen.⁵⁻¹⁷

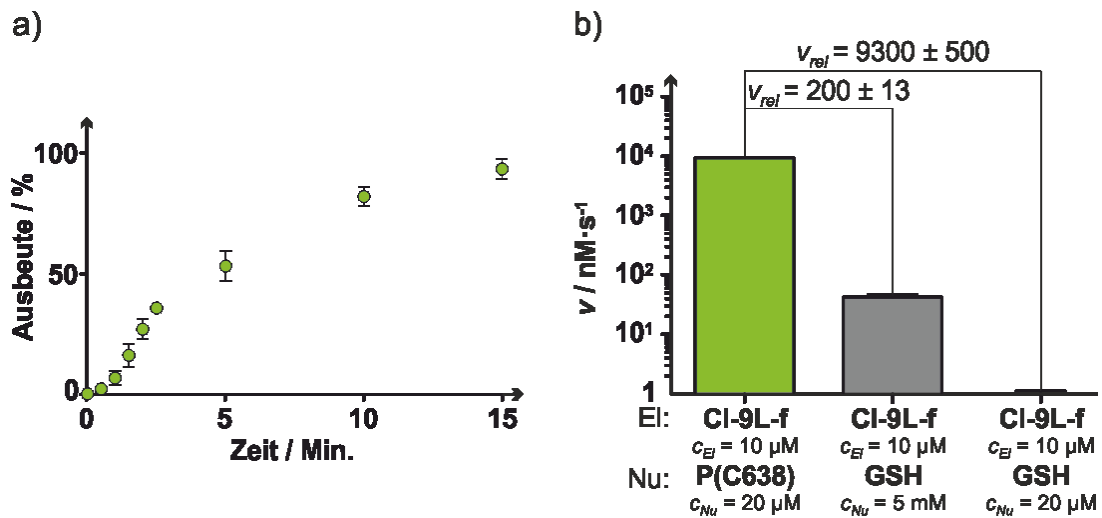


Abbildung 42: a) Graphische Darstellung der Reaktionsausbeuten zur Bestimmung der initialen Reaktionsgeschwindigkeit zwischen dem Protein **P(C638)** und dem elektrophilen Liganden **CI-9L-f**, über 15 Minuten. b) Vergleich der initialen Reaktionsgeschwindigkeiten v des in a) gezeigten Protein-Ligand-Paares **P(C638)+CI-9L-f** mit Vergleichsreaktionen verschiedener GSH-Konzentrationen.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde das Modellsystem zur Translokalisierung von in HeLa-Zellen exprimierten Zielproteinen verwendet. Hierzu wurde zunächst die Selektivität des Systems untersucht. In Markierungsexperimenten in *E. coli*-Zelllysaten zeigte sich, dass in diesem komplexen Reaktionsmedium die Reaktionsgeschwindigkeit ähnlich schnell zu den vorherigen Versuchen mit aufgereinigten Proteinen war. Zudem zeigte die Reaktion eine hohe Selektivität für das Zielprotein **P(C638)** gegenüber dem nicht-reaktiven Protein **P(WT)**, welche auch in *Pulldown*-Experimenten bestätigt wurde. Hier zeigte sich deutlich, dass zur effizienten Isolation des Zielproteins die Ausbildung der nachbarschaftsinduzierten kovalenten Bindung essentiell ist. Anschließend wurde der Ligand **CI-9L** C-terminal mit peptidischen Lokalisationssignalen modifiziert, welche zuvor Lokalisation in definierte Zellkompartimente von HeLa-Zellen gezeigt hatten. Der Ligand **CI-9L-MA3** translokalisierte **P(C638)-mCherry**-Fusionsproteine in 37% der untersuchten Zellen in das Endomembransystem der Zellen, während nicht reaktive **P(WT)-mCherry**-Fusionsproteine nur in 11% der Zellen eine Translokalisierung erfuhren (Abbildung 43). Hiermit wurde zum ersten Mal eine nachbarschaftsinduzierten Reaktion zur Translokalisierung eines intrazellulären Proteins genutzt.

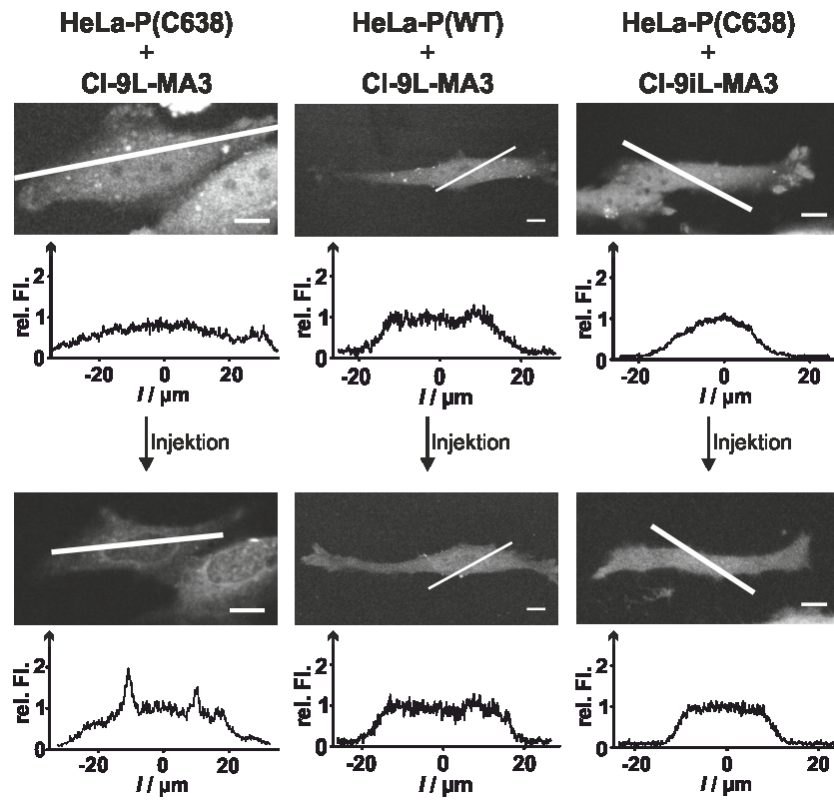


Abbildung 43: Konfokale Mikroskopieaufnahmen von transient P(C638)-mCherry oder P(WT)-mCherry exprimierenden HeLa-Zellen, die mit den Liganden CI-9L-MA3 oder CI-9iL-MA3 injiziert wurden. Für jede Zelle ist die Fluoreszenzaufnahme des mCherry-Proteins ($\lambda_{ex} = 561 \text{ nm}$, $\lambda_{em} > 575 \text{ nm}$) sowie ein Graph mit dem Intensitätsprofil der Fluoreszenz entlang der weißen Linie vor (oben) und 60 Minuten nach (unten) der Injektion gezeigt. Maßstab = 10 μm .

5 Material und Methoden

5.1 Materialien

5.1.1 Geräte

Tabelle 5: Alphabetische Liste der in dieser Arbeit verwendeten Laborgeräte.

Gerät	Typ	Hersteller	Firmensitz
4°C Kühlschrank	T1700	Liebherr GmbH	Ochsenhausen, Deutschland
-20°C Gefrierschrank	GP148G Premium	Liebherr GmbH	Ochsenhausen, Deutschland
-80°C Gefrierschrank	Ultra-Low Temperature Freezer MDF- U6086S	SANYO Electric Co., Ltd.	Moriguchi, Japan
Absaugsystem mit integrierter Vakuumpumpe	Vacusafe Comfort	INTEGRA Biosciences GmbH	Biebertal, Deutschland
Affinitätschromatograph			
Peristaltikpumpe	LA900	Landgraf Laborsysteme HLL GmbH	Langenhagen, Deutschland
30 mL GSH-Säule	Glutathion Sepharose High Performance	GE Healthcare Europe GmbH	Freiburg, Deutschland
5 mL GSH-Säule	5 mL GSTrap FF column	GE Healthcare Europe GmbH	Freiburg, Deutschland
5 mL Maltose-Säule	5 mL MBPTrap HP column	GE Healthcare Europe GmbH	Freiburg, Deutschland
Analytischer Hochleistungsflüssigkeitschromatograph			
Lösungsmittelbox	Organizer	Hitachi High Technologies	Schaumburg, Illinois, USA
UV-Detektor	Diode Array Detector L-2450	Hitachi High Technologies	Schaumburg, Illinois, USA
Autosampler	Autosampler L-2200	Hitachi High Technologies	Schaumburg, Illinois, USA
Pumpe	Pump L-2130	Hitachi High Technologies	Schaumburg, Illinois, USA
Säulenofen	Column oven L-2330	Hitachi High Technologies	Schaumburg, Illinois, USA

Gerät	Typ	Hersteller	Firmensitz
analytische C18-Säule	Zorbax Eclipse, XDB-C18 reverse-phase column (4,6·150 mm, particle size 5 µm)	Agilent Technologies	Santa Clara, Kalifornien, USA
Software	EZChrom Elite Client/Server vs. 3.1.7 Build 3.1.7.11	Hitachi High Technologies	Schaumburg, Illinois, USA

Analytischer Hochleistungsflüssigkeitschromatograph gekoppelt mit Massenspektrometer

Hochleistungsflüssigkeitschromatograph	1200 Series HPLC	Agilent Technologies	Santa Clara, Kalifornien, USA
analytische C18-Säule	Zorbax Eclipse, XDB-C18 reverse-phase column (4,6·150 mm, particle size 5 µm)	Agilent Technologies	Santa Clara, Kalifornien, USA
Massenspektrometer	6120 Quadrupole LC/MS	Agilent Technologies	Santa Clara, Kalifornien, USA
Software	Open Lab CDS Chem Station Edition for LC & LC/MS-Systems, Rev.C.01.07[27]	Agilent Technologies	Santa Clara, Kalifornien, USA
Autoklav	VE-150	Systec GmbH	Linden, Deutschland

Blotting System

Spannungsquelle	PowerPack PAC300	BioRad	Hercules, Kalifornien, USA
Kammer	Trans-Blot SD Semi Dry Transfer Cell		
CO ₂ -Inkubator	Steri-Cylce CO ₂ -Incubator HEPA Class 100	Thermo electron corporation	Langenselbond, Deutschland
Dewar	Dewargefaß Typ Sch-CAL	KGW-Isotherm GmbH	Karlsruhe, Deutschland
Disperser	T18 Ultra turrax	IKA-Werke GmbH & Co. KG	Staufen, Deutschland
Durchflusszytometer	BD FACSAria	BD Biosciences	San Jose, California, USA

Gerät	Typ	Hersteller	Firmensitz
Durchlichtscanner	Epson Perfection 2400 PHOTO	Seiko Epson Corporation	Nagano, Japan
Eismaschine	UBE 5.000	Ziegra Eismaschinen GmbH	Isernhagen-Süd, Deutschland
Feinwaage (< 1 g)	CPA Analysenwaage CPA224S	Sartorius	Göttingen, Deutschland
Filmkassette	Hypercassette	GE Healthcare Life Sciences	Chalfont St Giles, Großbritannien
Filmprozessierer	OptiMax X-ray Film Processor	PROTEC Medizintechnik GmbH	Oberstenfeld, Deutschland
Filteraufsatz für Schottflaschen	Nalgene Filter Units	Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, Massachusettes, USA

Fluoreszenzdetektor für Mikrotiterplatten

Fluoreszenzdetektor	Safire	Tecan Group Ltd.	Männedorf, Schweiz
Software	XFluor4SafireII Reader Server: V4.62n V4.51 Server Components: V4.55 - AddOn1; V4.55 - AddOn2; V4.55 - AddOn3; V4.62n - AddOn4 Calculation Server: V4.52_TecanCalc4 V4.56/4.5.6.4	Tecan Group Ltd. Tecan Group Ltd.	Männedorf, Schweiz Männedorf, Schweiz

Fluoreszenzscanner für Polyacrylamidgelle

Fluoreszenzscanner	Typhoon Trio+	GE Healthcare Europe GmbH	Freiburg, Deutschland
Software	Typhoon Scanner Control vs. 5.0 Build 5.0.0409.0700 ImageQuant Tools vs. 3.0	GE Healthcare Europe GmbH GE Healthcare Europe GmbH	Freiburg, Deutschland Freiburg, Deutschland

Gerät	Typ	Hersteller	Firmensitz
Flüssigkeitschromatograph			
Lösungsmittelbox	Box900	GE Healthcare Europe GmbH	Freiburg, Deutschland
UV-Detektor	pH/C-900	GE Healthcare Europe GmbH	Freiburg, Deutschland
Autosampler	UV-900	GE Healthcare Europe GmbH	Freiburg, Deutschland
Pumpe	p-900	GE Healthcare Europe GmbH	Freiburg, Deutschland
Fraktionierer	Frac-950	GE Healthcare Europe GmbH	Freiburg, Deutschland
Software	Unicorn 5.11 Workstation	GE Healthcare Europe GmbH	Freiburg, Deutschland
kleine Gelpermeationssäule	HiLoad 16/600 Superdex 75 pg	GE Healthcare Europe GmbH	Freiburg, Deutschland
große Gelpermeationssäule	HiLoad 26/600 Superdex 75 pg	GE Healthcare Europe GmbH	Freiburg, Deutschland
Gefrierbehälter	Mr. Frosty Gefrierbehälter	Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, Massachusettes, USA
Gefriertrocknungsanlage			
Trocknungsanlage	Heto PowerDry LL3000 Freeze Dryer	Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, Massachusettes, USA
Vakuumdetektor	SingleGauge TPG 261	Pfeiffer	Aßlar, Deutschland
Grobwaage (10–300 g)	Precision balance KERN 440	Kern & Sohn GmbH	Stuttgart, Deutschland
Heizrührer	MR3001K	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG	Schwabach, Deutschland
Homogenisator	Microfluidizer 1109	Microfluidics Corporation	Westwood, Massachusettes, USA
Horizontale Elektrophoresekammern			
Spannungsquelle	PowerPack PAC300	BioRad	Hercules, Kalifornien, USA
Große Kammer	14.5 x 13.5 cm	Febikon Labortechnik GmbH	Wermelskirchen, Deutschland
Kleine Kammer	8.5 x 7.5 cm	Febikon Labortechnik GmbH	Wermelskirchen, Deutschland

Gerät	Typ	Hersteller	Firmensitz
Inkubationsschüttler für Zellkulturen	Innova 4430	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Inkubationsschüttler für Reaktionsgefäße	ThermoMixer Comfort	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Invertiertes Tischmikroskop			
Mikroskop	Axiovert 40 CFL	Carl Zeiss AG	Oberkochen, Deutschland
Kamera	AxioCam Mrm	Carl Zeiss AG	Oberkochen, Deutschland
Quecksilberlampe	MBQ 52 AC	Carl Zeiss AG	Oberkochen, Deutschland
Software	AxioVision40 vs. 4.6.3.0	Carl Zeiss AG	Oberkochen, Deutschland
Filter FITC	Filter Set 46 HE	Carl Zeiss Microimaging GmbH	Oberkochen, Deutschland
Filter DAPI	Filter Set 49	Carl Zeiss Microimaging GmbH	Oberkochen, Deutschland
Filter mCherry	Filter Set 20	Carl Zeiss Microimaging GmbH	Oberkochen, Deutschland
10x Objektiv	A-Plan 10x/0,25 Ph1 ∞/-	Carl Zeiss Microimaging GmbH	Oberkochen, Deutschland
20x Objektiv	LD A-Plan 20x/0,30 Ph1 ∞/1,0	Carl Zeiss Microimaging GmbH	Oberkochen, Deutschland
Konfokales Mikroskop			
Mikroskop	LSM 510 Meta confocal microscope	Carl Zeiss AG	Oberkochen, Deutschland
CO ₂ -Kontroller	CO ₂ controler	PeCon GmbH	Erbach, Deutschland
Temperaturkontroller	tempcontroler 37-2 digital	PeCon GmbH	Erbach, Deutschland
60x Objektiv	Plan-Apochromat 63x/1.46	Carl Zeiss Microimaging GmbH	Oberkochen, Deutschland
Software	Oil Corr M27 Laser Scanning Microscope LSM510/ Confo Cor vs. 4.2 SP1	Carl Zeiss Microimaging GmbH	Oberkochen, Deutschland
Kühlzentrifuge für Reaktionsgefäße < 2,0 mL	5415R	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland

Gerät	Typ	Hersteller	Firmensitz
Kühlzentrifuge für Reaktionsgefäße < 50 mL			
Kühlzentrifuge	5804R	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Rotor Reaktionsgefäße	A-4-44	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Rotor Mikrotiterplatten	A-2-DWP	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Kühlzentrifuge für Reaktionsgefäße < 1 L			
Kühlzentrifuge	Avanti J-26XP	Beckman Coulter GmbH	Krefeld, Deutschland
Rotor 1 L Reaktionsgefäße	JLA-8.1000	Beckman Coulter GmbH	Krefeld, Deutschland
Rotor 100 mL Reaktionsgefäße	JA-25.50	Beckman Coulter GmbH	Krefeld, Deutschland
Mehrkanalpipette 1–10 µL	Finnpipette® F1	Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, Massachusettes, USA
Mehrkanalpipette 5–50 µL			
Membranvakuumpumpe	MZ2C	Vacuubrand GmbH & Co. KG	Wertheim, Deutschland
Mikroinjektionssystem			
Pumpe	FemtoJet unit	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Injektionseinheit	InjectMan NI2 unit	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Mikrowelle	MW 7809	Severin Elektrogeräte GmbH	Sundern, Deutschland
Nano-Hochleistungsflüssigkeitschromatograph gekoppelt mit Tandem-Massenspektrometer			
Hochleistungsflüssigkeits- chromatograph	UltiMate™ 3000 RSLCnano system	Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, Massachusettes, USA
Tandem- Massenspektrometer	Q Exactive Hybrid Quadrupole- Orbitrap Mass Spectrometer mit nano-spray flex ion source	Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, Massachusettes, USA
Kartusche	5 µm, 100 Å, 300 µm ID x 5 mm	Dionex Corporation	Sunnyvale, Kalifornien, USA

Gerät	Typ	Hersteller	Firmensitz
Trennsäule	PepMap100 RSLC C18 nano-HPLC column (2 µm, 100 Å, 75 µm ID x 25 cm)	Dionex Corporation	Sunnyvale, Kalifornien, USA
Silica-Spitze	ID 20 µm, Tip-ID 10 µM	New Objective	Woburn, Massachusettes, USA
Neubauer Zählkammer	Neubauer improved	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG	Lauda- Königshofen, Deutschland

Präparativer Flüssigkeitschromatograph

Flüssigkeitschromatograph	UV/Vis-Detektor: SPD-20AV Fraktionssammler: FRC-10A Kontrolleinheit: CBM-20A Pumpen: LC-8A Injektor: 3725i	Shimadzu Europe GmbH Shimadzu Europe GmbH Shimadzu Europe GmbH Shimadzu Europe GmbH Agilent Technologies	Duisburg, Deutschland Duisburg, Deutschland Duisburg, Deutschland Duisburg, Deutschland Santa Clara, Kalifornien, USA
kleine präparative C18-Säule	Nucleodur C18 reverse-phase column (10 · 50 mm, 110 Å, particle size 5 µm)	Macherey Nagel GmbH & Co. KG	Düren, Deutschland
große präparative C18-Säule	Nucleodur C18 reverse-phase column (10 · 125 mm, 110 Å, particle size 5 µm)	Macherey Nagel GmbH & Co. KG	Düren, Deutschland
Software	LC solution vs. 1.24SP1	Shimadzu Europe GmbH	Duisburg, Deutschland
pH-Meter	inolab	Wissenschaftlic h Technische Werkstätten GmbH	Weilheim, Deutschland
Photometer	BioPhotometer	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Pipette 0,1–2,5 µL	Eppendorf Research plus	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Pipette 0,5–10 µL	Eppendorf Research plus	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland

Gerät	Typ	Hersteller	Firmensitz
Pipette 2,0–20 µL	Eppendorf Research plus	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Pipette 10–100 µL	Eppendorf Research plus	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Pipette 20–200 µL	Eppendorf Research plus	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Pipette 100–1000 µL	Eppendorf Research plus	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Reinstwasserbereiter	Millipore Q-water system Q-POD	Millipore	Billerica, Massachusettes, USA
Rotator	Smart rotator SB3	Bibby Scientific Limited	Staffordshire, UK
Schüttelwasserbad	SW23	Julabo GmbH	Seelbach, Deutschland
Schüttler für die manuelle Festphasenpeptidsynthese	VIBRAX VXR	IKA-Werke GmbH & Co. KG	Staufen, Deutschland
Schüttler für Gele und Western Blots	Mini gyro-rocker SSM3	Bibby Scientific Limited	Stone, UK
Skalpell	Einmal-Skalpell Cutfix, Klingenform 11	B. Braun Melsungen AG	Melsungen, Deutschland
Spektrophotometer			
Spektrophotometer	V-550 UV/Vis Spektrophotometer	JASCO Labor- und Datentechnik GmbH	Gross-Umstadt, Deutschland
Software	Spectra Manager for Windows 95/NT vs. 1.54.03 (Build 1)	JASCO Labor- und Datentechnik GmbH	Gross-Umstadt, Deutschland
Fmoc-Küvette	Präzisionsküvette aus Quarzglas, SUPRASIL, 3500 µL, Typ 104.002-QS	Hellma Analytics	Müllheim, Deutschland
FITC-Küvette	Präzisionsküvette aus Quarzglas, 700 µL, Typ 104.002-QS	Hellma Analytics	Müllheim, Deutschland
sterile Sicherheitswerkbank	HeraSafe	Heraeus Instruments GmbH	Hanau, Deutschland
Stickstofftank zur Stickstoffentnahme	TP100	Air Liquide S. A.	Paris, Frankreich

Gerät	Typ	Hersteller	Firmensitz
Stickstofftank zur Zelllagerung	Chronos 350	Messer Group GmbH	Bad Soden am Taunus, Deutschland
Syntheseroboter			
Syntheseroboter	Syro I	MultiSynTech GmbH	Witten, Deutschland
Software	Synthesis Software for Syro vs. 2.0.153	MultiSynTech GmbH	Witten, Deutschland
Thermozykler	Mastercycler epGradient	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Ultraschallbad	Ultrasonic Cleaner B-220	Branson Ultrasonics Corporation	Danbury, Connecticut, USA
Ultraschall-Zelldisruptor	Digital Sonifier	Branson Ultrasonics Corporation	Danbury, Connecticut, USA
Kleiner UV-Transilluminator	High Performance UV Transiluminator	UVP	Upland, Kalifornien, USA
Großer UV-Transilluminator			
UV-Transilluminator	FluorChem	Alpha Innotech Corp.	Fusioniert mit Cell Biosciences
Kamera	D5200	Nikon Corporation	Tokio, Japan
Software	Camera Control Pro vs. 2.22.0	Nikon Corporation	Tokio, Japan
UV/Vis-Spektrophotometer			
Photometer	NanoDrop 2000c	PeQLab Biotechnologie GmbH	fusioniert mit VWR
Software	2000/2000c 1.1.03:1 1.04.11 ND0:100004	Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, MA, USA
Vakuumkonzentrator			
Zentrifuge	RVC2-25	Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH	Osterode am Harz, Deutschland
Kühlfalle Vakuumdetektor	CT04-50 Vap5	VACUUBRAND GMBH + CO KG	Wertheim, Deutschland

Gerät	Typ	Hersteller	Firmensitz
Vakuumsystem manuelle Festphasenpeptidsynthese	Vac-Man Laboratory Vacuum Manifold	Promega Corporation	Fitchburg, Wisconsin, USA
Vertikale Elektrophoresekammer			
Spannungsquelle	PowerPack PAC300	BioRad	Hercules, Kalifornien, USA
Kammer	Mini-PROTEAN Tetra Handcast System	BioRad	Hercules, Kalifornien, USA
Vortexer	VortexGenie Z	Scientific Industries, Inc.	Bohemia, New York, USA
Waage (1–10 g)	ME235P	Sartorius	Göttingen, Deutschland
Wärmeschrank	BINDER ED 53	BINDER GmbH	Tuttlingen, Deutschland
Zentrifuge für Reaktionsgefäße < 2,0 mL	MiniSpin	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland

5.1.2 Verbrauchsmaterialien und Kits

Tabelle 6: Alphabetische Liste der in dieser Arbeit verwendeten Verbrauchsmaterialien.

Material	Typ	Hersteller	Firmensitz
Aluminiumfolie für Mikrotiterplatten	sealing tape Thermowell costar 6570	Corning Incorporated	Corning, New York, USA
Amicon Ultra Centrifugal Filter Units	0,5 mL	Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
Amicon Ultra Centrifugal Filter Units	5 mL	Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
Amicon Ultra Centrifugal Filter Units	15 mL	Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
Dialysekassetten	Slide-A-Lyzer Dialysis Cassettes <i>MWCO</i> : 3,5 kDa Volumen: 30 mL	Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, Massachusettes, USA
Filtermembran	Celluloseacetat, Porengröße 0,2 µm, Durchmesser 47 mm	Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, Massachusettes, USA
Filterröhrchen	Falcon Tube with Cell Strainer Cap	Corning Incorporated	Corning, New York, USA
Fotofilm	Fujifilm Super RX, UV / blue sensitive	Fujifilm Holdings K.K.	Tokyo, Japan

Material	Typ	Hersteller	Firmensitz
Glasgeräte		DURAN Group GmbH	Wertheim/Main, Germany
Glaspipette	Pasteurpipette, Natron-Kalk-Glas ISO 7712	BRAND GMBH + CO KG	New York, New York, USA
HPLC-Vials	snap ring 1,5 mL cl. Glass, 32 x 11,6 mm	VWR International GmbH	Darmstadt, Deutschland
HPLC-Inlets	inlets, 250 µL insert, polypropylene	Agilent Technologies	Santa Clara, California, USA
HPLC-Deckel	snap ring cap, 11 mm, blue, soft, red rubber/ PTFE beige, 45°, 1,0 mm	VWR International GmbH	Darmstadt, Deutschland
Inkubationsröhrchen für <i>E. coli</i> -Kulturen	Tube 13 ml, 100 x 16 mm, PP, with print, with assembled ventilation cap, 25 sterile in the bag	Sarstedt AG & Co.	Nümbrecht, Germany
Kanülen	Sterican (0,90·70 mm, 20G·2 3/4"; 0,80·120 mm, 21G·4 3/4", 1.20·40 mm, 18G·1 1/2")	B. Braun Melsungen AG	Melsungen, Deutschland
Kryoröhrchen	CryoPure Gefäß 1,8ml	Sarstedt AG & Co.	Nümbrecht, Germany
Lagerplatten für Reaktionen zur Bestimmung der initialen Reaktionsgeschwindigkeit	MICROPLATTE, 96 WELL, PS, F-BODEN, TRANSP.	Greiner Bio-One International GmbH	Kremsmünster, Österreich
Mikroinjektionsnadeln	Eppendorf Femtotips II, sterile injection capillary, 0,5 µm inner and 0,7 µm outer diameter	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Mikrotiterplatten für die Fluoreszenz-polarisationsspektroskopie	384 well assay plate, no lid, low volume, non-binding surface, round bottom, non-sterile, black polystyrene	Corning Incorporated	Corning, New York, USA
Nitrocellulose Membran	nitrocellulose membrane (Amersham Protran 0,45 NC 300mm×4m)	GE Healthcare Europe GmbH	Freiburg, Germany
Papiertücher	Kostmetiktücher	Großverbrauchersp ezialisten eG	Heidenheim, Deutschland

Material	Typ	Hersteller	Firmensitz
pH-Teststreifen	MColorpHast	Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
Pipettenspitzen für Finntip Pipetten	Finntip Pipettenspitzen	Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, Massachusettes, USA
Pipettenspitzen, 10 µL	Pipette Tip 10µL neutral	Sarstedt AG & Co.	Nümbrecht, Germany
Pipettenspitzen, 200 µL	Pipette Tip 200µL	Sarstedt AG & Co.	Nümbrecht, Germany
Pipettenspitzen, 1250 µL	Spitzen, 1250 µl, farblos, graduert, Reload-System, DNase-, Rnasefrei	Nerbe Plus GmbH	Winsen/Luhe, Deutschland
Pipettenspitzen mit Filter, 10 µL	Biosphere Fil. Tip 10 µL farblos	Sarstedt AG & Co.	Nümbrecht, Germany
Pipettenspitzen mit Filter, 200 µL	Biosphere Fil. Tip 200 µL farblos	Sarstedt AG & Co.	Nümbrecht, Germany
Pipettenspitzen mit Filter, 1250 µL	Biosphere Fil. Tip 1250 ul, lang	Sarstedt AG & Co.	Nümbrecht, Germany
PCR-Reaktionsgefäß, 200 µL	Multiply-µStrip Pro 8- strip	Sarstedt AG & Co.	Nümbrecht, Germany
Reaktionsgefäß , 0,5 mL	SafeSeal tube 0,5 mL	Sarstedt AG & Co.	Nümbrecht, Germany
Reaktionsgefäß, 1,5 mL	SafeSeal tube 1,5 mL	Sarstedt AG & Co.	Nümbrecht, Germany
Reaktionsgefäß, 2,0 mL	SafeSeal tube 2,0 mL	Sarstedt AG & Co.	Nümbrecht, Germany
Reaktionsgefäß, 5,0 mL	Eppendorf Tubes 5,0 mL	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Reaktionsgefäß, 15 mL	Tube 15 ml, 120 x 17 mm, conical base, PP, with print, assembled red cap 50 sterile&pyrogen-free	Sarstedt AG & Co.	Nümbrecht, Germany
Reaktionsgefäß, 50 mL	Tube 50 ml, 120 x 17 mm, conical base, PP, with print, assembled red cap 25 sterile&pyrogen-free	Sarstedt AG & Co.	Nümbrecht, Germany
Reaktionsplatten für Reaktionen zur Bestimmung der initialen Reaktions- geschwindigkeit	DeepWellplates 1.3 ml, Nunc	Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, Massachusetts, USA

Material	Typ	Hersteller	Firmensitz
serologische Pipetten, 1 mL	serological pipette 1 mL plugged, sterile, pyrogen-free, individually packed	Sarstedt AG & Co.	Nümbrecht, Germany
serologische Pipetten, 2 mL	serological pipette 2 mL plugged, sterile, pyrogen-free, individually packed	Sarstedt AG & Co.	Nümbrecht, Germany
serologische Pipetten, 5 mL	serological pipette 5 mL plugged, sterile, pyrogen-free, individually packed	Sarstedt AG & Co.	Nümbrecht, Germany
serologische Pipetten, 10 mL	serological pipette 10 mL plugged, sterile, pyrogen-free, individually packed	Sarstedt AG & Co.	Nümbrecht, Germany
serologische Pipetten, 20 mL	serological pipette 25 mL plugged, sterile, pyrogen-free, individually packed	Sarstedt AG & Co.	Nümbrecht, Germany
2 mL Spritzenreaktoren mit Stempel	manual PP-Reactor 2 mL with PE Frit	MultiSynTech GmbH	Witten, Deutschland
5 mL Spritzenreaktoren mit Stempel	manual PP-Reactor 5 mL with PE Frit	MultiSynTech GmbH	Witten, Deutschland
10 mL Spritzenreaktoren mit Stempel	manual PP-Reactor 10 mL with PE Frit	MultiSynTech GmbH	Witten, Deutschland
20 mL Spritzenreaktoren mit Stempel	manual PP-Reactor 20 mL with PE Frit	MultiSynTech GmbH	Witten, Deutschland
2 mL Spritzenreaktoren ohne Stempel	Syro PP-Reactor 2 mL with PE Frit	MultiSynTech GmbH	Witten, Deutschland
5 mL Spritzenreaktoren ohne Stempel	Syro PP-Reactor 5 mL with PE Frit	MultiSynTech GmbH	Witten, Deutschland
10 mL Spritzenreaktoren ohne Stempel	Syro PP-Reactor 10 mL with PE Frit	MultiSynTech GmbH	Witten, Deutschland
Whatman Papier	Grade GB005 Blotting Paper, sheet, 15 × 15 cm	GE Healthcare Europe GmbH	Freiburg, Germany
Zellkulturmikrotiter- platte (6-Kavitäten)	TC-Platte 6 Well, Standard, F	Sarstedt AG & Co.	Nümbrecht, Germany
Zellkulturmikrotiter- platte (24-Kavitäten)	TC-Platte 24 Well, Standard, F	Sarstedt AG & Co.	Nümbrecht, Germany
Zellkulturmikrotiter- platte (96-Kavitäten)	TC-Platte 96 Well, Standard, F	Sarstedt AG & Co.	Nümbrecht, Germany

Material	Typ	Hersteller	Firmensitz
Zellkulturmikrotiterplatte für Zellpermeabilitätstest (96-Kavitäten)	CellBIND® 96-well microplate	Corning Incorporated	Corning, New York, USA
Zellkulturschale mit Glasboden, unbeschichtet	35 mm Dish (No. 1.0 Coverslip, 14 mm Glass Diameter, Uncoated)	MatTek corporation	Ashburne, Massachusettes, USA
Zellkulturschale mit Glasboden, poly-D-Lysin-beschichtet	35 mm Dish (No. 1.0 Coverslip, 14 mm Glass Diameter, poly-d-Lysin coated)	MatTek corporation	Ashburne, Massachusettes, USA
Zellkulturschale mit Glasboden, Kollagen-beschichtet	35 mm Dish (No. 1.0 Coverslip, 14 mm Glass Diameter, collagen coated)	MatTek corporation	Ashburne, Massachusettes, USA
Zellkulturschale (10 cm Durchmesser)	TC-Schale 100, Standard	Sarstedt AG & Co.	Nümbrecht, Germany

Tabelle 7: Alphabetische Liste der in dieser Arbeit verwendeten Kits.

Kit	Typ	Hersteller	Firmensitz
Chemolumineszenz	Amersham ECL Western Blotting Detection Reagent	GE Healthcare Life Sciences	Chalfont St Giles, Großbritannien
Gelextraktion	E.Z.N.A. Gel Extraction Kit	Omega Bio-tek	Norcross, Georgia, USA
Mycoplasmentest	Venor GeM Classic Mycoplasma Detection Kit	Minerva Biolabs GmbH	Berlin, Deutschland
Polymerase für Mycoplasmentest	hot-start MB Taq DNA Polymerase	Minerva Biolabs GmbH	Berlin, Deutschland
Plasmid-Aufreinigung	QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen N.V.	Venlo, Niederlande
Plasmid-Aufreinigung	QIAGEN Plasmid Midi Kit	Qiagen N.V.	Venlo, Niederlande
PCR-Reinigung	E.Z.N.A. Cycle Pure Kit	Omega Bio-tek	Norcross, Georgia, USA
Zink-Imidazol-Färbung	SERVASnow Staining Kit	SERVA Electrophoresis GmbH	Heidelberg, Deutschland

5.1.3 Allgemeine Chemikalien

Soweit nicht anders angegeben wurden die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien von den Firmen Sigma Aldrich, Merck, Carl Roth oder Iris Biotech bezogen. In den folgenden Tabellen sind nur die Chemikalien angegeben, bei denen eine Änderung der Bezugsquelle sehr wahrscheinlich Einfluss auf die Experimente hat.

Tabelle 8: Alphabetische Liste der in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien.

Chemikalie	Typ	Hersteller	Firmensitz
6x DNS-Probenpuffer	DNA Gel Loading Dye (6X)	Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, Massachusetts, USA
BCIP/NBT	BCIP/NBT	Merck Millipore	Darmstadt, Deutschland
DNS-Größenstandard	GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, Massachusetts, USA
dNTP-Mischung	dNTP Mix (2 mM each)	Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, Massachusetts, USA
Entwicklerlösung	Citroline 2000	Adefo Chemie GmbH	Dietzenbach, Deutschland
Fixierungslösung	Röntgen Fixier Konzentrat	Adefo Chemie GmbH	Dietzenbach, Deutschland
Fluorescein-modifiziertes Dextran	Dextran, Fluorescein, 3000 MW, Anionic	Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, Massachusetts, USA
GelRed (10.000x)	GelRed Nucleic Acid Gel Stain, 10,000X in water	Biotium, Inc.	Fremont, California, USA
Kinase-inhibitoren	cOmplete ULTRA Tablets, Mini, EDTA-free, EASYpack	F. Hoffmann-La Roche AG	Basel, Schweiz
MgSO ₄ -Lösung	Magnesium Chloride Solution, 25 mM	Promega Corporation	Fitchburg, Wisconsin, USA
Proteingrößenstandard	PageRuler Plus Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, Massachusetts, USA
steriles DMSO	Dimethylsulfoxide (DMSO) for cell culture	PAN-Biotech GmbH	Aidenbach, Deutschland
Taq-Polymerasebuffer	Thermophilic DNA Polymerase 10x Reaction buffer, Mg-Free	Promega Corporation	Fitchburg, Wisconsin, USA

Chemikalie	Typ	Hersteller	Firmensitz
Trypanblau-Lösung	Trypan Blue solution (0.4%, liquid, sterile-filtered, suitable for cell culture)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	München, Deutschland

5.1.4 Aminosäuren und Trägermaterialien

Die zur Peptidsynthese verwendeten Aminosäuren wurden von verschiedenen Anbietern bezogen. Wichtig ist bei diesen die Wahl der korrekten Schutzgruppe, sodass im Folgenden nur eine Liste dieser gegeben wird.

Tabelle 9: Aminosäuren mit reaktiven Seitenketten und den Schutzgruppen, die im Rahmen dieser Arbeit für sie verwendet wurden. Die bei einer Abspaltung im sauren Millieu gebrochene Bindung ist mit einem roten Dreieck markiert.

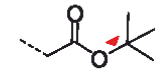
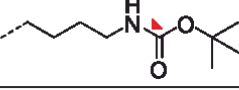
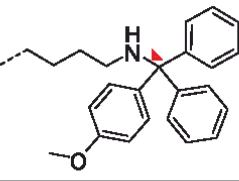
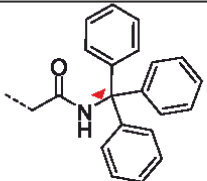
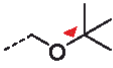
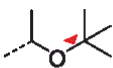
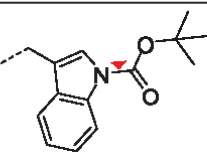
Aminosäure	Struktur
D(tBu)	
K(Boc)	
K(Mmt)	
N(Trt)	
S(tBu)	
T(tBu)	
W(Boc)	

Tabelle 10: Alphabetische Liste der in dieser Arbeit verwendeten Trägermaterialien.

Typ	Hersteller	Firmensitz
Harze zur Peptidsynthese		
Rink Amide MBHA resin (100–200 mesh)	Iris Biotech GmbH	Markredwitz, Deutschland
NovaSyn®TGR resin	Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
STV-Kügelchen		
Dynabeads M-280 Streptavidin	Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, Massachusetts, USA
Streptavidin Magnetic Beads	New England Biolabs Inc.	Ipswich, Massachusetts, USA

5.1.5 Lösungen, Medien und Puffer

Tabelle 11: Alphabetische Liste der in dieser Arbeit verwendeten Puffer und Lösungen.

Puffer/Lösung	Substanz	Konzentration
10x Anodenpuffer	Tris (pH 8,8)	3 M
10x Kathodenpuffer	Tris (pH nicht einstellen)	1 M
	Tricin	1 M
	SDS	1 % (w/v)
10x nativer Laufpuffer	Tris (pH nicht einstellen)	0,25 M
	Glycin	2 M
1x SDS-Probenpuffer	Tris (pH 6,8)	0,05 mM
	SDS	2 % (w/v)
	β-Mercaptoethanol	5 % (v/v)
	Glycerin	10 % (v/v)
	4-Bromophenol	0,2 % (w/v)
1%-ige Agaroselösung	Agarose	1 % (w/v)
	GelRed (10.000x)	1 x
	TAE-Puffer	
1,5%-ige Agaroselösung	Agarose	1,5 % (w/v)
	GelRed (10.000x)	1 x
	TAE-Puffer	
2x nativer Trenngelpuffer	Tris (pH 10,0)	0,75 M
4x nativer Sammelgelpuffer	Tris (pH 6,8)	0,5 M
4x SDS-Gelpuffer	Tris (pH 8,45)	3 M
	SDS	3 % (w/v)
5x SDS-Probenpuffer	Tris (pH 6,8)	0,25 mM
	SDS	10 % (w/v)
	β-Mercaptoethanol	25 % (v/v)
	Glycerin	50 % (v/v)
	4-Bromophenol	1 % (w/v)

Puffer/Lösung	Substanz	Konzentration
Abspaltlösung	TFA	94 %
	H ₂ O	2,5 %
	EDT	2,5 %
	TIPS	1 %
Acetylierungslösung	DIPEA	8,3 %
	Ac ₂ O	8,3 %
	DMF	83 %
Ammoniumcarbonatlösung	NH ₄ HCO ₃	25 mM
Antikörperpuffer 1	Milchpulver	3 % (w/v)
	NaN ₃	0,02 % (w/v)
	TBS-T-Puffer (1x)	
Antikörperpuffer 2	Milchpulver	3 % (w/v)
	TBS-T-Puffer (1x)	
APS-Stammlösung	APS	10 % (w/v)
Blockierpuffer	Milchpulver TBS-T-Puffer (1x)	5 % (w/v)
CaCl ₂ -Lösung	Calciumchlorid	100 mM
Chloranil-Lösung	Chloranil Toluol	gesättigt
Coomassie-Färbelösung	Coomassie Brilliant Blau	5 g·L ⁻¹
	EtOH	20 % (v/v)
	Essigsäure	10 % (v/v)
DAPI-Lösung	DAPI	3 μM
	PBS-Puffer	
Entfärbelösung	EtOH	20 % (v/v)
	Essigsäure	10 % (v/v)
FITC-Messpuffer	NaH ₂ PO ₄ (pH 8,5)	100 mM
Fluorescein-Lösung	Fluorescein	5 mg·mL ⁻¹
	DMSO	
Fmoc-Entschützungslösung	Piperidin	25 % (v/v)
	DMF	
FP-Puffer	NaCl	100 mM
	HEPES (pH 7,4)	50 mM
	Tween-20	0,1 % (v/v)
Gelpermeationspuffer	NaCl	100 mM
	HEPES (pH 7,4)	50 mM
	TCEP	2 mM
Glycerinlösung	Glycerin	50 %
GSH-Elutionspuffer	NaCl	100 mM
	HEPES (pH 7,4)	50 mM
	TCEP	2 mM
	GSH	20 mM
GSH-Puffer	NaCl	100 mM
	HEPES (pH 7,4)	50 mM
	TCEP	45 μM
HPLC-Lösungsmittel A	TFA	0,1 %
	H ₂ O	

Puffer/Lösung	Substanz	Konzentration
HPLC-Lösungsmittel B	TFA ACN	0,1 %
HPLC-Lösungsmittel C	Ameisensäure H ₂ O	0,1 %
HPLC-Lösungsmittel D	Ameisensäure ACN	0,1 %
IPTG-Lösung	IPTG	1 M
Kaisertestlösung 1	Phenol Amberlite MB-2 Harz EtOH	4 g·mL ⁻¹ 0,4 g·mL ⁻¹
Kaisertestlösung 2	KCN H ₂ O	10 mM
Kaisertestlösung 3	Kaisertestlösung 2 Pyridin Amberlite MB-2 Harz	20 mL 1 L 40 mg·L ⁻¹
Kaisertestlösung A	Kaisertestlösung 1 Kaisertestlösung 3	100 mL 1020 mL
Kaisertestlösung B	Ninhydrin Ethanol	0,5 g·mL ⁻¹
Katalysatorlösung	Grubbs I-Katalysator DCE	4 g·L ⁻¹
Lysepuffer	NaCl HEPES (pH 7,4) TCEP	500 mM 50 mM 2 mM
Lysepuffer für Hek293-Zellen	NaCl Tris EDTA NP-40 Natriumdeoxycholinsäure SDS	150 mM 50 mM 1 mM 1 % (v/v) 0,5 % (v/v) 0,1 % (w/v)
Mmt-Entschützungslösung	DCM TIPS TFA	466 10 24
Mobilisierungspuffer	EDTA Tris (pH 8,3)	50 mM 250 mM
Paraformaldehyd-Lösung	Paraformaldehyd PBS-Puffer	4 % (v/v)
PD-Elutionslösung 1	HEPES (pH 7,4) EDTA	10 mM 1 mM
PD-Elutionslösung 2	EDTA (pH 8,2) Formamid	10 mM 95 % (v/v)
PD-Elutionslösung 3	SDS	0,1 % (w/v)
PD-Elutionslösung 4	Biotin	50 mM
PD-Elutionslösung 5	NaCl Biotin	2 M 25 mM
PD-Elutionslösung 6	NaCl	2 M
PD-Elutionslösung 7	NaOH	0,5 M

Puffer/Lösung	Substanz	Konzentration
PD-Elutionslösung 8	NaCl	2 M
	NaOH	0,5 M
PD-Elutionslösung 9	HCl	3 % (w/v)
PD-Elutionslösung 10	Urea	5 M
PD-Elutionslösung 11	Guanidinium- hydrochlorid	6 M
PD-Elutionslösung 12	SDS	1 % (w/v)
PD-Waschpuffer 1	NaCl	500 mM
	HEPES (pH 7,4)	20 mM
	Imidazol	1 mM
PD-Waschpuffer 2	NaCl	500 mM
	HEPES (pH 7,4)	20 mM
	Imidazol	5 mM
PD-Waschpuffer 3	NaCl	500 mM
	HEPES (pH 7,4)	20 mM
	Imidazol	10 mM
PD-Waschpuffer 4	NaCl	500 mM
	HEPES (pH 7,4)	20 mM
	Imidazol	20 mM
PD-Waschpuffer 5	NaCl	500 mM
	HEPES (pH 7,4)	20 mM
	EDTA	1 mM
PMSF-Lösung	PMSF	200 mM
	EtOH	
Pulldownpuffer	NaCl	500 mM
	HEPES (pH 7,4)	50 mM
	Tween 20	0,01 % (v/v)
Reaktionspuffer 1	NaCl	100 mM
	HEPES (pH 7,4)	50 mM
Reaktionspuffer 2	NaCl	500 mM
	HEPES (pH 7,4)	50 mM
TAE-Puffer	Tris	40 mM
	EDTA	1 mM
	Essigsäure	0,1 % (v/v)
TBS-T-Puffer	Tris (pH 7,6)	20 mM
	NaCl	150 mM
	Tween 20	0,1 % (v/v)
Transferpuffer	Tris	20 mM
	Glycin	200 mM
	MeOH	10 % (v/v)
TV-Alkylierunslösung	Iodacetamid	55 mM
	Ammoniumcarbonatlösung	
TV-Reduktionslösung	DTT	50 mM
	Ammoniumcarbonatlösung	
TV-Reaktionslösung	Trypsin in HCl (0,1 g·L ⁻¹) Ammoniumcarbonatlösung	0,01 g·L ⁻¹

Puffer/Lösung	Substanz	Konzentration
TV-Waschlösung 1	ACN	25 % (v/v)
	Ammoniumcarbonatlösung	
TV-Waschlösung 2	ACN	50 % (v/v)
	Ammoniumcarbonatlösung	

Tabelle 12: Alphabetische Liste der in dieser Arbeit verwendeten Medien und Medienadditive.

Medium/Additiv	Substanz	Konzentration	Hersteller	Firmensitz
Ampicillin-Stammlösung	Ampicillin H ₂ O	100 g·L ⁻¹		
Amp-Agarplatten	Bacto Agar Ampicillin LB-Medium	1,5 % (w/v) 100 mg·L ⁻¹	ZE-Bio MPI Dortmund	Dortmund, Deutschland
DMEM	Glukose stabiles Glutamin Natriumpyruvat NaHCO ₃	4,5 g·L ⁻¹ n.d. n.d. 3,7 g·L ⁻¹	PAN-Biotech GmbH	Aidenbach, Deutschland
FCS	Sera Plus, Special processed, Virus and mycoplasma tested	-	PAN-Biotech GmbH	Aidenbach, Deutschland
G418-Lösung	Gentamicinsulfat	50 g·L ⁻¹	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
Hams F12	L-Glutamin NaHCO ₃	n.d. 1,176 g·L ⁻¹	PAN-Biotech GmbH	Aidenbach, Deutschland
Kanamycin-Stammlösung	Kanamycin H ₂ O	100 g·L ⁻¹		
Kan-Agerplatten	Bacto Agar Kanamycin LB-Medium	1,5 % (w/v) 100 mg·L ⁻¹	ZE-Bio MPI Dortmund	Dortmund, Deutschland
LB-Medium	Bact. Tryp Yeast Extract NaCl H ₂ O	10 g·L ⁻¹ 5 g·L ⁻¹ 10 g·L ⁻¹	ZE-Bio MPI Dortmund	Dortmund, Deutschland
Mikroskopiermedium	Glukose stable Glutamin Natriumpyruvat HEPES Without Phenolred NaHCO ₃	4,5 g·L ⁻¹ n.d. n.d. 25 mM 0,5 G·L ⁻¹	PAN-Biotech GmbH	Aidenbach, Deutschland
NEAA's	MEM NEAA w/o: L-Glutamine	100 X	PAN-Biotech GmbH	Aidenbach, Deutschland
Opti-MEM	Opti-MEM (Reduced Serum Medium)	-	Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, Massachusetts, USA

Medium/Additiv	Substanz	Konzentration	Hersteller	Firmensitz
PBS-Puffer	Dulbecco`s Phosphate Buffered Salt Solution	-	PAN-Biotech GmbH	Aidenbach, Deutschland
Pen/Strep- Lösung	Penicillin Streptomycin	10000 U·mL ⁻¹ 10 g·L ⁻¹	PAN-Biotech GmbH	Aidenbach, Deutschland
SOC-Lösung 1	Trypton Yeast Extract NaCl KCl MgCl ₂ ·6 H ₂ O MgSO ₄ ·7 H ₂ O	20,83 g·L ⁻¹ 5,2 g·L ⁻¹ 0,6 g·L ⁻¹ 0,2 g·L ⁻¹ 2,11 g·L ⁻¹ 2,6 g·L ⁻¹	ZE-Bio MPI Dortmund	Dortmund, Deutschland
SOC-Lösung 2	Glucose	50 % (w/v)	ZE-Bio MPI Dortmund	Dortmund, Deutschland
SOC-Medium	SOC-Lösung 1 SOC-Lösung 2	960 mL 40 mL	ZE-Bio MPI Dortmund	Dortmund, Deutschland
TB-Lösung 1	Bact. Tryp Yeast Extract Glycerin H ₂ O	13,3 g·L ⁻¹ 26,6 g·L ⁻¹ 4,4 mL	ZE-Bio MPI Dortmund	Dortmund, Deutschland
TB-Lösung 2	KH ₂ PO ₄ K ₂ HPO ₄	23,1 g·L ⁻¹ 125,4 g·L ⁻¹	ZE-Bio MPI Dortmund	Dortmund, Deutschland
TB-Medium	TB-Lösung 1 TB-Lösung 2	900 mL 100 mL	ZE-Bio MPI Dortmund	Dortmund, Deutschland
Tetracyclin- Stammlösung	Tetracyclin	30 g·L ⁻¹		
Trypsinlösung	Trypsin EDTA PBS	0,05 % (w/v) 0,02 % (w/v) -	PAN-Biotech GmbH	Aidenbach, Deutschland
Zellkultur- medium 1	DMEM FCS NEAA	500 mL 50 mL 5 mL		
Zellkultur- medium 2	Hams F12 FCS NEAA	500 mL 50 mL 5 mL		
Zellkultur- medium 3	DMEM FCS NEAA G418-Lösung	500 mL 50 mL 5 mL 4 mL		
Zellkultur- medium 4	DMEM FCS NEAA G418-Lösung Pen/Strep-Lösung	500 mL 50 mL 5 mL 4 mL 5 mL		

5.1.6 Enzyme und Reagenzien

Tabelle 13: Alphabetische Liste der in dieser Arbeit verwendeten Enzyme und für sie benötigter Lösungen.

Enzym	Bezeichnung	Hersteller	Firmensitz
10x Ligationspuffer	T4 DNA Ligase Buffer (10X)	Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, Massachusetts, USA
10x Restriktionspuffer	FastDigest Buffer (10x)	Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, Massachusetts, USA
<i>AgeI</i>	FastDigest <i>BshTI</i>	Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, Massachusetts, USA
Alkalische Phosphatase	Fast-AP Thermosensitive Alkaline Phosphatase (1 U· μL^{-1})	Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, Massachusetts, USA
<i>BamHI</i>	FastDigest <i>BamHI</i>	Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, Massachusetts, USA
<i>DpnI</i>	FastDigest <i>DpnI</i>	Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, Massachusetts, USA
<i>EcoRI</i>	FastDigest <i>EcoRI</i>	Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, Massachusetts, USA
<i>HindIII</i>	FastDigest <i>HindIII</i>	Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, Massachusetts, USA
<i>NcoI</i>	FastDigest <i>NcoI</i>	Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, Massachusetts, USA
<i>NotI</i>	FastDigest <i>NotI</i>	Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, Massachusetts, USA
T4-Ligase	T4 DNA Ligase (5 U· μL^{-1})	Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, Massachusetts, USA
Taq-DNS-Polymerase	aTaq DNA-Polymerase 2.500u	Promega Corporation	Fitchburg, Wisconsin, USA
PCR Master Mix	Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix	Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, Massachusetts, USA

Enzym	Bezeichnung	Hersteller	Firmensitz
TEV-Protease	1–2 mg/mL 50mM HEPES 300mM NaCl 1mM TCEP 10% Glycerin	Dortmund Protein Facility	Dortmund, Deutschland
<i>XhoI</i>	FastDigest <i>XhoI</i>	Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, Massachusetts, USA

Tabelle 14: Alphabetische Liste der in dieser Arbeit verwendeten Reagenzien.

Puffer/Lösung	Substanz	Hersteller	Firmensitz
Lipofectamin	Lipofectamine® 2000 Transfection Reagent	Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, Massachusetts, USA
X-tremeGENE	X-tremeGENE Transfection Reagent	Roche Diagnostics Deutschland GmbH	Mannheim, Deutschland

5.1.7 Rekombinante Plasmidvektoren

Tabelle 15: Liste der in dieser Arbeit verwendeten Vektoren, mit Angabe der enthaltenen Zielproteine und Resistenzen sowie des benötigten Expressionssystems. ^{a)}: Für alle sieben Proteinvarianten, ^{b)}: Für die Proteinvarianten **P(WT)** und **P(C638)**, ^{c)}: Wurde nicht exprimiert; ^{d)}: Das Resistenzgen für Kanamycin in prokaryotischen Zellen entspricht dem für Gentamycin (G418) in eukaryotischen Zellen.

Vektor	Resistenz	Zielprotein	Expressionssystem	Hersteller
pGEX-4T1-P	Ampicillin	(GST-)P ^{a)}	E. coli BL21 gold (DE3)	Dr. G. Hahne, H. Salamon
pGEX-4T5-GFP	Ampicillin	(GST-)P- GFP ^{b),c)}	E. coli BL21 gold (DE3)	Dr. S. Hennig
pGEX-4T5-P-GFP	Ampicillin	(GST-)P- GFP ^{b),c)}	E. coli BL21 gold (DE3)	C. Stiller
pGEX-4T5-P- mCherry	Ampicillin	(GST-)P- Cherry ^{b)}	E. coli BL21 gold (DE3)	C. Stiller
pmCherry C1	Kanamycin ^{d)}	mCherry	Humane Zelllinien	Clontech
pmCherry-P	Kanamycin ^{d)}	mCherry-P ^{b)}	Humane Zelllinien	C. Stiller
pP-mCherry	Kanamycin ^{d)}	P-mCherry ^{b)}	Humane Zelllinien	C. Stiller
pYFP C1	Kanamycin ^{d)}	YFP ^{c)}	Humane Zelllinien	Clontech
pYFP N1	Kanamycin ^{d)}	YFP ^{c)}	Humane Zelllinien	Clontech
pYFP-P	Kanamycin ^{d)}	YFP-P ^{b),c)}	Humane Zelllinien	C. Stiller
pP-YFP	Kanamycin ^{d)}	P-YFP ^{b),c)}	Humane Zelllinien	C. Stiller
pEGFP C1	Kanamycin ^{d)}	eGFP	Humane Zelllinien	Clontech
pEGFP N1	Kanamycin ^{d)}	P-eGFP ^{c)}	Humane Zelllinien	Clontech
pEGFP-P	Kanamycin ^{d)}	eGFP-P ^{b)}	Humane Zelllinien	C. Stiller
pP-EGFP	Kanamycin ^{d)}	P-eGFP ^{b)}	Humane Zelllinien	C. Stiller
pmTurquoise2- α - tubulin	Kanamycin ^{d)}	mTurquoise2- α -Tubulin	Humane Zelllinien	Dr. Y. Wu

Vektor	Resistenz	Zielprotein	Expressionssystem	Hersteller
pmTurquoise2-P	Kanamycin ^{d)}	mTurquoise2- p ^{b)}	Humane Zelllinien	C. Stiller
pP-mTurquoise2	Kanamycin ^{d)}	P- mTurquoise2 ^{b)}	Humane Zelllinien	C. Stiller

5.1.8 Primer

Tabelle 16: Liste der in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide mit Angabe ihrer Sequenz, Länge, Schmelztemperatur und ihres Verwendungszwecks. Die Länge und Schmelztemperatur sind jeweils für den gesamten Primer und für seinen komplementären Bereich zu den Templatvektoren angegeben.

Primer	Sequenz	Länge	T _s / °C	Verwendung
CJ_P01	GATGCTCGAGGGGGTGTAAAG GAAAGGC	27/15	66/46	fw, P-Amplifizierung aus pGEX-4T1-P zur Insertion in: <ul style="list-style-type: none"> • pmCherry C1 • pYFP C1 • pEGFP C1
CJ_P02	GATGAAGCTTTCAACGCGACC TCCG	25/15	64/54	rw, P-Amplifizierung aus pGEX-4T1-P zur Insertion in: <ul style="list-style-type: none"> • pmCherry C1 • pYFP C1 • pEGFP C1
CJ_P03	GATGGAATTCACCATGGGTGT AAGGAAGGC	31/18	65/53	fw, P-Amplifizierung aus pGEX-4T1-P zur Insertion in: <ul style="list-style-type: none"> • pYFP N1 • pEGFP N1
CJ_P04	GATGGGATCCCCACGCGACC TCC	23/11	67/43	rw, P-Amplifizierung aus pGEX-4T1-P zur Insertion in: <ul style="list-style-type: none"> • pYFP N1 • pEGFP N1
CJ_P05	AGTCGGATCCGGTGTAAAGGA AAGGCTGGCACG	32/22	71/62	fw, P-Amplifizierung aus pGEX-4T1-P zur Insertion in: <ul style="list-style-type: none"> • pGEX-4T5-GFP fw, Sequenzierung pGEX-4T5
CJ_P06	AGTCCCATGGTACGCGACCT CCGTTTTTCTTCTAG	35/24	68/61	rw, P-Amplifizierung aus pGEX-4T1-P zur Insertion in: <ul style="list-style-type: none"> • pGEX-4T5-GFP

Primer	Sequenz	Länge	T _S / °C	Verwendung
CJ_P07	ATCCACCGGTCGCCACCATG GTGAGC	26/22	70/68	fw, Amplifizierung von: <ul style="list-style-type: none"> • mTurquoise2 (aus pmTurquoise2-α-tubulin) • mCherry (aus pmCherry C1) zur Insertion in <ul style="list-style-type: none"> • pKIX-YFP
CJ_P08	AGTCGCGGCCGCTGGACTTG TACAGCTCGTCCATGCCG	38/25	77/65	rw, Amplifizierung von: <ul style="list-style-type: none"> • mTurquoise2 (aus pmTurquoise2-α-tubulin) • mCherry (aus pmCherry C1) zur Insertion in pKIX-YFP
CJ_P09	ATCCACCGGTCGCCACCATG GTGAGC	26/22	70/68	fw, Amplifizierung von mTurquoise2 (aus pmTurquoise2- α -tubulin) zur Insertion in pYFP-KIX
CJ_P10	CCCCCTCGAGATCTGAGTCC GGAGGACTTGACAGCTCGT CCATGCCG	48/25	77/65	fw, Amplifizierung von mTurquoise2 (aus pmTurquoise2- α -tubulin) zur Insertion in pYFP-KIX
CJ_P11	CTAGAAGAAAAACGGAGGTC GCGTACCATGGTGAGCAAGG GCGAGGAGG	49/18	75/60	fw, Amplifizierung von mCherry (aus pmCherry C1) zur Insertion in pGEX-GST-KIX-GFP
CJ_P12	CGCTCGAGTCGACCCGGGAA TTCCTTGACAGCTCGTCCAT GCCG	45/22	77/61	fw, Amplifizierung von mCherry (aus pmCherry C1) zur Insertion in pGEX-GST-KIX-GFP
CJ_P13	CGCAAATGGGCGGTAGGCGT G	21	66	fw, Analytische Kolonie-Polymerasekettenreaktion des pmCherry-P-Vektors
CJ_P14	GATGAGTTTGGACAAACCAC	20	55	rw, Analytische Kolonie-Polymerasekettenreaktion des pmCherry-P-Vektors

Primer	Sequenz	Länge	T _s / °C	Verwendung
CJ_P15	ATGCCCATGGTGAGCAAGGG CGAGGAGG	28/18	71/60	fw, Analytische Kolonie-PCR von pGEX- 4T5-P-Cherry
CJ_P16	GCATGAATTCCTTGTACAGCT CGTCCATGCCG	22/32	68/61	rw, Analytische Kolonie-PCR von pGEX- 4T5-P-Cherry

5.1.9 *Escherichia Coli* Zelllinien

Tabelle 17: Liste der in dieser Arbeit verwendeten *E. coli* Zelllinien mit ihrem Genotyp und der Bezugsquelle.

Zelllinie	Genotyp	Bezugsquelle
One Shot® OmniMAX™ 2 T1R	<i>proAB+ lacIq lacZΔM15 Tn10(TetR)</i> <i>Δ(ccdAB)mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ 80(lacZ)</i> <i>ΔM15 Δ(lacZYA-argF) U169 endA1 recA1 supE44</i> <i>thi-1 gyrA96 relA1 tonA panD</i>	Invitrogen
DH5□	F- <i>φ80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF) U169 deoR recA1</i> <i>endA1 hsdR17 (rk-, mk+) phoA supE44 λ- thi-1</i> <i>gyrA96 relA1</i>	Invitrogen
BL21 gold (DE3)	<i>ompT hsdS(rB- mB-) dcm+ TetR gal λ(DE3) endA</i> Hte	Agilent Technologies

5.1.10 Humane Zelllinien

Tabelle 18: Liste der in dieser Arbeit untersuchten Zelllinien, ihres Ursprungsgewebes und ggf. der zugrunde liegenden Erkrankung, durch die diese Zelllinie entstanden ist. Auch das Zellkulturmedium, in dem die Zellen kultiviert wurden, ist angegeben. ^{a)} Diese Zelllinien wurden von der Arbeitsgruppe Hennig bezogen. ^{b)} Diese Zelllinien wurden im Verlauf dieser Arbeit erzeugt.

Zelllinie	Gewebe	Erkrankung
A549 ^{a)}	Lunge	Bronchialkarzinom
BJ ^{a)}	Vorhaut	-
DU145 ^{a)}	Prostata	Karzinom
HCT116 ^{a)}	Kolon	Karzinom
HeLa ^{a)}	Gebärmutter	Adenokarzinom
Hek293 ^{a)}	Niere	-
Hek293-mCherry ^{b)}	Niere	-
Hek293-mCherry-P(C638) ^{b)}	Niere	-
Hek293-mCherry-P(WT) ^{b)}	Niere	-
Hek293-P(C638)-mCherry ^{b)}	Niere	-
Hek293-P(WT)-mCherry ^{b)}	Niere	-
HepG2 ^{a)}	Leber	Hepatozelluläres Karzinom
HT29 ^{a)}	Kolon	Karzinom
MCF7 ^{a)}	Brust	Adenokarzinom

Zelllinie	Gewebe	Erkrankung
U2OS ^{a)}	Knochen	Osteosarkom
U373 ^{a)}	Gehirn	Glioblastom, Astrozytom
U87 ^{a)}	Gehirn	Glioblastom, Astrozytom

5.1.11 Software

Tabelle 19: Alphabetische Liste der in dieser Arbeit verwendeten Software. Software, die zur Funktion eines Gerätes essentiell ist, ist gemeinsam mit diesem aufgelistet (s. Tabelle 5).

Software	Hersteller	Firmensitz
AMBER14	University of California	San Francisco, Kalifornien, USA
ApE – A plasmid Editor vs.2.0.45	Sun Microsystems, Inc.	Santa Clara, Kalifornien, USA
Chem3D Pro vs. 15.1.0.144	PerkinElmer Informatics, Inc.	Waltham, Massachusetts, USA
ChemDraw Professional vs. 15.1.0.144	PerkinElmer Informatics, Inc.	Waltham, Massachusetts, USA
CorelDRAW Graphics Suite X5 vs. 15.2.0.686	Corel Corporation	Ottawa, Canada
Gaussian 09 Revision A.02	Gaussian, Inc.	Wallingford, Connecticut, USA
GraphPad Prism 5.0 for Windows	GraphPad Software	San Diego, California, USA
ImageJ 1.48q	National Institutes of Health	Bethesda, Maryland, USA
ImageLab vs. 6.2.1 Build 11	Bio-Rad Laboratories	Hercules, Kalifornien, USA
Maestro, vs. 9.7	Schrödinger, LLC	New York, New York, USA
MaxQuant software vs. 1.5.2.8	Computational Systems Biochemistry, Max-Planck-Institute of Biochemistry	Martinsried, Deutschland
ProtParam	SIB Swiss Institute of Bioinformatics	Lausanne, Schweiz
PyMOL 1.1eval.	DeLano Scientific LLC	Portland, Oregon, USA

Software	Hersteller	Firmensitz
R vs. 3.2.1	The R Foundation for Statistical Computing	-
SnapGene vs. 2.5	GSL Biotech LLC	Chicago, Illinois, USA
Xcalibur	Agilent Technologies	Santa Clara, California, USA
Zeiss LSM Image Browser vs. 4.2.0.121	Carl Zeiss Microimaging GmbH	Oberkochen, Deutschland

5.2 Methoden zur Plasmidmodifikation und -isolation

5.2.1 Herstellung chemisch kompetenter *Escherichia coli* Zellen

Für die Plasmidreplikation mussten kompetente *E. coli* Zellen verschiedener Zelllinien (Abschnitt 5.1.9) hergestellt werden. Es wurde ausschließlich mit chemisch kompetenten Zellen nach der Calciumchlorid-Methode gearbeitet, welche sich mit Hilfe des Hitzeschock-Verfahrens transformieren lassen.^{224–226}

Dazu wurde zunächst über Nacht eine Vorkultur aus 5 mL LB-Medium mit einem 50 μL Aliquot nicht-transformierter *E. coli* Zellen angeimpft und für ca. 15 Stunden bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Dabei wurde gegebenenfalls Antibiotikum hinzugefügt, um in den Zellen enthaltene Plasmide zu stabilisieren. Anschließend wurde diese Vorkultur mit frischem LB-Medium im Verhältnis 1:100 verdünnt und bei 37°C inkubiert bis sie nach etwa 3 Stunden bei 600 nm eine optische Dichte (OD_{600}) von 0,2 bis 0,4 aufwies. Die Zellen wurden für 10 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend bei 4°C und 4000 rcf für 10 Minuten zentrifugiert. Der Rückstand wurde in 40 mL einer kalten 0,1 M CaCl_2 -Lösung pro 100 mL Kulturvolumen resuspendiert und die Zellsuspension erneut für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (4°C, 4000 rcf, 10 Min.) wurde der Rückstand in einer gekühlten Mischung aus 4 mL 0,1 M CaCl_2 -Lösung und 0,5 mL Glycerin pro 100 mL Vorkultur resuspendiert und die Zellsuspension in 50 μL Aliquots aufgeteilt, in flüssigem Stickstoff schock gefroren und bis zur weiteren Verwendung bei –80°C gelagert.

5.2.2 Transformation chemisch kompetenter *Escherichia coli* Zellen

5.2.2.1 Transformation kompetenter *Escherichia coli* Zellen zur Plasmidreplikation

Zur Plasmidreplikation wurden *E. coli* DH5 α Zellen mit diesem transformiert. Dazu wurde 1 μL einer Plasmid-Lösung mit einer DNS-Konzentration von 200–400 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ mit 50 μL der Zellsuspension vermischt und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Mischung zur Hitzeschocktransformation für 1 Minute bei 42°C inkubiert und mit 1 mL 37°C warmem SOC-Medium aufgefüllt. Nach einer einstündigen Inkubation bei 37°C unter Schütteln wurden die Zellen bei 4000 rcf abzentrifugiert und 1 mL des Überstandes abgenommen. Der Zellrückstand wurde im verbliebenen Medium resuspendiert und auf eine

Agarplatte, die mit dem zur Selektion des Plasmids benötigtem Antibiotikum versetzt war, ausgestrichen. Nach Inkubation bei 37°C über Nacht wurde mit einzelnen Klonen auf dieser Platte weiter gearbeitet (Abschnitt 5.2.3).

5.2.2.2 Transformation kompetenter *Escherichia coli* Zellen mit Ligationsansätzen

Um aus einem Ligationsansatz Plasmide zu gewinnen, wurde dieser zunächst in *E. coli* DH5 α Zellen transformiert. Dazu wurden 10 μ L des Ligationsansatzes mit 50 μ L Zellsuspension vermischt. Anschließend wurde eine Hitzeschocktransformation durchgeführt (Abschnitt 5.2.2.1).

5.2.2.3 Transformation kompetenter *Escherichia coli* Zellen mit *in vivo*-Klonierungsansätzen

Um aus einer *in vivo*-Klonierung das korrekt ligierte Plasmid zu gewinnen, wurden *E. coli* Omnimax Zellen transformiert.^a Hierzu wurden 15 μ L der DNS-Mischung mit 100 μ L Zellsuspension vermischt, bevor eine Hitzeschocktransformation durchgeführt wurde (Abschnitt 5.2.2.1).

5.2.3 Plasmidpräparationen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Plasmide aus der pGEX-Familie von *Amersham* und die Plasmide pmCherry C1, pEGFP C1, pEGFP N1, pYFP C1 und pYFP N1 von *Clontech* sowie davon abgeleitete Plasmide verwendet. Die jeweiligen Antibiotika-Resistenzen sind der Tabelle 15 (Abschnitt 5.1.7) zu entnehmen, Vektorkarten aller Plasmide finden sich im Anhang (Abbildung A1 bis Abbildung A18).

5.2.3.1 Plasmidpräparation mittels Affinitätschromatographie

Für Plasmidpräparationen in kleinem Maßstab wurden geeignete chemisch kompetente Zellen transformiert (Abschnitt 5.2.2). Am nächsten Tag wurde von einem der erhaltenen Klone eine 5 mL-Kultur aus LB-Medium, das mit dem geeigneten Antibiotikum versetzt war (Tabelle 15), angeimpft. Alternativ konnte die Übernachtskultur mit Hilfe einer Glycerinkultur von *E. coli* DH5 α oder Omnimax Zellen (Abschnitt 5.2.12) angeimpft

^a *E. coli* Omnimax Zellen eignen sich besser für die Transformation von *in vitro*-Klonierungsansätzen als *E. coli* DH5 α Zellen, da in ihnen die Ligationseffizienz höher ist.²³³

werden. Dazu wurde mit Hilfe einer sterilen Pipettenspitze ein wenig gefrorene Kultur in die Übernachtskultur überführt. Nach Inkubation der Kultur bei 37°C unter Schütteln für 15 Stunden wurde diese Kultur in drei Schritten à 1,6 mL abzentrifugiert (10.000 rcf, 4°C, 3 Min.) und der erhaltene Zellrückstand nach Angaben des Herstellers zur Isolation der plasmidischen DNS mit Hilfe des QIAprep Spin Miniprep Kits verwendet.

5.2.3.2 Plasmidpräparation mittels Isopropanol-Fällung

Oftmals sind mittels Affinitätschromatographie gewonnene DNS-Präparationen (Abschnitt 5.2.3.1) nicht rein genug, um zur Transfektion humaner Zellen genutzt zu werden.²²⁷ Daher wurden die in humanen Zellen zu exprimierenden Vektoren mit Hilfe des QIAGEN Plasmid Midi Kits isoliert, welches als finalen Aufreinigungsschritt eine Isopropanolfällung verwendet. Hierzu wurden 100 mL LB-Medium mit dem Antibiotikum Kanamycin auf eine Konzentration von 100 µg·mL⁻¹ eingestellt und mit einer einzelnen *E. coli* DH5α Zellkolonie oder der zugehörigen Glycerinkultur (Abschnitt 5.2.12) des gewünschten sequenzierten Vektors angeimpft. Die Kultur wurde für ca. 15 Stunden bei 37°C unter Schütteln inkubiert und anschließend abzentrifugiert (3000 rcf, 4°C, 15 Min.). Danach wurde die Plasmidpräparation analog zur Anleitung des Herstellers durchgeführt und die DNS im letzten Schritt in ddH₂O gelöst.

5.2.4 Konzentrationsbestimmung von DNS mittels UV/Vis-Spektroskopie

Zur Bestimmung einer DNS-Konzentration wurden 1,0–2,0 µL der zu untersuchenden Proteinlösung mit Hilfe des Nanodrops[®] vermessen. Dieser berechnet den DNS-Gehalt einer Lösung mit Hilfe ihrer Absorption bei 260 nm und dem Lambert-Beer'schen Gesetz. Dabei entspricht eine Absorption von 1 a.u. einer Konzentration von 50 µg·mL⁻¹ doppelsträngiger DNS.²²⁸ Die Reinheit der DNS lässt sich dabei durch zusätzliche Messungen bei 230 nm und 280 nm und Untersuchung der Verhältnisse der Absorptionen bei den drei Wellenlängen abschätzen. Als frei von Proteinen und niedermolekularen Verunreinigungen gelten DNS-Proben mit einem A₂₆₀/A₂₈₀-Verhältnis von 1,7–2,0 und einem A₂₃₀/A₂₆₀-Verhältnis von 2,0–2,3.^{228,229} Erreichten die Proben diese Werte nicht, wurden sie verworfen.

5.2.5 Präparative Polymerasekettenreaktion

5.2.5.1 Amplifikation der Gensequenzen des Proteins **P** und seiner Cysteinvarianten

Für die Polymerasekettenreaktion wurde der Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix von *Thermo Scientific* verwendet. Als Template wurden in H₂O gelöste (**GST**-)**P**-codierende pGEX-4T1-Vektoren zugegeben. Die verwendeten Primer waren jeweils an ihrem 3'-Ende mit der im Vektor enthaltenen Zielprotein-Sequenz komplementär und enthielten am 5'-Ende Schnittstellen für die später zur Restriktions-Ligations-Klonierung (Abschnitt 5.2.8) verwendeten Restriktionsendonuklease. Alle Reaktionen wurden in 50 µL Ansätzen durchgeführt (Tabelle 20). Da für die unterschiedlichen Vektoren unterschiedliche Restriktionsschnittstellen gewählt wurden, wurden wässrige Lösungen verschiedener Primer (Tabelle 21) verwendet und für jeden Zielvektor eine eigene PCR durchgeführt. Nachdem alle Komponenten in einem 0,2 mL PCR-Reaktionsgefäß bei 4°C vermischt worden waren, wurde dieses im Thermozykler einem Temperaturprogramm unterzogen (Tabelle 22). Nach Abschluss der PCR wurden die Reaktionslösungen mit Hilfe einer analytischen Agarosegelelektrophorese (Abschnitt 5.2.6) untersucht und vor der weiteren Verwendung aufgereinigt (Abschnitt 5.2.7).

Tabelle 20: Pipettierschema zur Herstellung von Reaktionsansätzen zur Amplifikation der Gensequenzen der Proteinvarianten **P(WT)** und **P(C638)** mittels PCR. Je nach Konzentration des Templatvektors wurden unterschiedliche Wasservolumina benötigt, um die Reaktionslösung auf 50 µL einzustellen.

Lösung	Volumen / µL	Zielkonzentration	Startkonzentration
Mastermix	25,0	1	x
Templat	x	1	ng·µL ⁻¹
1. Primer	2,5	0,5	µM
2. Primer	2,5	0,5	µM
ddH ₂ O	20-x		

Tabelle 21: Primer, die für die Amplifikation der DNS der Proteinvarianten **P(WT)** und **P(C638)** verwendet wurden, um diese in die jeweils angegebenen Vektoren einzubringen. fw: forward; rw: rückwärts.

Primer	Sequenz	Richtung	Restriktions-schnittstelle	Zielvektor
CJ_P01	GATGCTCGAGGGGGTGTAAAGG AAAGGC	fw	<i>XhoI</i>	pP-mCherry
CJ_P02	GATGAAGCTTTCAACGCGACC TCCG	rw	<i>HindIII</i>	pP-mCherry
CJ_P01	GATGCTCGAGGGGGTGTAAAGG AAAGGC	fw	<i>XhoI</i>	pP-YFP
CJ_P02	GATGAAGCTTTCAACGCGACC TCCG	rw	<i>HindIII</i>	pP-YFP
CJ_P03	GATGGAATTCACCATGGGTGT AAGGAAAGGC	fw	<i>EcoRI</i>	pYFP-P
CJ_P04	GATGGGATCCCCACGCGACCT CC	rw	<i>BamHI</i>	pYFP-P
CJ_P01	GATGCTCGAGGGGGTGTAAAGG AAAGGC	fw	<i>XhoI</i>	pP-EGFP
CJ_P02	GATGAAGCTTTCAACGCGACC TCCG	rw	<i>HindIII</i>	pP-EGFP
CJ_P03	GATGGAATTCACCATGGGTGT AAGGAAAGGC	fw	<i>EcoRI</i>	pEGFP-P
CJ_P04	GATGGGATCCCCACGCGACCT CC	rw	<i>BamHI</i>	pEGFP-P
CJ_P05	AGTCGGATCCGGTGTAAAGGAA AGGCTGGCACG	fw	<i>BamHI</i>	pGEX-4T5-P-GFP
CJ_P06	AGTCCCATGGTACGCGACCTC CGTTTTTCTTCTAG	rw	<i>NcoI</i>	pGEX-4T5-P-GFP

Tabelle 22: Programm des Thermozyklers zur Amplifikation der Gensequenz der Proteine **P(WT)** und **P(C638)**. ^{a)}Die Hybridisierungstemperatur T_{Hyb} war jeweils abhängig vom verwendeten Primerpaar. CJ_P01+CJ_P02: $T_{Hyb} = 48^{\circ}\text{C}$; CJ_P03+CJ_P04: $T_{Hyb} = 62^{\circ}\text{C}$; CJ_P05+CJ_P06: $T_{Hyb} = 60^{\circ}\text{C}$.

Schritt	Zeit / Sek.	Temperatur / °C	Zyklusanzahl
Initiale Denaturierung	10	98	1
Denaturierung	1	98	
Hybridisierung	5	^{a)}	30
Elongation	5	72	
Finale Elongation	60	72	1
Lagerung	∞	4	1

5.2.5.2 Amplifikation der Gensequenzen für fluoreszierende Proteine

Um Vektoren für die Expression von Fusionsproteinen des Proteins **P** mit fluoreszierenden Proteinen (FPs) in humanen Zellen zu erhalten, wurden die Vektoren pYFP C1 und pYFP N1 zunächst mit der Gensequenz der Proteine **P(WT)** und **P(C638)** modifiziert (Abschnitt 5.2.5.1 und 5.2.8). Anschließend wurden basierend auf diesen Vektoren das FP mCherry *N*-terminal und das FP mTurquoise2 *N*- und *C*-terminal mit den beiden Proteinvarianten fusioniert. Hierzu mussten zunächst die für die beiden FPs codierenden DNS-Sequenzen mittels PCR aus bereits im Institut vorhandenen Plasmiden isoliert und dabei mit Schnittstellen für die gewünschten Restriktionsendonukleasen versehen werden.

Für die PCR wurde der Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix von *Thermo Scientific* verwendet. Als Template wurde für mCherry der Vektor pmCherry C1 verwendet, für mTurquoise2 der Vektor pmTurquoise2- α -tubulin. Die Primer waren jeweils an ihrem 3'-Ende mit der im Vektor enthaltenen Sequenz der FPs komplementär^a und enthielten am 5'-Ende Schnittstellen für die später zur Restriktions-Ligations-Klonierung (Abschnitt 5.2.8) verwendeten Restriktionsendonukleasen. Alle Reaktionen wurden in 50 μ L Ansätzen durchgeführt (Tabelle 23). Da für die unterschiedlichen Vektoren unterschiedliche Restriktionsschnittstellen gewählt wurden, wurden verschiedene Primer (Tabelle 24) verwendet und für jeden Zielvektor eine eigene PCR-Reaktion durchgeführt. Nachdem alle Komponenten in einem 0,2 mL PCR-Reaktionsgefäß bei 4°C vermischt worden waren, wurde dieses im Thermozykler einem Temperaturprogramm unterzogen (Tabelle 25). Nach Abschluss der Polymerasekettenreaktionen wurden diese mit Hilfe einer analytischen Agarosegelelektrophorese (Abschnitt 5.2.6) untersucht und vor der weiteren Verwendung aufgereinigt (Abschnitt 5.2.7).

^a pmTurquoise2 und pmCherry wurden vom selben Protein abgeleitet, wobei unterschiedliche Punktmutationen ihre unterschiedlichen Fluoreszenzeigenschaften hervorrufen. Am *C*- und *N*-Terminus ist ihre DNS-Sequenz noch immer identisch, sodass für beide Proteine dieselben Primer verwendet werden konnten.

Tabelle 23: Pipettierschema zur Herstellung von Reaktionsansätzen zur Amplifikation der Gensequenzen der fluoreszenten Proteine mCherry und mTurquoise2 mittels PCR. Je nach Konzentration des Templatvektors wurden unterschiedliche Wasservolumina benötigt, um die Reaktionslösung auf 50 μL einzustellen.

Lösung	Volumen / μL	Zielkonzentration	Startkonzentration
Mastermix	25,0	1	x
Templat	x	1	$\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$
1. Primer	2,5	0,5	μM
2. Primer	2,5	0,5	μM
ddH ₂ O	20-x		

Tabelle 24: Primer, die für die Amplifikation der Gensequenzen von mCherry und mTurquoise2 verwendet wurden, um diese in die jeweils angegebenen Vektoren einzubringen. fw: forward; rw: rückwärts.

Primer	Sequenz	Richtung	Restriktions-schnittstelle	Zielvektor
CJ_P07	CGCTACCGGTCGCCACCA TGGTGAGC	fw	<i>AgeI</i>	pP-mCherry
CJ_P08	CCCCCTCGAGATCTGAGT CCGGAGGACTTGTACAGC TCGTCCATGCCG	rw	<i>NotI</i>	pP-mCherry
CJ_P09	ATCCACCGGTCGCCACCA TGGTGAGC	fw	<i>AgeI</i>	pmTurquoise2- P
CJ_P10	AGTCGCGGCCGCTGGACT TGTACAGCTCGTCCATGC CG	rw	<i>XhoI</i>	pmTurquoise2- P
CJ_P07	CGCTACCGGTCGCCACCA TGGTGAGC	fw	<i>AgeI</i>	pP- mTurquoise2
CJ_P08	CCCCCTCGAGATCTGAGT CCGGAGGACTTGTACAGC TCGTCCATGCCG	rw	<i>NotI</i>	pP- mTurquoise2

Tabelle 25: Programm des Thermozyklers zur Amplifikation der Gensequenz von mCherry und mTurquoise2.

Schritt	Zeit / Sek.	Temperatur / °C	Zyklenanzahl
Initiale Denaturierung	10	98	1
Denaturierung	1	98	
Hybridisierung	5	62	30
Elongation	12	72	
Finale Elongation	60	72	1
Lagerung	∞	4	1

5.2.5.3 Amplifikation der Gensequenz von mCherry für eine *in vivo*-Klonierung

Für diese Polymerasekettenreaktion wurde der Vektor pmCherry C1 als Templat verwendet. Die benötigten Primer CJ_P11 und CJ_P12 sind an ihrem 3'-Ende komplementär zur Sequenz des mCherry und haben an ihrem 5'-Ende einen Überhang, der komplementär zum Zielvektor pGEX-4T5-P-GFP ist (Tabelle 27). Wässrige Lösungen dieser Primer und des Templats wurden mit dem Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix von *Thermo Scientific* zu 50 μL Reaktionslösungen angesetzt (Tabelle 26) und im Thermozykler einem Temperaturprogramm (Tabelle 28) unterzogen.

Tabelle 26: Pipettierschema zur Herstellung von Reaktionsansätzen zur Amplifikation der Gensequenz des fluoreszenten Proteins mCherry mittels PCR. Je nach Konzentration des Templatvektors wurden unterschiedliche Wasservolumina benötigt, um die Reaktionslösung auf 50 μL einzustellen.

Lösung	Volumen / μL	Zielkonzentration	Startkonzentration
Mastermix	25,0	1	x
Templat	x	1	$\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$
1. Primer	2,5	0,5	μM
2. Primer	2,5	0,5	μM
ddH ₂ O	20-x		

Tabelle 27: Primer, die für die Amplifikation der Gensequenz von mCherry im Rahmen der *in vivo*-Klonierung verwendet wurden, um diese in den jeweils angegebenen Vektor einzubringen. fw: forward; rw: rückwärts

Primer	Sequenz	Richtung	Restriktions-schnittstelle	Zielvektor
CJ_P11	CTAGAAGAAAAACGGAGG TCGCGTACCATGGTGAGC AAGGGCGAGGAGG	fw	<i>Nco</i> I (<i>in vivo</i> Klonierung)	pGEX-4T5- P-GFP
CJ_P12	CGCTCGAGTCGACCCGGG AATTCCTTGACAGCTCG TCCATGCCG	rw	<i>Eco</i> RI (<i>in vivo</i> Klonierung)	pGEX-4T5- P-GFP

Tabelle 28: Programm des Thermozyklers zur Amplifikation der Gensequenz von mCherry im Rahmen der *in vivo*-Klonierung.

Schritt	Zeit / Sek.	Temperatur / °C	Zyklenanzahl
Initiale Denaturierung	10	98	1
Denaturierung 1	1	98	
Hybridisierung 1	5	60	5
Elongation 1	12	72	
Denaturierung 2	1	98	
Hybridisierung 2	5	72	30
Elongation 2	12	72	
Finale Elongation	60	72	1
Lagerung	∞	4	1

5.2.6 Analytische Agarosegelelektrophorese

Nach jeder PCR wurde eine analytische Agarosegelelektrophorese (AGE) durchgeführt, um den Erfolg der Reaktion zu überprüfen. Dazu wurden von jedem Reaktionsansatz 5 μL entnommen, mit 1 μL 6x DNS-Probenpuffer vermischt und in einer horizontalen Gelelektrophoreseapparatur mit einem Gel aus 1%–iger Agaroselösung aufgetrennt. Zusätzlich wurden 6 μL des DNS-Größenstandards aufgetragen. Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proben (80 V, 400 mA, 40 Min., RT) wurden diese mit Hilfe der Fluoreszenz von interkaliertem GelRed-Farbstoff im UV-Transilluminator visualisiert.

5.2.7 Aufreinigung von Polymerasekettenreaktionsansätzen

5.2.7.1 *DpnI*-Verdau

Ein *DpnI*-Verdau wurde durchgeführt, um den Templatvektor einer Polymerasekettenreaktion zu hydrolysieren.^{230,231} Dazu wurde zur PRC-Lösung 1 μL der *DpnI*-Lösung zugegeben und die Lösung bei 37°C für 2 Stunden inkubiert.

5.2.7.2 PCR-Reinigungs-Kit

Nach dem *DpnI*-Verdau wurden die verwendeten Enzyme mit dem PCR-Reinigungskits aus der PCR-Reaktionslösung entfernt. Dabei wurde nach der Anleitung des Herstellers verfahren und das aufgereinigte PCR-Produkt am Ende mit 30 μL DNS-Elutionspuffer eluiert.

5.2.8 Restriktions-Ligations-Klonierungen

5.2.8.1 Endorestriktionsverdau

Der Restriktionsverdau jeder Probe erfolgte bei 37°C für 1–4 Stunden. Dabei wurden jeweils 3 µL des isolierten Plasmids und 20 µL des aufgereinigten Inserts verwendet und in 30 µL Reaktionsansätzen gearbeitet (Tabelle 29). Anschließend wurden die Restriktionsendonukleasen mittels Inkubation bei erhöhter Temperatur deaktiviert. Die optimale Temperatur und Zeit dieser Deaktivierung war dabei für jedes Enzym unterschiedlich, sodass jeweils die höhere Temperatur und die längere Inkubationszeit gewählt wurden (Tabelle 30).

Tabelle 29: Pipettierschemata für Restriktionsverdau von Plasmiden und Inserts.

Lösung	Plasmid Volumen / µL	Insert Volumen / µL
10x Restriktionspuffer	3	3
Restriktionsendonuklease 1	1	1
Restriktionsendonuklease 2	1	1
Alkalische Phosphatase fast-AP	1	-
DNS	3	20
ddH ₂ O	21	5

Tabelle 30: Liste der mittels Restriktion-Ligation hergestellten Zielvektoren. Die Startvektoren sowie das eingebrachte Geninsert sind ebenso angegeben wie die dazu benötigten Enzyme und die Bedingungen für deren Desaktivierung.

Zielvektor	Startvektor	Geninsert	Enzym	Desaktivierung	
				Zeit / Min.	T / °C
pGEX-4T5-P-GFP	pGEX-4T5-GFP	P	<i>Bam</i> HI	5	80
			<i>Nco</i> I	15	65
pmCherry-P	pmCherry C1	P	<i>Hind</i> III	10	80
			<i>Xho</i> I	5	80
pP-mCherry	pP-YFP	mCherry	<i>Age</i> I	5	80
			<i>Not</i> I	5	80
pYFP-P	pYFP C1	P	<i>Hind</i> III	10	80
			<i>Xho</i> I	5	80
pP-YFP	pYFP N1	P	<i>Bam</i> HI	5	80
			<i>Eco</i> RI	5	80
pEGFP-P	pEGFP C1	P	<i>Hind</i> III	10	80
			<i>Xho</i> I	5	80
pP-EGFP	pEGFP N1	P	<i>Bam</i> HI	5	80
			<i>Eco</i> RI	5	80
pmTurquoise2-P	pYFP-P	mTurquoise2	<i>Age</i> I	5	80
			<i>Xho</i> I	5	80
pP-mTurquoise2	pP-YFP	mTurquoise2	<i>Age</i> I	5	80
			<i>Not</i> I	5	80
alle	alle	-	fast-AP	5	75

5.2.8.2 Gelextraktion von DNS

Nach der Desaktivierung der Restriktionsendonukleasen wurden die Lösungen mittels Gelextraktion mit einem 1%-igem Agarosegel in der horizontalen Gelelektrophoreseapparatur aufgereinigt. Die Reaktionsansätze wurde mit 6 μ L 6x DNS-Probenpuffer vermischt und vollständig auf das Gel aufgetragen. Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proben (80 V, 400 mA, 120 Min., RT) wurden diese mit Hilfe der Fluoreszenz von interkaliertem GelRed auf einem UV-Transilluminator visualisiert. Die benötigten Banden ausgeschnitten, mit dem Gelextraktionskit nach Anleitung des Herstellers aufgereinigt und mit 30 μ L des enthaltenen DNS-Elutionspuffer eluiert.

5.2.8.3 Ligation

Um Vektoren mit den gewünschten Inserts zu modifizieren wurden 20 μ L Ligationsansätze verwendet (Tabelle 31). Da die hierzu verwendete T4-Ligase temperaturempfindlich ist,²³² wurden die Reaktionen auf Eis pipettiert, die Ligase zuletzt zugegeben und die

Reaktionslösung über Nacht bei 16°C inkubiert. Anschließend wurde die Ligase bei 65°C für 10 Minuten inaktiviert und eine Transformation mit dem Ligationsansatz durchgeführt (Abschnitt 5.2.2.2). Als Kontrolle für eine erfolgreiche Dephosphorylierung des Vektors während des Restriktionsverdau wurde jeweils eine Selbstligation ohne das Insert durchgeführt. In der Regel zeigte diese Kontrolle keine Klone auf der am Ende erhaltenen Agarplatte. Waren auf der Platte jedoch Klone zu sehen, wurde für die folgende analytische Polymerasekettenreaktion die Anzahl der untersuchten Kolonien erhöht (Abschnitt 5.2.10).

Tabelle 31: Pipettierschema für Ligationsansätze.

Lösung	Ligation Volumen / μL	Selbstligation Volumen / μL
10x Ligationspuffer	2	2
Vektor	2	2
Insert	2	0
T4-Ligase	1	1
ddH ₂ O	13	15

5.2.9 *In vivo*-Klonierung der pGEX-4T5-P-mCherry-Vektoren

5.2.9.1 Restriktionsverdau und Gelextraktion

Für eine *in vivo*-Klonierung musste nur das Zielplasmid mit Restriktionsendonukleasen analog zu allen anderen Restriktionsansätzen geschnitten werden (Abschnitt 5.2.8.1). Dazu wurde der Vektor pGEX-4T5-P-GFP verwendet und mit Hilfe der Restriktionsendonukleasen *EcoRI* und *NcoI* sowie der alkalischen Phosphatase fast-AP verdaut. Anschließend wurde eine Gelextraktion durchgeführt (Abschnitt 5.2.8.2).

5.2.9.2 Inkubation der DNS-Lösungen

Bei der *in vivo*-Klonierung ist keine Ligationsreaktion notwendig, da diese später in den transformierten *E. coli* Zellen stattfindet.²³³ Stattdessen wurden die Proben miteinander für 20 Minuten bei RT und anschließend für 10 Minuten auf Eis inkubiert, ehe mit ihnen *E. coli* Omnimax Zellen transformiert wurden (Abschnitt 5.2.2.3). Das gewählte Verhältnis betrug hierbei 100 ng Insert-DNS auf 1200 ng Vektor-DNS.

5.2.10 Analytische Polymerasekettenreaktion

Nachdem die Ansätze der Restriktions-Ligations- oder *in vivo*-Klonierungen in geeignete *E. coli* Zellen transformiert worden waren (Abschnitt 5.2.2), wurden einzelne der auf den Agarplatten erhaltenen *E. coli* Kolonien mit geeigneten Primern (Tabelle 32) in einer analytische PCR auf die Insertion des gewünschten Zielgens untersucht.

Tabelle 32: Für die analytische Kolonie-Polymerasekettenreaktion der einzelnen Plasmide verwendete Primer mit ihrer Sequenz und die Länge l_{DNS} des erhaltenen DNS-Fragments in Basenpaaren (bp).

Zielvektor	Primer	Sequenz	l_{DNS} / bp
pGEX-4T5-P-mCherry	CJ_P15	ATGCCCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGG	700
	CJ_P16	GCATGAATTCCTTGTACAGCTCGTCCATGCCG	
pGEX-4T5-P-GFP	CJ_P05	AGTCGGATCCGGTGTAAGGAAAGGCTGGCAC G	250
	CJ_P06	AGTCCCATGGTACGCGACCTCCGTTTTTCTTCT AG	
pEGFP-P	CJ_P01	GATGCTCGAGGGGGGTGTAAGGAAAGGC	500
	CJ_P13	GATGAGTTTGGACAAACCAC	
pP-EGFP	CJ_P03	GATGGAATTCACCATGGGTGTAAGGAAAGGC	120 0
	CJ_P14	GATGAGTTTGGACAAACCAC	
pmCherry-P	CJ_P01	GATGAAGCTTTCAACGCGACCTCCG	100 0
	CJ_P13	CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG	
pP-mCherry	CJ_P03	GATGGAATTCACCATGGGTGTAAGGAAAGGC	120 0
	CJ_P14	GATGAGTTTGGACAAACCAC	
pYFP-P	CJ_P01	GATGCTCGAGGGGGGTGTAAGGAAAGGC	500
	CJ_P13	GATGAGTTTGGACAAACCAC	
pP-YFP	CJ_P03	GATGGAATTCACCATGGGTGTAAGGAAAGGC	120 0
	CJ_P14	GATGAGTTTGGACAAACCAC	
pmTurquoise2-P	CJ_P01	GATGCTCGAGGGGGGTGTAAGGAAAGGC	500
	CJ_P13	CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG	
pP-mTurquoise2	CJ_P03	GATGGAATTCACCATGGGTGTAAGGAAAGGC	120 0
	CJ_P14	GATGAGTTTGGACAAACCAC	

Als Polymerase wurde hier die Taq-DNS-Polymerase verwendet. Zusätzlich zu den beiden Primern wurde daher zur Reaktionslösung noch der Taq-Polymerasepuffer, eine $MgSO_4$ -Lösung sowie eine dNTP-Mischung zugegeben (Tabelle 33).

Tabelle 33: Pipettierschema für die analytischen Kolonie-Polymerasekettenreaktion.

Lösung	Volumen / μL
Taq-Polymerasepuffer	1
MgSO ₄ -Lösung	0,8
dNTP-Mischung	1
1. Primer	1
2. Primer	1
Taq-DNS-Polymerase	0,5
ddH ₂ O	3,7
Templat-Lösung	1

Um die Templat-DNS aus den einzelnen Kolonien zu gewinnen, wurde ein Teil jeder Kolonie in 10 μL ddH₂O resuspendiert. Die erhaltene Zellsuspension wurde für 10 Minuten bei 95°C aufgekocht und anschließend abzentrifugiert (16.000 rcf, 4°C, 2 Min.). Vom Überstand wurde je 1 μL als Templatlösung für die Polymerasekettenreaktion verwendet. Im Anschluss wurde die Reaktionslösung einem Temperaturprogramm unterzogen (Tabelle 34).

Tabelle 34: Programm des Thermozyklers zur Amplifikation der Gensequenz des Proteins P zur Insertion in verschiedene Vektoren. ^{a)}Die Hybridisierungstemperatur T_{Hyb} war jeweils abhängig vom verwendeten Primerpaar. Es gilt Primer CJ_P15+CJ_P16: $T_{Hyb} = 60^\circ\text{C}$; CJ_P05+CJ_P06: $T_{Hyb} = 68^\circ\text{C}$; CJ_P01+CJ_P13: $T_{Hyb} = 59^\circ\text{C}$; CJ_P03+CJ_P14: $T_{Hyb} = 59^\circ\text{C}$. ^{b)}Die Zeit für die Elongation war von der Länge des amplifizierten DNS-Abschnittes abhängig. Pro 1 kb DNS wurde eine Elongationszeit von 60 Sek. verwendet.

Schritt	Zeit / Sek.	Temperatur / °C	Zyklusanzahl
Initiale Denaturierung	10	98	1
Denaturierung	1	98	
Hybridisierung	5	^{a)}	30
Elongation	^{b)}	72	
Finale Elongation	60	72	1
Lagerung	∞	4	1

War in einer Kolonie das gewünschte Insert enthalten, konnten die verwendeten Primer ein DNS-Fragment definierter Länge amplifizieren. Dieses ließ sich anschließend mit Hilfe einer analytischen AGE detektieren (Abschnitt 5.2.6).

5.2.11 Sequenzierungen

Alle Sequenzierungen wurden von der Firma *StarSeq GmbH* (Mainz, Deutschland) durchgeführt. Dazu wurden von den zu untersuchenden Plasmiden 400–700 ng DNS mit 10 pmol des benötigten Primers in 7 μ L ddH₂O angesetzt und eingeschickt. Die Ergebnisse wurden als reine Sequenz und als Sequenz-Chromatogramm erhalten und mit Hilfe der Software *ApE* oder *SnapGene* ausgewertet. Da von allen Vektoren mindestens ein Klon mit der exakt übereinstimmenden Sequenz gefunden wurde, wird auf die Darstellung und Diskussion der Sequenzierungsergebnisse verzichtet.

Tabelle 35: Für die Sequenzierungen der einzelnen Plasmide verwendete Primer mit ihrer Sequenz.

Zielvektor	Primer	Sequenz
pGEX-4T5-P-mCherry	CJ_P05	AGTCGGATCCGGTGTAAGGAAAGGCTGGCACG
	CJ_P06	AGTCCCATGGTACGCGACCTCCGTTTTTCTTCTAG
pGEX-4T5-P-GFP	CJ_P05	AGTCGGATCCGGTGTAAGGAAAGGCTGGCACG
	CJ_P06	AGTCCCATGGTACGCGACCTCCGTTTTTCTTCTAG
pEGFP C1	CJ_P13	CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG
	CJ_P14	GATGAGTTTGGACAAACCAC
pEGFP N1	CJ_P13	CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG
	CJ_P14	GATGAGTTTGGACAAACCAC
pEGFP-P	CJ_P13	CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG
	CJ_P14	GATGAGTTTGGACAAACCAC
pP-EGFP	CJ_P13	CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG
	CJ_P14	GATGAGTTTGGACAAACCAC
pmCherry-P	CJ_P13	CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG
	CJ_P14	GATGAGTTTGGACAAACCAC
pP-mCherry	CJ_P13	CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG
	CJ_P14	GATGAGTTTGGACAAACCAC
pYFP C1	CJ_P13	CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG
	CJ_P14	GATGAGTTTGGACAAACCAC
pYFP N1	CJ_P13	CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG
	CJ_P14	GATGAGTTTGGACAAACCAC
pYFP-P	CJ_P13	CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG
	CJ_P14	GATGAGTTTGGACAAACCAC
pP-YFP	CJ_P13	CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG
	CJ_P14	GATGAGTTTGGACAAACCAC
pmTurquoise2-P	CJ_P13	CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG
	CJ_P14	GATGAGTTTGGACAAACCAC
pP-mTurquoise2	CJ_P13	CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG
	CJ_P14	GATGAGTTTGGACAAACCAC

5.2.12 Glycerinkultur

Sobald von einem Vektor die Sequenz als korrekt identifiziert wurde, wurde von diesem eine Glycerinkultur in *E. coli* DH5 α oder Omnimax Zellen hergestellt. Dazu wurde eine Übernachtskultur von 2 mL LB-Medium mit dem geeigneten Antibiotikum versetzt und mit der gewünschten *E. coli* Kolonie angeimpft. Nach Inkubation für ca. 15 Stunden bei 37°C unter Schütteln wurden 1350 μ L dieser Kultur mit 450 μ L Glycerinlösung gründlich vermischt und die Zellen in flüssigem Stickstoff schock gefroren. Anschließend konnten die Zellen bei -80°C gelagert werden.

5.3 Techniken zur Expression, Isolation und Analyse von Proteinen

5.3.1 Expression und Isolation der Proteinvarianten

5.3.1.1 Transformation

Zunächst wurden *E. coli* BL21 gold (DE3) Zellen mit dem benötigten Vektor transformiert (Abschnitt 5.2.2.1).

5.3.1.2 Testexpression

Für eine Testexpression wurde eine 5 mL LB-Kultur mit $100 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ Ampicillin hergestellt und mit *E. coli* BL21 gold (DE3) Zellen, die mit dem gewünschten Vektor transformiert worden waren, angeimpft. Anschließend wurde die Kultur bis zu einer OD_{600} von 0,4–0,6 bei 37°C unter Schütteln inkubiert und dann eine Probe für eine SDS-PAGE entnommen. Hierzu wurden $20 \mu\text{L}$ der Kultur mit $5 \mu\text{L}$ 5x SDS-Probenpuffer vermischt und bei 95°C für 5 Minuten denaturiert. Danach wurde die Kultur mit einer Isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranosid- (IPTG-)Lösung auf eine Konzentration von 0,2 mM IPTG eingestellt und für weitere 24 Stunden bei 37°C inkubiert ehe erneute eine Probe für die SDS-PAGE entnommen wurde. Anschließend wurden die Proben auf einem 17%–igen SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt (Abschnitt 5.3.5.2) und mit Coomassie angefärbt (Abschnitt 5.3.5.4).

5.3.1.3 Große Expressionskultur

Zur Expression der Proteine wurden 2,5 L Kulturen aus mit Ampicillin ($100 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) versetztem TB-Medium verwendet. Diese wurden bei RT angesetzt und durch Abspülen der zuvor hergestellten Agarplatte angeimpft (Abschnitt 5.3.1.1). Die Kultur wurde bei 37°C inkubiert bis sie eine OD_{600} von 0,6–0,8 erreicht hatte. Anschließend wurde die Kultur auf 20°C gekühlt und mit einer IPTG-Lösung induziert, sodass eine finale Konzentration von 0,2 mM IPTG erreicht wurde. Die eigentliche Expression erfolgte dann bei 20°C für 15 Stunden. Anschließend wurde die Kultur durch Zentrifugation (4000 rcf, 4°C , 10 Min.) abgeerntet, in 30 mL Lysepuffer resuspendiert und bei -80°C gelagert.

5.3.1.4 Zellaufschluss

Für den Zellaufschluss wurde der Zellrückstand mit Lysepuffer auf 100 mL Gesamtvolumen aufgefüllt. Dieser Suspension wurde eine Phenylmethylsulfonylfluorid- (PMSF-)Lösung zugegeben, sodass eine finale PMSF-Konzentration von 2 mM vorlag. Zudem wurde etwas DNase zugegeben und die Suspension wurde in einem Disperser gerührt bis keine Klumpen mehr vorlagen. Anschließend wurden die Zellen aufgebrochen, indem sie dreimal durch einen Mikrofluidizer prozessiert wurden. Danach wurde das Lysat zentrifugiert (70000 rcf, 4°C, 1 Std.), um die löslichen Proteine von Membranresten und genomischer DNS abzutrennen.

5.3.1.5 Glutathion-Affinitätschromatographie

Der im Zellaufschluss erhaltene Überstand wurde mittels GSH-Affinitätschromatographie aufgereinigt. Hierfür wurde die 30 mL Glutathion-Säule des Affinitätschromatographen verwendet. Diese Säule wurde mit 2 Säulenvolumen (SV) ddH₂O und anschließend 5 SV Lysepuffer equilibriert, ehe das Lysat mit einer Flussgeschwindigkeit von 1 mL·Min.⁻¹ aufgetragen wurde. Anschließend wurde die Säule mit 10 SV Lyse- und 5 SV Gelpermeationspuffer gespült. Zur Elution des Zielproteins wurden 50 mL des Gelpermeationspuffers auf eine GSH-Konzentration von 20 mM eingestellt^a und mit 1 mL·Min.⁻¹ über die Säule geleitet. Das Eluat wurde in 5 mL Fraktionen gesammelt, deren Proteingehalt mittels UV/Vis-Messung bestimmt wurde. Alle Fraktionen, die eine Proteinkonzentration über 0,01 mg·mL⁻¹ enthielten, wurden vereinigt und für die weitere Aufreinigung des Zielproteins verwendet.

5.3.1.6 TEV-Protease Verdau

Das Eluat der Glutathion-Affinitätssäule wurde mit der laut Anleitung des Herstellers benötigten Menge an TEV-Protease-Lösung versetzt und bei 12°C unter langsamem Invertieren am Rotator (2 rpm) über Nacht inkubiert. Anschließend wurde die Lösung abzentrifugiert (4000 rcf, 4°C, 5 Min.), um während der Inkubation aggregiertes Protein zu entfernen.

^a Hierbei ist es wichtig, anschließend den pH-Werte des erhaltenen GSH-Elutionspuffers zu überprüfen, da GSH eine Carboxylgruppe besitzt, welche u. U. den pH-Wert verändern kann.

5.3.1.7 SDS-PAGE zur Kontrolle der Affinitätschromatographie

Um die Expression und Aufreinigung der Zielproteine mittels GSH-Affinitätschromatographie und TEV-Protease Verdau zu überprüfen wurden von Lösungen aus den einzelnen Arbeitsschritten Proben genommen und für eine SDS-PAGE vorbereitet (Tabelle 36). Nachdem die so hergestellten Proben für 5 Minuten bei 95°C aufgeköcht worden waren, wurden je 10 µL pro Bahn auf ein 17%–iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen (Abschnitt 5.3.5.2). Exemplarische Gele sind im Anhang dargestellt (Abbildung A19 bis Abbildung A25a).

Tabelle 36: Zusammensetzung der Proben für eine SDS-PAGE zur Kontrolle der Proteinexpression und -aufreinigung mittels GST-Affinitätschromatographie.

Lösung	V _{Lösung} / µL	V _{SDS-Probenpuffer} / µL	V _{Wasser} / µL
Gesamtlysat	10	10	30
Überstand	10	10	30
Durchfluss	10	10	30
Waschlösung	80	20	0
Eluat	20	8	12
TEV-Protease Verdau	20	8	12

5.3.1.8 Gelpermeationschromatographie

Für die Gelpermeationschromatographie musste die Proteinlösung zunächst auf 1–2 mL verringert werden. Dazu wurden 15 mL Amicons[®] mit einem zur Proteingröße passenden Molekulargewichtsgrenzwert (*MWCO*; *MWCO* = 3 kDa für Proteinvarianten, *MWCO* = 10 kDa für Zielprotein-mCherry-Fusionsproteine) verwendet, die mit Gelpermeationspuffer equilibriert worden waren. Nachdem das gewünschte Volumen erreicht war, wurde mittels UV/Vis-Spektroskopie die enthaltene Proteinmenge bestimmt (Abschnitt 5.3.3), um eine geeignete Gelpermeationssäule auszuwählen. Bei Proteinmengen über 100 mg wurde die große Gelpermeationssäule verwendet, bei Proteinmengen darunter die kleine Gelpermeationssäule des Flüssigkeitschromatographen. Beide Säulen wurden zunächst mit je einem Säulenvolumen (144 mL bzw. 350 mL) Gelpermeationspuffer equilibriert, ehe das Proteingemisch aufgetragen und mit einer Flussgeschwindigkeit von 1 mL·Min.⁻¹ eluiert wurde. Dabei wurden automatisch Fraktionen von je 2 mL für die kleine Säule und 5 mL für die große Säule gesammelt, während die eluierende Lösung mit Hilfe eines UV/Vis-Detektors bei 210 nm analysiert wurde. Aus dem erhaltenen Chromatogramm ließen sich die Fraktionen ermitteln, in denen das Zielprotein von der Säule eluierte.

5.3.1.9 SDS-PAGE zur Kontrolle der Gelpermeationschromatographie

Zur Kontrolle der Reinheit der in der Gelpermeation gesammelten proteinenthaltenen Fraktionen wurde erneut eine SDS-PAGE durchgeführt. Dazu wurden von jeder Fraktion 20 μL entnommen und mit 5 μL 5x SDS-Probenpuffer versetzt. Nachdem die Proben für 5 Minuten bei 95°C aufgeköcht worden waren, wurden von ihnen +je 10 μL auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Für die Kontrolle der nicht-fusionierten Proteinvarianten wurden 17%–ige denaturierende SDS-Polyacrylamidgele verwendet, während die mCherry-Fusionsproteine mit 12%–igen Gelen analysiert wurden (Abschnitt 5.3.5.2, Abbildung A19 bis Abbildung A26b).

5.3.1.10 Reverse Affinitätschromatographie

Falls in der SDS-PAGE zur Kontrolle der Gelpermeationschromatographie (Abschnitt 5.3.1.9) noch freier GST-Tag oder GST-Fusionsprotein in den Fraktionen des aufgereinigten Zielproteins sichtbar war, wurden diese Verunreinigungen über eine reverse GST-Affinitätschromatographie entfernt. Dafür wurde die Proteinlösung mit einer Flussgeschwindigkeit von $1 \text{ mL} \cdot \text{Min}^{-1}$ über die 5 mL GSH-Säule des Affinitätschromatographen gespült. Um kein Protein im Totvolumen der Säule zu verlieren wurde anschließend mit 10 mL Gelpermeationspuffer nachgespült.

5.3.1.11 Vergleichende SDS-PAGE aller Proteinvarianten

Von jedem Protein wurde eine Probe mit 0,5 μg Proteingehalt hergestellt, vollständig auf ein 17%–iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt (Abschnitt 5.3.5.2). Das Gel wurde anschließend mit einer Coomassie-Färbelösung angefärbt (Abschnitt 5.3.5.4).

5.3.2 Expression und Isolation von mCherry-Fusionsproteinen

Im Folgenden sind nur die Arbeitsschritte aufgeführt, die sich von der Aufreinigung der unfusionierten Proteinvarianten unterscheiden (Abschnitt 5.3.1).

5.3.2.1 TEV-Protease Verdau und Dialyse

Das Eluat der Glutathion-Affinitätssäule wurde mit der laut Anleitung des Herstellers benötigten Menge an TEV-Protease-Lösung versetzt und bei 12°C unter langsamem Rühren in zwei Dialysekassetten gegen 5 L Gelpermeationspuffer dialysiert. Nach 2 Stunden wurde

der Gelpermeationspuffer erneuert und die Lösung über Nacht inkubiert. Anschließend wurde die Proteinlösung abzentrifugiert (4000 rcf, 4°C, 5 Min.), um während der Inkubation aggregiertes Protein zu entfernen.

5.3.2.2 Reverse Maltose-Affinitätschromatographie

Für die reverse Maltose-Affinitätschromatographie zur Abtrennung der TEV-Protease wurde die 5 mL Maltose-Säule des Affinitätschromatographen zunächst mit 5 SV H₂O und 5 SV Gelpermeationspuffer mit einer Flussrate von 5 mL·Min.⁻¹ equilibriert bevor die abzentrifugierte Lösung des TEV-Protease Verdau mit einer Flussrate von 1 mL·Min.⁻¹ über sie geleitet wurde. Anschließend wurde mit 2 SV Gelpermeationspuffer (1 mL·Min.⁻¹) nachgespült, um kein Protein im Totvolumen der Säule zu verlieren. Da mCherry-enthaltende Lösungen lila gefärbt sind, wurde der Durchfluss gesammelt bis keine Färbung mehr erkannt werden konnte.

5.3.2.3 Erste reverse GSH-Affinitätschromatographie

Da in der Proteinlösung noch die gesamte GST vorlag, die in der normalen GSH-Affinitätschromatographie isoliert worden war, wurde für die erste reverse GSH-Affinitätschromatographie ebenfalls die 25 mL GSH-Säule verwendet. Hierzu wurde die Säule zunächst mit 5 SV Gelpermeationspuffer bei einer Flussrate von 1 mL·Min.⁻¹ equilibriert. Anschließend wurde der Durchfluss der reversen Maltosesäule über die Säule geleitet (0,5 ml·Min.⁻¹) und mit Gelpermeationspuffer gespült bis im Eluat keine Färbung des mCherry mehr detektiert werden konnte.

5.3.2.4 SDS-PAGE zur Kontrolle der Affinitätschromatographie

Um die Expression und Aufreinigung der Zielproteine mittels GSH-Affinitätschromatographie, TEV-Protease Verdau und beider reversen Affinitätssäulen zu überprüfen, wurden von Lösungen aus den einzelnen Aufreinigungsschritten Proben genommen und für eine SDS-PAGE vorbereitet (Tabelle 37). Nachdem die Proben für 5 Minuten bei 95°C aufgeköcht worden waren, wurden von ihnen 10 µL auf ein 12%-iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen (Abschnitt 5.3.5.2). Dieses ist im Anhang dargestellt (Abbildung A26a).

Tabelle 37: Zusammensetzung der Proben für eine SDS-PAGE zur Kontrolle der Proteinexpression und -aufreinigung mittels GSH-Affinitätschromatographie, sowie TEV-Protease Verdau, reverser Maltose- und GSH-Affinitätschromatographie.

Lösung	V _{Lösung} / μL	V _{SDS-Probenpuffer} / μL	V _{Wasser} / μL
Gesamtlysat	10	10	30
Überstand	10	10	30
Durchfluss	10	10	30
Waschlösung	80	20	0
Eluat	20	8	12
TEV-Protease Verdau	20	8	12
Durchfluss Maltose-Säule	20	8	12
Durchfluss GSH-Säule	20	8	12

5.3.3 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen mittels UV/Vis-Spektroskopie

Zur Bestimmung einer Proteinkonzentration wurden 1,0–2,0 μL der zu untersuchenden Proteinlösung mit Hilfe des Nanodrops[®] vermessen. Bei Proteingemischen wurde angenommen, dass eine Absorption von 1 a.u. einer Konzentration von $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ entsprach. Um die Konzentration eines aufgereinigten Proteins zu bestimmen, wurden zunächst sein molarer dekadischer Extinktionskoeffizient ϵ_{280} bei $\lambda = 280 \text{ nm}$ und sein Molekulargewicht M mit Hilfe des Programmes *ProtParam* berechnet (Tabelle 38). Der Nanodrop[®] berechnet den Proteingehalt einer solchen Lösung mit Hilfe ihrer Absorption bei der Wellenlänge $\lambda = 280 \text{ nm}$ und einem modifizierten Lambert-Beer'schen Gesetz (Formel 1) und gibt die Massenkonzentration c_m des Proteins aus.

$$c_m = \frac{A_{280} \cdot M}{\epsilon_{280} \cdot d} \quad (1)$$

mit c_m : Massenkonzentration des untersuchten Proteins; A_{280} : Absorption der Proteinlösung bei der Wellenlänge $\lambda = 280 \text{ nm}$; M : Molekulargewicht des untersuchten Proteins; ϵ_{280} : Molarer dekadischer Extinktionskoeffizient des untersuchten Proteins bei 280 nm ; d : Schichtdicke der untersuchten Probe.

Da sich die **P-mCherry**-Fusionsproteine nicht vollständig aufreinigen ließen, wurde ihre Konzentration mit Hilfe der Absorption von mCherry bei $\lambda = 587 \text{ nm}$ ermittelt. Dazu wurde die Funktion „*Proteins and Labels*“ des Nanodrops[®] verwendet, mit der sich molare Konzentrationen bestimmen lassen, wenn der molare dekadische Extinktionskoeffizient ϵ bei der untersuchten Wellenlänge angegeben wird ($\epsilon_{587}(\text{mCherry}) = 72.000 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).⁵³

Tabelle 38: Mit Hilfe des Programmes *ProtParam* berechnete Molekulargewichte M und molare dekadische Extinktionskoeffizienten ϵ_{280} der verwendeten Proteine bei $\lambda = 280$ nm.

Protein	$M / \text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$	$\epsilon_{280} / \text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$
P(WT)	10477,9	12950
P(C626)	10452,0	12950
P(C630)	10510,0	12950
P(C634)	10452,9	12950
P(C638)	10466,0	12950
P(C642)	10494,0	12950
P(C648)	10452,0	12950
P(WT)-mCherry	37691,7	47330
P(C638)-mCherry	37679,7	47330

5.3.4 Lagerung der Proteine

Nach dem finalen Aufreinigungsschritt der einzelnen Protein- und Protein-mCherry-Varianten wurden diese mit einem 5 mL Amicon mit dem passenden Molekulargewichtsgrenzwert ($MWCO = 3$ kDa für Proteinvarianten, $MWCO = 10$ kDa für Protein-mCherry-Varianten) aufkonzentriert. Anschließend wurden alle Proteine in flüssigem Stickstoff schock gefroren und bei -80°C gelagert.

5.3.5 Polyacrylamidgelelektrophorese

Da die Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) eine Standardmethode zur Proteinanalyse ist, wurde diese im Rahmen dieser Dissertation in verschiedenen Varianten durchgeführt. Hier wird nur kurz die allgemeine Zusammensetzung der verwendeten Gelsysteme für native und denaturierende SDS-PAGE sowie die verschiedenen angeschlossenen Detektionsmethoden erläutert. Die Probenvorbereitung und Durchführung der PAGE sind in den einzelnen Experimenten erläutert.

5.3.5.1 Native PAGE

Für die native PAGE wurde das Tris/Glycin-Polyacrylamidgelsystem nach Ornstein und Davis verwendet.²³⁴ Von dieser Gelart wurden 10%- oder 12%-ige Trenngele mit einer Gelstärke von 1 mm verwendet, die mit einem 4%-igen Sammelgel überschichtet wurden (Tabelle 39). Für die Elektrophorese dieser Gele wurde gekühlter 1x nativer Laufpuffer verwendet und die vertikale Elektrophoreseapparatur mit einem Eisbad gekühlt.

Tabelle 39: Zusammensetzung von nativen Polyacrylamidgelen nach Ornstein und Davis.²³⁴

Sammelgel (4%)		
Acrylamidlösung (30%)	1,28 mL	
nativer Sammelgelpuffer (4x)	0,96 mL	
H ₂ O	5,6 mL	
APS-Lösung (10%)	80 µL	
TEMED	8 µL	
Trenngele		
	10%	12%
Acrylamidlösung (30%)	3,3 mL	4,0 mL
nativer Trenngelpuffer (2x)	5,0 mL	5,0 mL
H ₂ O	1,5 mL	0,8 mL
APS-Lösung (10%)	100 µL	100 µL
TEMED	10 µL	10 µL

5.3.5.2 Denaturierende SDS-PAGE

Für die denaturierende PAGE wurde das Tris/Tricin-Polyacrylamidgelsystem nach Schägger und Jagow verwendet,¹⁶¹ dem SDS als denaturierendes Agens zugegeben wurde. Dieses Gelsystem eignet sich besonders zur Auftrennung von Proteinen mit einem Molekulargewicht zwischen 5 kDa und 20 kDa. Doch auch größere Proteine (< 100 kDa) lassen sich damit gut auftrennen, sofern der Acrylamidgehalt des Gels korrekt eingestellt wird. Somit deckt dieses Gelsystem alle in dieser Arbeit untersuchten Proteine ab. Alle SDS-Polyacrylamidgele wurden mit einer Gelstärke von 1 mm verwendet und bestanden aus Sammel- und Trenngel (Tabelle 40). Für die Elektrophorese wurde 1x Kathodenpuffer in das innere Reservoir der Elektrophoreseapparatur gefüllt und 1x Anodenpuffer in das äußere Reservoir. Die Elektrophorese erfolgte in der vertikalen Elektrophoreseapparatur bei RT.

Tabelle 40: Zusammensetzung von denaturierenden SDS-Polyacrylamidgelen nach Schägger und Jagow.¹⁶¹

Sammelgel					
Acrylamidlösung (30%)	0,5 mL				
SDS-Gelpuffer (4x)	0,38 mL				
H ₂ O	2,1 mL				
APS-Lösung (10%)	100 µL				
TEMED	10 µL				
Trenngele					
	10%	12%	15%	17%	20%
Acrylamidlösung (30%)	3,2 mL	3,9 mL	4,9 mL	5,5 mL	6,5 mL
SDS-Gelpuffer (4x)	2,5 mL	2,5 mL	2,5 mL	2,5 mL	2,5 mL
H ₂ O	3,9 mL	3,2 mL	2,2 mL	1,6 mL	0,6 mL
APS-Lösung (10%)	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL
TEMED	10 µL	10 µL	10 µL	10 µL	10 µL

5.3.5.3 Fluoreszenzdetektion in Polyacrylamidgelen

Polyacrylamidgele wurden zur Detektion der enthaltenen Fluorophore auf einem Fluoreszenzscanner visualisiert, wobei entweder die Fluoreszenz von mit FITC-markierten Liganden oder die des Proteins mCherry detektiert wurde. Zur Detektion von FITC wurde mit dem blauen Laser ($\lambda = 488 \text{ nm}$) angeregt. Die Emission wurde mit Hilfe eines *short pass* Filters (526 SP) auf den Bereich oberhalb von $\lambda = 526 \text{ nm}$ selektiert. Für die Detektion der intrinsischen mCherry-Fluoreszenz wurden native Gele mit dem grünen Laser ($\lambda = 532 \text{ nm}$) angeregt und die Emission mit Hilfe eines *band pass* Filters (580 BP 30) auf den Bereich $\lambda = 550\text{--}610 \text{ nm}$ selektiert. Die Spannung der detektierenden Photodiode wurde je nach Intensität der Proben variiert. Für eine schnelle Überprüfung der Gele wurde mit einer Pixelgröße von $1000 \mu\text{m}$ gearbeitet, während finale Messungen mit einer Pixelgröße von $50 \mu\text{m}$ aufgenommen wurden. Da die Gele in den umgebenden Glasplatten vermessen wurden, wurde die Fokusebene des Scanners auf 3 mm gesetzt.

5.3.5.4 Färbung von Gelen mit einer Coomassie Färbelösung

Die Gelfärbung mit Hilfe von Coomassie-Farbstoffen ist eine der am häufigsten genutzten Färbemethoden für Proteine.^{235,236} Dazu werden die Proteine in der Gelmatrix fixiert, gefärbt und die Hintergrundfärbung der Gelmatrix entfernt.²³⁶ Das Detektionslimit der klassischen Coomassie-Färbung liegt etwa bei $50\text{--}100 \text{ ng}$ und ist stark vom Gehalt an basischen

Aminosäuren in einem Protein abhängig, da sich die verwendeten Triphenylmethan-Farbstoffe bevorzugt dort anlagern.²³⁵

Zur Färbung von Polyacrylamidgelen mit Coomassie wurden diese aus den Glasplatten entnommen und in einem Plastikbehälter für 2 Minuten mit der Coomassie-Färbelösung in der Mikrowelle erhitzt. Anschließend wurden sie für 20 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt, bevor die Färbelösung durch die Entfärbelösung ersetzt wurde. Diese wurde für 2 Minuten in der Mikrowelle erhitzt und für 20 Minuten auf dem Gel belassen, ehe sie gegen frische Lösung ausgetauscht wurde. Sobald das Gel ausreichend entfärbt war, wurde es mit Hilfe des Durchlichtscanners detektiert und ggf. in Wasser gelagert bis es weiter verwendet wurde.

5.3.5.5 Färbung von Gelen mittels Zink-Imidazol-Färbung

Bei der Zink-Imidazol-Färbung wird nicht das im Gel enthaltene Protein angefärbt, sondern Zink-Imidazol-Komplexe mit Hilfe von SDS in der umgebenden Gelmatrix eingelagert. Diese bekommt dadurch eine matt-weiße Färbung, während die Proteinbanden ungefärbt bleiben. Diese Gele werden vor einem dunklen Hintergrund visualisiert.²³⁷ Das Detektionslimit dieser Färbung liegt etwa bei 2 ng, sodass mit dieser Methode i. d. R. geringere Proteinmengen nachgewiesen werden können als bei der Coomassie-Färbung.²³⁸ Da die Gelmatrix und nicht die Proteine gefärbt werden, ist die Detektion unabhängig vom Aminosäuregehalt der Proteine. Zudem kann ein mittels Zink-Imidazol gefärbtes Gel durch Inkubation in Zink-komplexierenden Puffern entfärbt werden.

Die Zink-Imidazol-Färbung wurde mit Hilfe des SERVASnow Staining Kits durchgeführt. Zur Visualisierung wurden die Gele mit dem Durchlichtscanners vor einem schwarzen Hintergrund aufgenommen. Anschließend wurde das Gel entfärbt, indem es für 10 Minuten in 15 mL Mobilisierungspuffer inkubiert wurde. Dieser musste teilweise gewechselt werden, um eine vollständige Entfärbung zu erreichen. Das entfärbte Gel konnte ggf. weiter verwendet.

5.3.6 Western Blot Analyse von SDS-Polyacrylamidgelen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Western Blot Analysen²³⁹ von SDS-Polyacrylamidgelen für die Expressionskontrolle der Hek293-Zellen und zur Detektion einiger Pulldown-Experimente verwendet. Hier wird nur das allgemeine Verfahren beschrieben, während die Probenvorbereitung in den entsprechenden Abschnitten erläutert wird.

5.3.6.1 Elektroelution von Proteinen

Nachdem die für den Western Blot benötigten SDS-Polyacrylamidgele aus ihren Glasplatten entfernt und mit ddH₂O gespült worden waren, wurden sie für kurze Zeit in Transferpuffer eingelegt um mit diesem zu equilibrieren. Währenddessen wurden auch zwei Whatman-Papiere und eine Nitrocellulose Membran in Transferpuffer equilibriert. Nach 2–5 Minuten wurde eines der Whatman-Papiere auf die Transferapparatur aufgelegt und mit Hilfe einer sauberen Glaspipette glatt gerollt. Auf dieses Papier wurde die Membran aufgebracht und ebenfalls glatt gestrichen. Anschließend wurde das Gel aufgelegt und danach das zweite Whatman-Papier. Nachdem überschüssiger Puffer entfernt worden war, wurde der Transfer bei 200 mA für 1 Stunde bei RT durchgeführt.

5.3.6.2 Inkubation der Nitrocellulose Membran mit Antikörpern

Wenn die Banden des Proteingrößenstandards gut auf die Membran übertragen worden waren, wurde mit der Modifizierung der Membran fortgefahren. Zunächst wurde die Membran einmal für 5 Minuten in TBS-T-Puffer bei RT unter leichtem Schütteln in einem sauberen Plastikbehälter gewaschen. Anschließend wurde für 1 Stunde die Blockierlösung zugegeben, um freie Proteinbindungsstellen der Membran abzusättigen und unspezifische Bindungen der später verwendeten Antikörper zu vermeiden. Nach zwei Waschschrritten mit TBS-T-Puffer wurde zunächst eine Lösung des primären Antikörpers zugegeben (Tabelle 41). I. d. R. wurde die Membran mit diesem für 1 Stunde bei RT unter leichtem Schütteln inkubiert. Alternativ war eine Inkubation über Nacht bei 12°C unter leichtem Schütteln möglich. Die primäre Antikörperlösung wurde sorgfältig entfernt^a, bevor die Membran erneut dreimal mit TBS-T-Puffer gewaschen und die sekundäre Antikörperlösung zugegeben wurde. Auch mit dieser konnte die Membran entweder für 1 Stunde bei RT oder über Nacht bei 12°C unter leichtem Schütteln inkubiert werden. Anschließend wurde die Lösung sorgfältig entfernt und die Membran fünfmal mit TBS-T-Puffer gewaschen. Bis zu ihrer Entwicklung konnte die Membran kurzfristig in diesem Puffer aufbewahrt werden, um ein Austrocknen zu verhindern.

^a Die verwendeten Antikörperlösungen konnten mehrfach benutzt werden. I. d. R. konnten fünf Membranen effizient modifiziert werden. Die mit NaN₃-versetzten Lösungen halten sich im Kühlschrank ca. 2 Monate.

Tabelle 41: Liste der verwendeten Antikörper. Diese werden anhand ihres Antigens und ggf. vorhandenen konjugierten Enzymen in primäre (p) und sekundäre (s) Antikörper unterschieden. Außerdem sind der jeweilige Wirtsorganismus, aus dem die Antikörper gewonnen wurden, ihre Klonalität, der benötigte Antikörperpuffer und die verwendete Verdünnung angegeben.

Antigen	Enzym	p/s?	Wirtsorganismus	Klonalität	Antikörperpuffer	Verdünnung
mCherry	-	p	Maus	monoklonal	1	1:1000
β -actin	-	p	Maus	monoklonal	1	1:2000
Maus-IgG	HRP	s	Kaninchen	polyklonal	2	1:10000
Maus-IgG	AP	s	Ziege	polyklonal	1	1:10000

5.3.6.3 Auslesen der Membran

Im Verlauf dieser Arbeit wurden Western Blots mit Hilfe der Meerretichperoxidase (HRP) oder der alkalischen Phosphatase (AP) visualisiert. Zu Beginn wurde zunächst mit der HRP gearbeitet, deren chemolumineszente Produkte sich durch Belichtung eines geeigneten Fotofilms detektieren lassen.²⁴⁰ Das Substrat Luminol wird dabei mit Wasserstoffperoxid u. a. zu 3-Aminophthalat umgesetzt.²⁴⁰ Es entsteht zunächst im angeregten Zustand, aus welchem es unter Abgabe von Licht relaxiert.²⁴¹ Dieses System ermöglicht ein mehrfaches Auslesen der Membran, wodurch für jede Probe eine optimale Belichtungszeit gewählt werden kann.²⁴² Ein Nachteil dieser Methode ist die Zeitabhängigkeit der Bandenintensitäten, welche eine Quantifizierung erschwert.²⁴³ Zudem kann laterale Diffusion der Zwischenprodukte den entwickelten Bereich auf dem Film größer erscheinen lassen als die ursprüngliche Bande.²⁴⁰ Später wurde zur Visualisierung auf die AP mit einer Substratlösung aus 5-Bromo-4-Chloro-3'-Indolylphosphat (BCIP) und 2,2'-bis(4-Nitrophenyl)-5,5'-diphenyl-3,3'-(3,3'-dimethoxy-4,4'-diphenylene)ditetrazoliumchlorid (NBT) umgestellt.^{244,245} Bei diesem System kann die Membran nur ein einziges Mal entwickelt werden, da das Produkt der enzymatischen Reaktion einen lilafarbenen Komplex bildet, der irreversibel an die Membranoberfläche bindet. Hierbei diffundiert der aus der BCIP/NBT-Lösung entstehende Niederschlag im Vergleich zum chemolumineszenten Produkt der HRP eine geringere Wegstrecke, sodass mit dieser Methode schärfere Banden erzielt werden.²⁴⁶ Gemeinsam mit dem direkten Anfärben der Proteinbanden auf der Membran erleichtert dies die Unterscheidung der Banden Ligand-modifizierter und unmodifizierter Proteine sowie den Vergleich mit dem parallel aufgetragenen Größenstandard.

Auslesen der Membran mit Hilfe der Meerretichperoxidase

Das Auslesen von Western Blots mit Hilfe der Meerretichperoxidase (HRP) erfolgte in der Dunkelkammer. Zunächst wurde die Membran durch Auflegen sauberer Papiertücher getrocknet. Anschließend wurde die Chemolumineszenzlösung nach Anleitung des Herstellers hergestellt und vorsichtig auf die Membran getropft. Nachdem die Lösung 1 Minute auf die Membran eingewirkt hatte, wurde diese erneut getrocknet und in einer lichtdurchlässigen Plastikhülle in die Filmkassette eingelegt. Anschließend wurde der Fotofilm aufgelegt^a und der Film in der geschlossenen Kassette belichtet. Danach wurde er mit Hilfe des Filmprozessierers entwickelt, welcher den Film automatisch mit Entwickler- und Fixierlösung inkubiert.

Auslesen der Membran mit Hilfe der alkalische Phosphatase

Das Auslesen von Western Blots mit Hilfe der alkalischen Phosphatase (AP) wurde mit Hilfe einer BCIP/NBT-Lösung durchgeführt. Dazu wurde die Membran nach dem letzten Waschschrift auf eine saubere Oberfläche gelegt und auf RT aufgewärmte BCIP/NBT-Lösung aufgetropft. War die gewünschte Bandenintensität erreicht, wurde die Reaktion durch gründliches Spülen mit ddH₂O abgebrochen. Anschließend konnte die Membran getrocknet und mit Hilfe eines Durchlichtscanners aufgenommen werden.

5.3.7 Analytische Hochleistungsflüssigkeitschromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie der Proteinvarianten

Zur massenspektrometrischen Untersuchung der sieben Proteinvarianten wurden Aliquots aller Proteine bei RT aufgetaut und abzentrifugiert (4°C, 16.000 rcf, 15 Min.), um eventuell ausgefallene Proteinaggregate abzutrennen. Anschließend wurde die Proteinkonzentration im Überstand gemessen (Abschnitt 5.3.2.4) und die Proteine in 60 µL Gelpermeationspuffer auf eine Konzentration von 40 µM eingestellt. 50 µL der Proteinlösung wurden in den mit Massenspektrometer gekoppelten analytischen Hochleistungsflüssigkeitschromatographen (HPLC-MS) injiziert und mit einem Gradienten von 30–95% des HPLC-Lösungsmittels B gegen das HPLC-Lösungsmittel A in 20 Minuten aufgetrennt und analysiert (Abbildung A27 bis Abbildung A33).

^a Da der verwendete Proteingrößenstandard bei dieser Methode nicht detektiert werden kann, ist es essentiell die Lage des Films auf der Membran zu markieren. Dadurch können nach vollständiger Entwicklung des Films die Banden des Größenstandards übertragen und somit die Größe der detektierten Proteine abgeschätzt werden.

5.3.8 Tryptischer *In-Gel*-Verdau und analytische Hochleistungsflüssigkeitschromatographie gekoppelt mit Tandem-Massenspektrometrie der Proteinvarianten

5.3.8.1 Probenvorbereitung

Um die für die SDS-PAGE benötigten Proben anzusetzen, wurde ein Aliquot von jeder Proteinvariante bei RT aufgetaut und abzentrifugiert (16.000 rcf, 4°C für 15 Min.). Anschließend wurde in den Überständen die Proteinkonzentration gemessen (Abschnitt 5.3.2.4) und Proben mit einer Proteinkonzentration von 40 µM in 12 µL Gelpermeationspuffer angesetzt ($n \approx 0,5$ nmol). Diese wurden mit 3 µL 5x SDS-Probenpuffer versetzt. Als Kontrolle wurden 10 µL einer wässrigen Lösung mit bovinem Serumalbumin (BSA, $c = 0,5$ µM, $n = 5$ pmol) hergestellt und mit 2 µL 5x SDS-Probenpuffer vermischt. Alle Proben wurden für 5 Minuten bei 95°C inkubiert, auf ein 17%-iges SDS-Polyacrylamidgel (Abschnitt 5.3.5.2) aufgetragen, für 2 Stunden bei 100 V und RT aufgetrennt und mit Coomassie-Färbelösung gefärbt (Abschnitt 5.3.5.4).

5.3.8.2 Tryptischer *In-Gel*-Verdau

Für den tryptischen *In-Gel*-Verdau wurden zunächst die Zielbanden aus dem gefärbten SDS-Polyacrylamidgel mit Hilfe eines Skalpellts ausgeschnitten (Abbildung A34). Dabei wurden die Banden in möglichst kleine Stücke zerschnitten und in einem 1,5 mL Reaktionsgefäß abzentrifugiert (16000 rcf, 4°C für 5 Min.). Zwischen den einzelnen Proben wurde das Skalpell mit 70%-igem Ethanol gewaschen, um Kontaminationen zu verringern.

Die Gelstücke mussten zunächst gewaschen und entfärbt werden. Dazu wurden sie mit jeweils 200 µL TV-Waschlösung 1 überschichtet und für 30 Minuten bei 37°C und 300 rpm geschüttelt. Die überstehende Lösung wurde entfernt und mit 200 µL TV-Waschlösung 2 ersetzt, mit welcher eine Inkubation für 15 Minuten bei 37°C und 300 rpm erfolgte. Anschließend wurde auch diese Waschlösung entfernt. Beide Waschschrte wurden noch zweimal wiederholt bis die Gelstücke komplett entfärbt waren.

Zur Reduktion von Disulfidbrücken und Alkylierung der reduzierten Cystein-Seitenketten wurden die im Gel enthaltenen Proteine zunächst mit 100 µL TV-Reduktionslösung bei 37°C und 300 rpm für 45 Minuten inkubiert. Danach wurde die Lösung verworfen und 100 µL TV-Alkylierungslösung zugegeben. Mit dieser wurden die Gelstücke für 1 Stunde bei 22°C und 300 rpm im Dunkeln inkubiert.

Um das Gel zu trocknen wurde die Alkylierungslösung verworfen und die Gelstücke zweimal für 15 Minuten mit TV-Waschlösung 2 bei RT und 300 rpm gewaschen. Anschließend wurden 10 μL Acetonitril für 10 Minuten zugegeben. Die nun weiß gefärbten Gelstücke wurden offen bei RT im Abzug aufbewahrt, bis das Lösungsmittel verdampft war. Für den eigentlichen Verdau wurden 15 μL TV-Reaktionslösung zu den Gelstücken gegeben und für 15 Minuten bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion mit 20 μL NH_4HCO_3 -Lösung (25 mM) aufgefüllt und über Nacht bei 30°C inkubiert. Am nächsten Morgen wurden noch 3,5 μL Trifluoressigsäure (TFA) zugegeben und die entstandenen Peptide für 30 Minuten mit Hilfe eines Ultraschallbades bei 4°C extrahiert. Der Überstand wurde abgenommen und in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt. Die Gelstücke wurden mit 20 μL Acetonitril erneut getrocknet, um verbliebene Peptide möglichst vollständig zu eluieren. Diese Lösung wurde mit dem zuvor entnommenen Überstand vereinigt und in einem Vakuumkonzentrator getrocknet. Die erhaltenen Rückstände wurden bei -20°C gelagert bis sie vermessen wurden.

5.3.8.3 Analytische Nano-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie gekoppelt mit Tandem-Massenspektrometrie

Zur Proteinidentifikation wurden die tryptischen Peptide mit Hilfe einer nano-HPLC aufgetrennt und mittels MS^2 analysiert. Dazu wurden die Proben in 20 μL HPLC-Lösungsmittel A gelöst und 3 μL dieser Lösung mit einer Flussrate von 30 $\mu\text{L}\cdot\text{Min}^{-1}$ desselben Lösungsmittels auf eine Vorsäulenkartusche injiziert. Zur Entsalzung wurde diese Kartusche für 5 Minuten mit HPLC-Lösungsmittel A gespült, ehe die Probe von der Kartusche auf die eigentliche Trennsäule zurückgespült wurde, wo sie mit einem Gradienten von 5–30% des HPLC-Lösungsmittels D gegen das HPLC-Lösungsmittel C innerhalb von 35 Minuten mit einer Flussrate von 300 $\text{nL}\cdot\text{Min}^{-1}$ aufgetrennt wurde.

Das Massenspektrometer nahm einen Massenbereich von $m/z = 300\text{--}1650$ mit einer Auflösung von 70.000 für den *full scan*-Modus auf, gefolgt von bis zu zehn MS^2 -Scans der intensivsten, mindestens doppelt-geladenen Ionen, für die diese mittels kollisionsinduzierter Dissoziation fragmentiert wurden.

Die Datenanalyse wurde mit Hilfe der *MaxQuant* Software durchgeführt,¹⁶³ wobei mit dem *Andromeda* Suchalgorithmus sowohl das humane Referenzproteom der *Uniprot* Datenbank als auch eine Datenbank mit üblichen Kontaminationen und eine *fasta*-Datei mit den

Sequenzen für die sieben Proteinvarianten durchsucht wurden. Dabei wurden folgende Einstellungen verwendet: Für den tryptischen Verdau wurden zwei falsche/fehlende Schnittstellen erlaubt. Als mögliche Proteinmodifikationen wurden Oxidationsprodukte des Methionins sowie die Acetylierung des *N*-Terminus eingestellt. Als definitiv vorhandene Modifikation wurde die Carbamidomethylierung von Cysteinen festgelegt. Die Massengenauigkeit für MS-Spektren wurde auf 5 ppm und die für MS²-Messungen auf 20 ppm gesetzt. Die *false discovery rate* für die Peptid- und Proteinidentifikation wurde auf 1% gesetzt. In der Arbeit gezeigte Massenspektren wurden direkt aus den Rohdaten entnommen (Abbildung A35).

5.3.9 Bestimmung der thermischen Proteinstabilität

Zunächst wurden Lösungen aller Proteine mit einer Konzentration von 0,5 mg·mL⁻¹ in 48 µL Gelpermeationspuffer angesetzt. Anschließend wurden 8 µL dieser Lösung entnommen, mit 2 µL 5x SDS-Probenpuffer vermischt und bei 95°C für 5 Minuten denaturiert. Die restliche Lösung wurde bei 37°C inkubiert und nach 3 Std., 6 Std., 9 Std., 12 Std. und 24 Std. wurden analog Proben entnommen. Am Ende wurden diverse 17%–ige SDS-Polyacrylamidgele (Abschnitt 5.3.5.2) durchgeführt und mittels Coomassiefärbelösung (Abschnitt 5.3.5.4) visualisiert. Dazu wurde zum einen für jeder Proteinvariante ein Gel hergestellt, auf dem die Proben chronologisch sortiert wurden, und zum anderen ein vergleichendes Gel aller sieben Proteine mit den Proben nach 0 Std. und 24 Std (Abbildung A36).

5.4 Techniken zur Synthese und Analyse von Peptiden

5.4.1 Manuelle Festphasenpeptidsynthese

Die manuelle Festphasenpeptidsynthese (SPPS) erfolgte in Spritzenreaktoren mit Stempel, die am Auslass mit einer Fritte versehen sind, um das Harz in ihnen zu halten. Zum Aufziehen der Lösungsmittel und reaktiven Lösungen wurden Kanülen verwendet.

5.4.1.1 Quellen

Bevor das Trägerharz verwendet werden kann, muss es zunächst in reinem Lösungsmittel inkubiert werden, um es zu seinem Arbeitsvolumen aufzuquellen. Da die hier verwendeten Harze in Dichlormethan (DCM) ihr größtes Volumen erreichen, wurden sie in diesem für 1 Stunde unter leichtem Schütteln bei RT inkubiert. Dabei wurde so viel Lösungsmittel aufgezogen, dass oberhalb des Harzes noch ca. 1 mL Lösungsmittelüberstand war. Als Richtwert wurde ca. 1 mL Lösungsmittel pro 50 mg Harz verwendet. Dieses Verhältnis wurde auch in allen nachfolgenden Wasch- und Reaktionsschritten beibehalten.

5.4.1.2 Waschen

Zwischen den einzelnen Arbeitsschritten wurde das wachsende Peptid auf dem Harz gewaschen. Dazu wurde jeweils zunächst dreimal mit dem Lösungsmittel gewaschen, in welchem die vorhergehende Reaktion durchgeführt wurde, indem dieses in die Spritze aufgezogen, kurz geschüttelt und wieder entfernt wurde. Anschließend wurde dreimal mit DCM gewaschen und dann dreimal mit dem Lösungsmittel, in welchem die folgende Reaktion stattfinden sollte.

5.4.1.3 Abspalten der Fmoc-Schutzgruppe

Um die Fmoc-Schutzgruppe vom *N*-Terminus des Peptids zu entfernen, wurde dieses für zweimal 5 Minuten bei RT in einer definierten Fmoc-Entschützungslösung geschüttelt. Die entnommenen Fmoc-enthaltenden Lösungen wurden vereinigt und mittels UV/Vis-Spektroskopie untersucht, um die Stoffmenge der abgespaltenen Fmoc-Schutzgruppe zu ermitteln. Da beim Abspalten pro Fmoc-Schutzgruppe ein Piperidin-Dibenzofulven-Addukt entsteht,²⁴⁷ lässt sich über seine Stoffmengenkonzentration c_n , die mittels Lambert-Beer'schem Gesetz berechnet werden kann, die Stoffmenge an freien Aminen auf dem Harz

berechnen (Formel 2). Dazu wurde die Absorption des Piperidin-Dibenzofulven-Addukt bei $\lambda = 295$ nm vermessen ($\epsilon_{295}(\text{Piperidin-Dibenzofulven-Addukt}) = 7800 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

Zur Messung der Fmoc-Konzentration wurden in der Fmoc-Küvette 3 mL Fmoc-Entschützungslösung vorgelegt und als Referenzlösung vermessen. Hierzu wurde ein Spektrum von 280 – 310 nm aufgenommen und die Extinktion E bei 295 nm abgelesen. Anschließend wurden 1 – 10 μL der während der Abspaltung gesammelten Fmoc-Lösung zugegeben und erneut die Extinktion der Probe vermessen. Nach Subtraktion des Referenzwertes konnte die ursprünglich auf dem Harz befindliche Fmoc-Stoffmenge n bestimmt werden (Formel 2), die der Stoffmenge der jeweiligen Peptidzwischenstufe entspricht.

$$n = \frac{E \cdot V_M \cdot V_L}{\epsilon_{295} \cdot V_Z} \quad (2)$$

mit n : Stoffmenge; E : Extinktion; ϵ_{295} : Molarer, dekadischer Extinktionskoeffizient des Piperidin-Dibenzofulven-Adduktes bei 295 nm; V_M : Finales Volumen bei der Messung in der Küvette; V_L : Volumen der während der Entschätzung vereinigten Fmoc-Lösungen; V_Z : Volumen, das von diesen zur Messlösung hinzugegeben wurde.

5.4.1.4 Kupplung von Aminosäuren

Für die Festphasenpeptidsynthese sind eine Vielzahl von Kupplungsprotokollen verfügbar, die darauf beruhen, die Carboxyl-Gruppe der zu kuppelnden Aminosäure zu aktivieren und so die Reaktion mit der entständigen Amingruppe auf dem Harz zu induzieren.¹⁶⁷ Zur Kupplung sind u. a. Triazol-Kupplungsreagenzien verfügbar, bei denen die zu kuppelnde Aminosäure durch einen Aktivester aus einem Phosphonium- oder Amminiumsalz aktiviert wird.^{248–251} In dieser Arbeit wurden als Kupplungsreagenzien Benzotriazol-1-yl-oxytriphyrrolidinophosphonium-hexafluorophosphat (PyBOP, Phosphonium-Reagenz) sowie O-(6-Chlorobenzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium hexafluorophosphat (HCTU, Amminium-Reagenz) und (1-Cyano-2-ethoxa-2-oxoethylidenaminoxy)-dimethylamino-morpholino-carbenium hexafluorophosphat (COMU, Amminium-Reagenz) verwendet (Abbildung 44). Zur Aktivierung der Reagenzien müssen dabei Lewis-Basen wie 4-Methylmorpholin (NMM) oder N,N-Diisopropylethylamin (DIPEA) zugegeben werden.^{167,251} Bei allen Kupplungen können Additive wie Ethyl(hydroxyimino)cianoacetat (Oxyma) zugesetzt werden, welche die Kupplungen beschleunigen, Razemisierung unterdrücken und Nebenreaktionen von Aminosäureseitenketten verringern können.^{167,252–254}

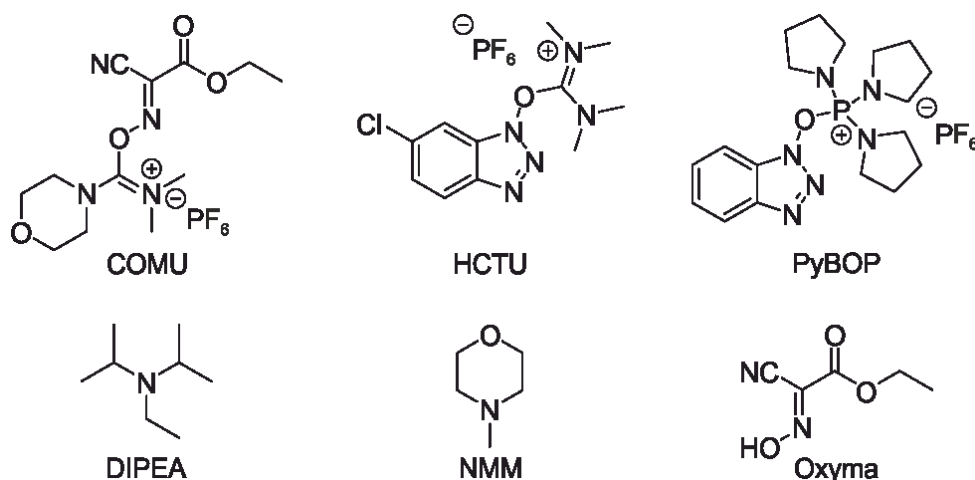


Abbildung 44: Zur Peptidkupplung verwendete Kupplungsreagenzien, Basen und Additive.

Alle Aminosäuren wurden bei RT in DMF und unter leichtem Schütteln gekuppelt, wobei von der Fmoc-Aminosäure, den Aktivatoren und Additiven je 4 Äquivalente und von der Base 8 Äquivalente eingesetzt wurden. Dabei wurden im ersten Kupplungsschritt COMU und Oxyma als Aktivator bzw. Additiv genutzt, während im zweiten Schritt der Aktivator PyBOP ohne Additiv verwendet wurde. Als Base wurde für die COMU/Oxyma-Kupplung DIPEA und für die PyBOP-Kupplung NMM zugegeben. Da COMU in der Reaktionslösung eine geringe Halbwertszeit aufweist, wurden diese Kupplungen für 20 Minuten durchgeführt.²⁵⁵ Anschließend wurde das Peptid gewaschen und die PyBOP-Kupplung für 2 Stunden oder ggf. über Nacht angeschlossen. Im Anschluss an jede dieser Doppelkupplungen wurden der Kaiser- oder der Chloraniltest (Abschnitte 5.4.1.5 und 5.4.1.6) zur Überprüfung des Reaktionsumsatzes durchgeführt. War dieser nicht zufriedenstellend, wurde die Aminosäure nach dem eben beschriebenen Schema erneut gekuppelt.

5.4.1.5 Kaisertest

Der Kaisertest ist eine Nachweismethode für primäre Amine,²⁵⁶ welche in der SPPS nach der Entfernung der *N*-terminalen Fmoc-Schutzgruppe entstehen.^a Wenn die darauffolgende Kupplung nicht vollständig abläuft, bleiben freie Aminogruppen übrig, welche mit Hilfe des Kaisertests direkt auf dem Trägerharz detektiert werden können. Hierbei reagiert das Ninhydrin aus der Kaisertestlösung B mit primären Aminen unter Bildung von Ruhemans Purpur, welches eine blaue Farbe besitzt.

^a Eine Ausnahme ist die Entschützung der Aminosäure Prolin, bei welcher ein sekundäres Amin entsteht.

Für diesen Test wurde das Harz zunächst mit DCM gewaschen und dann ein kleiner Teil in ein 0,5 mL Reaktionsgefäß überführt. Zu diesem wurden 6 Tropfen der Kaisertestlösung A und 2 Tropfen der Kaisertestlösung B zugegeben. Nach kurzem Mischen wurde das Gemisch für 3 Minuten bei 110°C inkubiert. Anschließend wurde die Lösung hinsichtlich ihrer Farbe untersucht. Eine blaue Lösung deutet beim Kaisertest auf viele primäre Amine hin, sodass in diesem Fall die Kupplung der Aminosäure wiederholt werden musste. Eine gelbe Lösung zeigt, dass die primären Aminogruppen in einer Konzentration unterhalb des Detektionslimits vorliegen. In diesem Fall wurde die vorhergehende Kupplung als vollständig angesehen und die Synthese mit dem auf jede Kupplung folgenden Acetylierungsschritt (Abschnitt 5.4.1.7) fortgesetzt. In seltenen Fällen war die Lösung gelb, während die Harzkügelchen eine schwache Blaufärbung zeigten. Dies deutet auf wenige primäre Amine auf dem Harz hin. Auch in diesen Fällen wurde die vorhergehende Kupplung nicht wiederholt.

5.4.1.6 Chloraniltest

Da der Kaisertest keine sekundären Amine anfärben kann, wurden diverse Testsysteme für die Detektion unvollständiger Kupplungen auf die Aminosäure Prolin entwickelt.^{257–259} In dieser Arbeit wurde der Chloraniltest verwendet, in welchem Tetrachloro-1,4-Benzoquinon (Chloranil) und Acetaldehyde mit dem sekundären Amin zu einem blauen Farbstoff reagieren.²⁵⁷

Für diesen Test wurden die Harzkügelchen mit DCM gewaschen und einige in ein 0,5 mL Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurden 5 Tropfen Chloranillösung und 20 Tropfen Acetaldehyd zugegeben. Nach 5 Minuten Inkubation bei RT war eine Blaufärbung zu erkennen, sofern die vorhergehende Kupplung nicht vollständig war.

5.4.1.7 Acetylierung freier Aminogruppen

Um die freien Aminogruppen am *N*-Terminus eines Peptides zu deaktivieren, wurden diese mit einem Acetylrest modifiziert. Dazu wurde pro 50 mg Harz 1 mL Acetylierungslösung in den Spritzenreaktor gezogen und für 5 Minuten bei RT unter Schütteln inkubiert.

5.4.1.8 Ringschlussmetathese nach Grubbs

Für die Ringschlussmetathese wurde zunächst die vollständige Peptidsequenz der kohlenwasserstoffverbrückten Liganden aufgebaut und dann das Harz am Vakuumsystem

mit Dichlorethan (DCE) gespült. Der Grubbs I-Katalysator wurde in einem Reaktionsgefäß auf eine Konzentration von $4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ mit DCE eingestellt und unter Schutzgas bei 4°C gelagert.^a Um das Peptid zur Reaktion zu bringen, wurde dieses fünfmal für 1 Stunde mit der Katalysatorlösung inkubiert. Dabei wurde von unten Stickstoff durch die Reaktionsmischung geleitet, um diese zu mischen und die Desaktivierung des Katalysators durch den Luftsauerstoff zu verlangsamen. Anschließend wurde das Harz mehrfach im Wechsel mit DCM und einer DCM/DMSO-Lösung (1:1) gewaschen, wobei jeweils für einige Minuten Stickstoff durch die Suspension geleitet wurde. Anschließend wurde eine Testabspaltung (Abschnitt 5.4.3) durchgeführt, um den Umsatz der Metathesereaktion zu überprüfen. War dieser nicht zufriedenstellend, wurde die Metathese wiederholt.

5.4.1.9 Modifikation mit Abstandshaltern

Die *N*-terminale Modifikation von Peptiden mit den fünf Abstandshaltern (β -Alanin oder PEG-Ketten diverser Längen) wurde mit bifunktionalen Molekülen durchgeführt, die auf der einen Seite eine freie Carboxylgruppe und auf der anderen Seite eine Fmoc-geschützte Aminogruppe besaßen. Daher konnte diese Kupplung analog zu der der Aminosäuren erfolgen (Abschnitt 5.4.1.4).

5.4.1.10 Entfernung der orthogonalen 4-Monomethoxytrityl-Schutzgruppe

Zur Entfernung der Mmt-Schutzgruppe wurde Mmt-Entschützungslösung in den Spritzenreaktor aufgezogen und für 5 Minuten bei RT unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurde die Lösung aus der Spritze entfernt und auf ihre Färbung untersucht. Da die bei der Abspaltung entstehenden Tritylkationen eine gelbliche bis rote Farbe haben,¹⁷¹ wurde die Inkubation mit frischer Lösung wiederholt bis die entnommene Lösung farblos war.

5.4.1.11 Modifikation mit Fluoresceinisothiocyanat Isomer I

Um ein Peptid mit FITC zu modifizieren, wurden 4 Äquivalente FITC in DMF gelöst und 8 Äquivalente DIPEA hinzugegeben. Die Lösung wurde kurz gemischt und in den Spritzenreaktor aufgezogen. Dort wurde sie für 1 Stunde bei RT unter Schütteln zur

^a Solange diese Lösung eine violette Farbe aufweist, ist der Katalysator aktiv und kann die Metathesereaktion katalysieren. Ist die Lösung braun gefärbt, wurde der Katalysator durch Oxidation desaktiviert.

Reaktion gebracht. Anschließend wurde dieser Reaktionsschritt wiederholt und das Harz gewaschen.

5.4.1.12 Modifikation mit (Desthio-)Biotin

Bei der Synthese der *C*-terminal mit Biotin oder Desthiobiotin modifizierten Peptide wurden über die Seitenkette des orthogonal geschützten Lys(Mmt) zunächst zwei PEG(Mmt)-Ketten mit Hilfe der Standardkupplungsbedingungen (Abschnitt 5.4.1.4) aufgebracht. Nach erneuter Mmt-Entschützung (Abschnitt 5.4.1.10) konnte das freie Amin mit den Bedingungen für die Kupplung von Aminosäuren (Abschnitt 5.4.1.4) mit Biotin oder Desthiobiotin modifiziert werden. Da diese abgesehen von ihrer freien Carboxylgruppe keine funktionellen Gruppen enthalten, die unter den Bedingungen der SPPS reagieren konnten sie ungeschützt verwendet werden.

5.4.1.13 Modifikation mit Palmitinsäure

Zur *C*-terminalen Modifikation der Membrananker mit Palmitinsäure wurde zunächst die Mmt-Gruppe entfernt (Abschnitt 5.4.1.10). Anschließend konnte das freie Amin mit den Bedingungen zur Kupplung von Aminosäuren (Abschnitt 5.4.1.4) mit Palmitinsäure modifiziert werden.

5.4.1.14 Modifikation mit α -Chloressigsäure

Um die Peptide mit α -Chloressigsäure zu modifizieren wurde der *N*-Terminus des Peptides von der Fmoc-Schutzgruppe befreit (Abschnitt 5.4.1.3) und mit α -Chloressigsäure zur Reaktion gebracht werden. Hierzu wurden jeweils 5 Äquivalente der Säure und des Kupplungsreagenzes PyBOP in DMF gelöst. Anschließend wurden die beiden Lösungen mit 12 Äquivalente DIPEA gemischt und in den Spritzenreaktor aufgezogen. Nach einer Inkubation von 2 Stunden wurde dieser Vorgang wiederholt.

5.4.1.15 Lagerung von Peptiden auf dem Harz

Um Peptide auf dem Trägerharz zu lagern, wurde dieses zunächst gewaschen, wobei zuletzt dreimal mit DCM gespült wurde. Dieses kann im Vakuum leichter entfernt werden als die übrigen zur Peptidsynthese verwendeten Lösungsmittel.²⁶⁰ Anschließend wurde die Kanüle am Spritzenreaktor entfernt und dieser an das Vakuumsystem angeschlossen, wo er verblieb,

bis das Harz vollständig getrocknet war.^a Anschließend konnten die Peptide bei -20°C gelagert werden.

5.4.2 Automatische Festphasenpeptidsynthese

Die automatische Festphasenpeptidsynthese erfolgte in Spritzenreaktoren ohne Stempel. Das Aufziehen der Lösungsmittel und reaktiven Lösungen wurde vom Syntheseroboter übernommen, der diese von oben in die Spritzen einfüllt. Da es sich beim Syro I um ein offenes System handelt, bei dem ohne Schutzgas gearbeitet werden muss, wurde auf die Verwendung von COMU verzichtet, welches unter diesen Bedingungen nicht stabil ist.²⁶¹ Stattdessen wurde das Kupplungsreagenz HCTU verwendet, sodass jede Aminosäure je einmal mit PyBOP und einmal mit HCTU unter Verwendung der Base DIPEA zur Reaktion gebracht wurde.

5.4.2.1 Vorbereitung des Harzes

Bevor die Synthese am Synthesizer gestartet wurde, wurde jeweils die erste C-terminale Aminosäure von Hand gekuppelt (vgl. Abschnitt 5.4.1). Anschließend wurde das Harz mit Hilfe des Vakuumssystems in die für den Syntheseroboter benötigte Spritze umgefüllt und in den Reaktorblock eingesetzt.

5.4.2.2 Vorbereitung der benötigten Reagenzien

Bei der automatischen Peptidsynthese wurde mit 4 Äquivalenten Aminosäure, 4 Äquivalenten Kupplungsreagenz (HCTU oder PyBOP) und 8 Äquivalenten Base (DIPEA) gearbeitet. Im Gegensatz zur händischen Synthese wurden die Acetylierungs- und Fmoc-Entschützungs-Lösung nicht in DMF, sondern in NMP hergestellt, da diese Reagenzien bei Verwendung des alternativen Lösungsmittels stabiler sind.²⁶² Eine weitere Änderung ergab sich bei der Lösung, in welcher die Aminosäuren gelöst wurden. Dies erfolgte weiterhin in DMF, jedoch unter Zugabe von 0,5 M Oxyma, um mögliche Razemisierungen der Aminosäuren während der langen Lagerungszeit im Synthesizer zu verringern.²⁶³ Die hergestellten Volumina, Konzentrationen und verwendeten Stoffmengen der einzelnen Lösungen und Substanzen wurden für jede Synthese von der zum Gerät gehörenden

^a Beim Trocknen eines Rink-Amid-MBHA-Harzes verlieren die einzelnen Harzkügelchen ihre Haftung zu einander, sodass der Trocknungsfortschritt leicht durch Schütteln verfolgt werden kann. Das NovaSyn TGR Harz verliert beim Trocknen stark an Volumen, was den Trocknungsfortschritt ebenfalls verfolgsbar macht.

Software berechnet und nach diesen Angaben hergestellt, bevor sie in die vorgesehenen Lagerbehälter eingefüllt wurden.

5.4.2.3 Programm des Syntheseroboters

Das hier beschriebene Programm des Syntheseroboters wird für einen 25 μmol Ansatz verwendet (Tabelle 42). Mit Hilfe eines Skalierungsfaktors lässt es sich direkt über die Software des Roboters auf andere Ansatzgrößen umrechnen. Dabei werden die Stoffmenge und das Lösungsvolumen der einzelnen Reagenzien angepasst, während die Inkubationszeiten nicht verändert werden.

Tabelle 42: Vom Syntheseroboter verwendetes Programm zur Synthese eines Peptides in einem 25 μmol Ansatz. Während der Reaktionszeit t_{Reaktion} wurde das Harz mit der angegebenen Lösung im Wechsel geschüttelt und inkubiert bis die Reaktionszeit vorüber war. Danach wurde die Lösung jeweils für 20 Sekunden durch Anlegen eines Vakuums aus dem Spritzenreaktor entfernt.

	Volumen / μL	Lösung	t_{Reaktion} / Min.	$t_{\text{Schütteln}}$ / Sek.	$t_{\text{Inkubation}}$ / Sek.	Zyklenzahl
Fmoc-Entschützung						
waschen	1800	DMF	1	10	60	1
entschützen	1200	Fmoc- Entschützungslösung	3	10	60	1
waschen	1800	DMF	1	10	60	6
HCTU-Kupplung						
kuppeln	600 600 600	Aminosäure-Lösung HCTU-Lösung DIPEA-Lösung	40	15	120	1
waschen	1800	DMF	1	10	60	2
PyBOP-Kupplung						
kuppeln	600 600 600	Aminosäure-Lösung PyBOP-Lösung DIPEA-Lösung	40	15	120	1
waschen	1800	DMF	1	10	60	2
Acetylierung						
acetylieren	300 900	DIPEA-Lösung Acetanhydrid-Lösung	2	10	60	1
waschen	1800	DMF	1	10	60	6

5.4.2.4 Aufbereitung des Harzes

Nachdem die Synthese abgeschlossen war, wurden die Reaktionsspritzen vom Syntheseroboter abgenommen und die Harze erneut mit Hilfe des Vakuumsystems in die für die händische Synthese notwendigen Spritzen mit Stempel umgefüllt. Dabei wurde sechsmal mit DCM gespült, indem jeweils für einige Minuten Stickstoff durch die Suspension geleitet wurde, bevor diese durch das Vakuum abgesaugt wurde. Anschließend wurden die Harze im Vakuum getrocknet und einer Testabspaltung unterzogen (Abschnitt 5.4.3), um die Synthese zu überprüfen.

5.4.3 Testabspaltungen

Um den Erfolg einer Synthese zu überprüfen, wurde regelmäßig eine Testabspaltung durchgeführt und mittels HPLC-MS (Abschnitt 5.4.6) analysiert. Dieser Schritt erfolgte jeweils sobald alle Aminosäuren eines Peptides gekuppelt worden waren. Auch nach kritischen Schritten der Synthese, wie z. B. Metathesen, oder nach Modifizierungen mit Abstandshaltern, α -Chloressigsäure, Biotin, Desthiobiotin, FITC und Palmitinsäure wurden Testabspaltungen durchgeführt. Nur wenn diese erfolgreich waren, wurde die Synthese fortgesetzt.

Um eine Testabspaltung durchzuführen wurde das Harz getrocknet und einige getrocknete Harzkügelchen in einen 2 mL Spritzenreaktor gefüllt. In diesen wurden 500 μ L Abspalllösung aufgezogen und für 1 h mit dem Harz bei RT unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurde die Lösung in ein sauberes 1,5 mL Reaktionsgefäß ausgestoßen, mittels Druckluft auf ca. 100 μ L eingeengt und mit 1,4 mL -20°C kaltem Diethylether ausgefällt. Ein Zentrifugationsschritt (16.000 rcf, 4°C , 15 Min.) fällte das Peptid aus. Nachdem der Rückstand getrocknet war, wurde er in 60 μ L eines Acetonitril-Wasser-Gemisches gelöst, dessen Zusammensetzung je nach der Löslichkeit des Peptides variierte. Anschließend wurden in Abhängigkeit von der Größe des gefällten Rückstandes 5–50 μ L dieser Lösung in die HPLC-MS injiziert und die enthaltenen Peptide mit einem Gradienten von 5–95% des HPLC-Lösungsmittels B gegen das HPLC-Lösungsmittel A in 10 Minuten aufgetrennt und im Massenspektrometer analysiert.

5.4.4 Vollabspaltungen

Vollabspaltungen wurden analog zu Testabspaltungen durchgeführt, allerdings wurde hierbei das Volumen der Abspatlösung in Bezug auf das Harz definiert: Pro 50 mg Harz wurde 1 mL Abspaltungslösung in den Spritzenreaktor aufgezogen und für 3 h bei RT unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurde die peptidhaltende Lösung in ein 15 mL Reaktionsgefäß gefüllt und der Spritzenreaktor noch einmal mit 0,5 mL Vollabspaltungslösung à 50 mg Harz für 5 Minuten geschüttelt. Diese Lösung wurde mit der vorherigen vereint, auf 0,5–1,0 mL eingengt und mit 14,5 mL -20°C kaltem Diethylether gefällt. Um die Ausbeute bei diesem Schritt zu verbessern wurden die Peptidlösungen mindestens 1 Stunde, ggf. auch über Nacht, bei -20°C inkubiert. Anschließend wurde das ausgefallene Peptid abzentrifugiert (4°C , 4.000 rcf, 15 Min.) und der erhaltene Rückstand mit -20°C kaltem Diethylether für geschüttelt bis er sich möglichst vollständig gelöst hatte, um eingeschlossene Verunreinigungen zu entfernen. Nach einem erneuten Zentrifugationsschritt (4°C , 4.000 rcf, 15 Min.) wurde der Rückstand mit Druckluft^a getrocknet und bei -20°C bis zur finalen Aufreinigung mittels präparativer HPLC (Abschnitt 5.4.5) gelagert.

5.4.5 Präparative Umkehrphasen-Flüssigkeitschromatographie

Für die präparative RV-LC wurden die nach der Vollabspaltung erhaltenen Peptidrückstände in Acetonitril-Wasser-Gemischen gelöst, deren Zusammensetzung je nach der Löslichkeit des Peptides variierte. Anschließend wurde das Peptidgemisch in Volumina von maximal 4 mL mit einem Gradienten des HPLC-Lösungsmittels B gegen das HPLC-Lösungsmittel A aufgetrennt. Je nach Konzentration der Peptidlösung wurde dabei entweder die kleine präparative C18-Säule mit einer Flussrate von $6\text{ mL}\cdot\text{Min.}^{-1}$ oder bei höheren Konzentrationen die große präparative C18-Säule mit einer Flussrate von $17,5\text{ mL}\cdot\text{Min.}^{-1}$ verwendet. Die Bedingungen für die einzelnen Peptide können Tabelle 43 entnommen werden. die Hauptfraktionen der einzelnen Signalausschläge im erhaltenen Chromatogramm mittels HPLC-MS (Abschnitt 5.4.6.1) analysiert. Wenn in einem Signalausschlag das Zielpeptid identifiziert wurde, wurden die umliegenden Fraktionen entweder mittels analytischer HPLC (über Vergleich der Retentionszeiten mit Hilfe der auf der HPLC-MS als

^a Die Verwendung von Druckluft ist nur möglich, wenn das Peptid weder Cystein noch Methionin enthält, da beide Aminosäuren am enthaltenen Schwefelatom leicht oxidieren.

positiv identifizierten Fraktion, Abschnitt 5.4.8) oder analytischer HPLC-MS (Abschnitt 5.4.6.1) auf ihren Gehalt an Zielpeptid und dessen Reinheit untersucht.

Tabelle 43: Liste der mittels präparativer RP-LC aufgereinigten Peptide mit dem prozentualen Gehalt des HPLC-Lösungsmittels B an der wässrigen Lösung, in dem sie gelöst wurden, sowie der für die RP-LC verwendeten Gradienten (angegeben in Prozent des HPLC-Lösungsmittels B gegen das HPLC-Lösungsmittel A) und präparativen C18Säulen. ^{a)}Diese Peptide wurden im Rahmen seiner Bachelorarbeit von Marcel Schmidt gereinigt.

Peptid	Gelöst in x% HPLC-Lösungsmittel B	Gradient	Dauer des Gradienten / Min.	verwendete C18-Säule
f-L(M)-W	36	30–95	15	groß
f-L(B)-W	45	30–95	15	groß
H-L-f	42	30–95	30	klein
H-L(s1)-f	44	45–95	30	klein
H-L(s2)-f	52	30–95	30	klein
H-L(s3)-f	44	30–95	30	klein
H-L(2844)-f	50	30–95	30	klein
H-L(2845)-f	50	30–95	30	klein
H-L(2848)-f	50	30–95	30	klein
H-L(2849)-f	36	30–95	30	klein
H-L(2850)-f	36	30–95	30	klein
H-L(2851)-f	50	30–95	30	klein
H-L(2852)-f	36	30–95	30	klein
H-L(2853)-f	50	30–95	30	klein
H-L(2854)-f	36	30–95	30	klein
H-L(2856)-f	36	30–95	30	klein
H-iL-f	49	30–95	30	klein
CI-4L-f ^{a)}	-	30–95	30	-
CI-9L-f ^{a)}	-	30–95	30	-
CI-13L-f ^{a)}	-	30–95	30	-
CI-19L-f ^{a)}	-	30–95	30	-
CI-38L-f ^{a)}	-	30–95	30	-
CI-iL-f	38	30–95	30	klein
CI-9iL-b	15	10–70	30	klein
CI-9L-b	15	10–70	30	klein
H-9L-b	15	10–70	30	klein
CI-9iL-dtb	15	10–70	30	klein
CI-9L-dtb	10	10–70	30	klein
H-9L-dtb	10	10–70	30	klein
f-9NLS	10	10–95	30	klein
f-9MA1	30	30–95	30	klein
f-9MA2	10	30–95	30	klein
f-9MA3	10	30–95	30	klein
f-9L-NLS	30	30–95	30	klein
f-9L-MA2	50	50–70	30	klein
f-9L-MA3	50	50–95	30	klein
CI-9L-NLS	10	10–70	30	klein

Peptid	Gelöst in x% HPLC-Lösungsmittel B	Gradient	Dauer des Gradienten / Min.	verwendete C18-Säule
CI-9iL-NLS	10	10–70	30	klein
CI-9L-MA2	30	30–95	30	klein
CI-9iL-MA2	30	30–95	30	klein
CI-9L-MA3	30	30–95	30	klein
CI-9iL-MA3	30	30–95	30	klein

5.4.6 Analytische Hochleistungsflüssigkeitschromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie

5.4.6.1 Analytische Hochleistungsflüssigkeitschromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie zur Identifizierung von Zielpeptid-enthaltenden Fraktionen nach der präparativen Umkehrphasen-Flüssigkeitschromatographie

Um zu überprüfen, welche der nach der präparativen RP-LC erhaltenen Fraktionen das Zielpeptid enthielten, wurden diese mittels analytischer Hochleistungsflüssigkeitschromatographie gekoppelt mit einer Massenspektrometrie untersucht. Dazu wurden 20 μL einer Fraktion in ein HPLC-Probengefäß überführt und 1–15 μL in die HPLC-MS injiziert. Das Injektionsvolumen hing dabei vom Grad der Gelbfärbung durch das im Peptid enthaltene FITC und/oder der Höhe des auf der präparativen Flüssigkeitschromatographie detektierten Signalausgangs ab. Für alle Peptide wurde zunächst ein Gradient von 30–95% des HPLC-Lösungsmittels B gegen das HPLC-Lösungsmittel A in 10 Minuten verwendet.

5.4.6.2 Analytische Hochleistungsflüssigkeitschromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie zur finalen Analyse eines Peptides

Nachdem ein Peptid mittels präparativer RP-LC (Abschnitt 5.4.5) aufgereinigt und die gewünschten Fraktionen vereinigt worden waren, wurde wenn möglich die jeweils sauberste Fraktion noch einmal auf der HPLC-MS vermessen, um die finale Reinheit des Peptides zu bestimmen. Dazu wurden jeweils ca. 5–10 pmol Peptid injiziert und mit 20-minütigen Gradienten aufgetrennt (Abbildung A37 bis Abbildung A78).

5.4.7 Analytische Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

Um die Reinheit einzelner Peptidfraktionen oder DMSO-Stammlösungen zu überprüfen, wurden diese auf der analytischen HPLC untersucht. Hierzu wurde für alle Peptide ein Gradient von 30–95% des HPLC-Lösungsmittels B gegen das HPLC-Lösungsmittel A in 10 Minuten verwendet. Zur Reinheitsbestimmung wurden die im Chromatogram enthaltenen Signalausschläge integriert und der Anteil des Zielproteins prozentual berechnet.

Die analytische HPLC wurde auch im Rahmen der Bestimmung der initialen Reaktionsgeschwindigkeiten einzelner Protein-Ligand-Paare verwendet um die Reaktionsausbeuten zu ermitteln (Abschnitt 5.7.3).

5.4.8 Konzentrationsbestimmung aufgereinigter Peptide

Nach der Identifikation der Fraktionen mit dem gewünschten Peptid wurden diese basierend auf ihrer Reinheit vereinigt und ihre Konzentration am UV/Vis-Spektrometer bestimmt. Die beiden im Folgenden beschriebenen Arbeitsweisen fanden auch bei der Herstellung von DMSO-Stammlösungen sowie ggf. benötigten Verdünnungen Verwendung.

5.4.8.1 Konzentrationsbestimmung von Fluoresceinisothiocyanat-markierten Peptiden

Zur Bestimmung der Konzentration von FITC-markierten Peptiden wurde die Absorption dieses Fluorophors verwendet. Da sowohl die Wellenlänge λ als auch der zugehörige molare dekadische Extinktionskoeffizient ε von FITC stark pH-Wert und Lösungsmittel abhängig sind,^{181,264} mussten die Messungen in einem speziellen FITC-Messpuffer durchgeführt werden. Außerdem wurden möglichst geringe Konzentrationen an Acetonitril und DMSO, in denen die Peptide zum Teil gelöst waren, angestrebt, indem die zu messende Lösung mindestens 1:100 in diesen Puffer verdünnt wurde.

Anschließend konnte mit Hilfe des Photospektrometers die Extinktion der Lösung in der FITC-Küvette bei 494 nm bestimmt und die Absorption einer direkt zuvor vermessenen Referenzprobe subtrahiert werden. Hierzu wurden Spektren von 480–510 nm aufgenommen und die Extinktion bei 494 nm abgelesen. Aus der so erhaltenen korrigierten Absorption konnte mit Hilfe der Formel 3 und des molaren dekadischen Extinktionkoeffizienten $\varepsilon_{494}(FITC) = 77.000 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ die molare Konzentration c_n des Fluorophors FITC in der Peptidlösung bestimmt werden.¹¹⁵

$$c_n = \frac{E_{kor} \cdot V_M}{\varepsilon_{494} \cdot V_Z} \quad (3)$$

mit c_n : Molare Konzentration; E_{kor} : Um die Referenzprobe korrigierte Extinktion; ε_{494} : Molarer, dekadischer Extinktionskoeffizient von FITC bei 494 nm; V_M : Finales Volumen bei der Messung in der Küvette; V_Z : Volumen, das von der Peptidlösung zur Messlösung zugegeben wurde.

Je nach der auf der analytischen HPLC(-MS) bei einer Wellenlänge von 440 nm^a bestimmten Reinheit R dieser Peptidlösung ergab sich nach Formel 4 die korrigierte Konzentration c_{kor} für das Zielpeptid.

$$c_{kor} = \frac{c_n}{R} \quad (4)$$

mit c_{kor} : Korrigierte molare Konzentration; c_n : Gemessene molare Konzentration; R : Reinheit.

5.4.8.2 Konzentrationsbestimmung von Peptiden ohne Fluorophor

Wenn ein Peptid nicht mit FITC modifiziert worden war, wurde seine Konzentration mit Hilfe des am C-Terminus der TAD-Sequenz angebrachten Tryptophans gemessen. Dies erfolgte analog zur Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen am Nanodrop (Abschnitt 5.3.2.4). Dazu wurde das Molekulargewicht des Peptides mit Hilfe des Programmes *ChemBioDraw* bestimmt. Der molare dekadische Extinktionskoeffizient des Tryptophan $\varepsilon_{280}(W) = 5500 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ wurde mit Hilfe des Programmes *ProtParam* ermittelt.

5.4.9 Gefriertrocknung und Lagerung aufgereinigter Peptide

Nachdem die Peptide mittels präparativer HPLC (Abschnitt 5.4.5) aufgereinigt und die Konzentration der Zielpeptid-enthaltenen Fraktionen bestimmt worden war (Abschnitt 5.4.8), wurden diese aliquotiert und gefriergetrocknet. Dafür wurden Volumina der Fraktionslösung mit einer definierten Stoffmenge (je nach Konzentration 12,5, 25, 50 oder 100 nmol) in 1,5 mL Reaktionsgefäße gefüllt, wobei jedoch maximal 800 μL verwendet wurden. Größere Volumina wurden in 15 mL Reaktionsgefäßen gefriergetrocknet. Dazu wurden die Reaktionsgefäße mit luftdurchlässigen Verschlüssen versehen, in flüssigem Stickstoff schock gefroren und in 1 L Glaskolben an die Gefriertrocknungsanlage angeschlossen. An dieser wurden die Lösungsmittel mit Hilfe eines Vakuums von ca. 0,1 bar sublimiert. In der Regel war die Trocknung nach 15 h abgeschlossen und die Peptidaliquots konnten bei -20°C gelagert werden.

^a Absorptionsmaximum von FITC im sauren Milieu der HPLC-Lösungsmittel, vgl. Abschnitte 3.4.2 und 5.7.3.

5.4.10 Ansetzen von DMSO-Stammlösungen

Um DMSO-Stammlösungen der verschiedenen Peptide anzusetzen, wurden einzelne gefriergetrocknete Aliquots (Abschnitt 5.4.9) bei RT aufgetaut und in DMSO gelöst. Dabei wurde zunächst ein DMSO-Volumen zugegeben, mit dem theoretisch die doppelte Konzentration im Vergleich zur benötigten Stammlösung hergestellt wurde.^a Die Konzentration dieser Lösung wurde bestimmt (Abschnitt 5.4.8) und die Lösung entsprechend auf die Zielkonzentration verdünnt.

^a Dieses Vorgehen war nötig, da bei der Gefriertrocknung Teile des Peptides durch das angelegte Vakuum aus dem Reaktionsgefäß gesogen werden können, sodass die tatsächlich enthaltene Stoffmenge von der zuvor eingestellten abweichen kann.

5.5 Techniken zur Analyse von nicht-kovalenten Protein-Peptid-Komplexen

5.5.1 Fluoreszenzpolarisationspektroskopie

Mit Hilfe der Fluoreszenzpolarisationspektroskopie kann die Dissoziationskonstante K_d zweier Bindungspartner ermittelt werden. Dabei wird ein Fluorophor mit polarisiertem Licht angeregt und die emittierte Strahlungsintensität, die parallel zur Anregungsrichtung und senkrecht zu dieser polarisiert ist, gemessen (Abbildung 45).²⁶⁵ Aus diesen lässt sich die Polarisation des emittierten Lichtes nach Formel 5 berechnen.^{266,267}

$$P = \frac{I_P - I_S}{I_P + I_S} \quad (5)$$

mit P : Polarisation; I_P : Gemessene Intensität von parallel zum eingestrahlenen Licht polarisiertem, emittiertem Licht; I_S : Gemessene Intensität von senkrecht zum eingestrahlenen Licht polarisiertem, emittiertem Licht.

Wenn ein Fluorophor mit polarisiertem Licht angeregt wurde, gibt er auch polarisiertes Licht wieder ab, wobei die Polarisationsrichtung, in die er dieses emittiert, u. a. von seiner Orientierung abhängig ist. Da die Fluoreszenzemission erst nach einiger Zeit (abhängig von der Lebensdauer τ des angeregten Zustandes) erfolgt, kann sich der Fluorophor in dieser Zeit auf Grund der Brown'schen Molekularbewegung drehen.^{266,267} Dadurch wird das emittierte Licht nicht in derselben Achse abgestrahlt, in der es absorbiert wurde, sondern mit einer veränderten Polarisation. Der Grad dieser Bewegung wird mit Hilfe der Formel 5 bestimmt. Da die Geschwindigkeit, in der sich der Fluorophor aus dieser Achse heraus dreht, von seiner Größe abhängt, kann man mit Hilfe der Polarisation Bindungsereignisse beobachten. Dazu wird in der Regel der kleinere der beiden Interaktionspartner mit dem Fluorophor gelabelt (hier **H-L-f**) und in konstanter Konzentration eingesetzt, während der größere Bindungspartner (hier **P**) in einer Konzentrationsreihe zugegeben wird.²⁶⁸ Bei sehr niedrigen Proteinkonzentrationen liegt der Großteil des Liganden ungebunden vor, sodass eine niedrige Polarisation gemessen wird. Mit zunehmender Proteinkonzentration werden immer mehr Liganden gebunden, sodass sich ihre Beweglichkeit verringert, was wiederum die gemessene Polarisation erhöht. Durch Auftragung der Polarisation in Abhängigkeit zur logarithmierten Konzentration des Proteins ergibt sich eine sigmoidale Bindungskurve, aus deren Wendepunkt die Dissoziationskonstante K_d ermittelt werden kann.

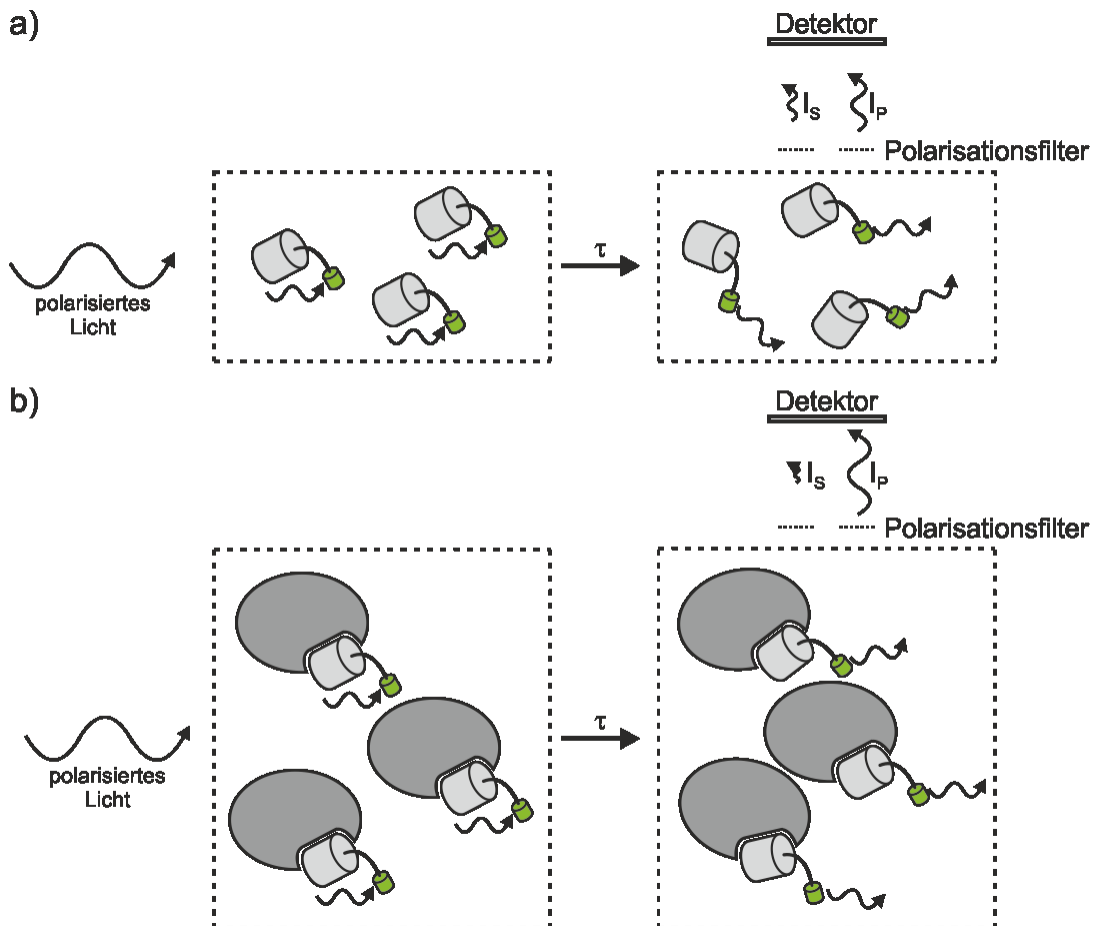


Abbildung 45: Messanordnung des Fluoreszenzpolarisationsassays. Die Probe wird mit polarisiertem Licht bestrahlt, welches von einem Fluorophor (grün) absorbiert wird. Nach der Lebenszeit τ des angeregten Zustands, wird vom Fluorophor polarisiertes Licht emittiert. Die Polarisation dieses Lichtes ist u. a. abhängig von der Orientierung des Fluorophors. Nun wird die Intensität des emittierten Lichtes, welches parallel und senkrecht zur Anregungsachse polarisiert ist, gemessen. a) Ist ein Ligand (hellgrau) mit dem Fluorophor verbunden, bewegt dieses sich relativ schnell, sodass eine geringe Polarisation gemessen wird. b) Bindet der Fluorophor-modifizierte Ligand an sein interagierendes Protein (dunkelgrau), ist die Beweglichkeit des Fluorophors stärker eingeschränkt und es wird eine höhere Polarisation gemessen.²⁶⁷

In allen Fluoreszenzpolarisationsspektroskopien wurden die zu untersuchenden Protein-Peptid-Paare in Triplikaten untersucht. Dazu wurden zunächst 20 μM DMSO-Stammlösungen der benötigten Peptide erstellt (Abschnitt 5.4.10) und anschließend mit FP-Puffer (100 mM NaCl, 50 mM HEPES pH 7.4, 0.1% Tween-20) auf 50 nM verdünnt. Parallel dazu wurden Proteinlösungen mit demselben Puffer hergestellt (Abschnitt 5.3.2.4) und auf einer Mikrotiterplatte als Verdünnungsreihe vorgelegt. Die Proteinkonzentrationen variierten dabei je nach Messtag und Proteinvariante. Die Verdünnungsschritte wurden im Verlauf dieser Arbeit optimiert. Daher finden sich im Anhang (Abschnitt 8.4.1) die genauen Konzentrationen jeder Fluoreszenzpolarisationsspektroskopie. Grundsätzlich wurden zur

Beginn der Arbeit Verdünnungsschritte von 1:3 verwendet, was ein ausgeprägtes unteres Plateau der sigmoidalen Bindungskurve zur Folge hatte. Daher wurden in späteren Assays Verdünnungen von 1:2,5 verwendet. Je nachdem welche Verdünnungsschritte verwendet wurden, ergaben sich unterschiedliche Volumina für die einzelnen Arbeitsschritte, sodass im Folgenden zwischen diesen unterschieden werden muss. Bei Verdünnungsschritten von 1:3 (1:2,5) wurden zunächst in den Reihen B-O 14 μL (10,8 μL) FP-Puffer vorgelegt. Zur Reihe O wurden 7 μL (7,2 μL) der Proteinlösungen zugegeben und anschließend durch Übertrag von je 7 μL (7,2 μL) von Reihe O zu M, Reihe M zu N, etc. die Verdünnungsreihe erstellt. Anschließend wurden in jede Kavität einer Spalte 4 μL (7,2 μL) der benötigten Peptidlösung (50 nM) zugegeben. Im Endvolumen von 21 μL (18 μL) pro Kavität war so eine Peptidkonzentration von 10 nM (20 nM) gegeben.

Nachdem die Protein- und Ligandlösungen vermischt wurden, wurde die Mikrotiterplatte kurz abzentrifugiert (300 rcf, 4°C, 1 Min.) und anschließend am Fluoreszenzdetektor vermessen, wobei eine Anregungswellenlänge von $\lambda_{ex} = 485 \text{ nm}$ und eine Emissionswellenlänge von $\lambda_{em} = 525 \text{ nm}$ verwendet wurde. Die erhaltenen Rohdaten wurden mit Hilfe der *GraphPad Prism* Software für Windows ausgewertet, indem sie zunächst logarithmiert und anschließend mit Hilfe einer nicht-linearen Regression nach der „*log(agonist) vs. response*“-Funktion analysiert wurden (Abschnitt 8.4.1). Erreichte die Bindungskurve das obere Plateau nicht in ausreichendem Maße, war eine genaue Bestimmung der Dissoziationskonstante nicht möglich. In diesem Fall gibt die Software einen Mindestwert für die Dissoziationskonstante an. Zur Überprüfung, ob sich das Bindungsgleichgewicht bei der ersten Messung bereits eingestellt hatte, wurde die Messung nach 1 Stunde, 2 Stunden und 3 Stunden wiederholt und die Dissoziationskonstanten K_d bestimmt. Vor der Messung wurde die Platte jeweils kurz zentrifugiert (300 rcf, 4°C, 1 Min.). Erst wenn sich die Dissoziationskonstante zwischen zwei Messungen nicht mehr änderten, wurden sie als reale Messwerte betrachtet.

5.6 Molekulardynamische Simulationen

5.6.1 Strukturmodifizierung für molekulardynamische Simulationen

Auf Grundlage der ersten Kernspinnresonanzspektroskopie- (NMR-)Struktur des Protein-Ligand-Komplexes im PDB-Datensatz 2LXS¹⁴⁴ wurden die Strukturen für die molekulardynamischen Simulationen mit Hilfe des Programmes *Maestro* vorbereitet. Dazu wurden die Aminosäuren S und W an den C-Terminus des Liganden angefügt, die Aminosäuren N-terminal des I₂₈₄₄ entfernt und die fünf verschiedenen Abstandshalter sowie die α -Chloramidgruppe an den N-Terminus konjugiert. Anschließend wurden die einzelnen Cysteinmutationen in das Protein eingefügt.

5.6.2 Molekulardynamische Simulationen

Alle molekulardynamische Simulationen wurden mit dem Programm *AMBER14* auf einem Grafikprozessor durchgeführt. Dabei wurde *SANDER* für die Minimierungs- und Equilibrierungsschritte verwendet und *PMEMD* für die eigentliche Berechnung.^{269–271} Die Parameter des Kraftfeldes der Abstandshalter wurden dem generellen Amber Kraftfeld (*GAFF*) entnommen,²⁷² seine Atomladungen wurden mit eingeschränkten elektrostatischen Potentialen (*RESP*) des Programmes *Gaussian09* mittels *Antechamber* berechnet.^{273,274} Die Proteinatome und strukturell gebundene Ionen wurden mit dem *ff14SB* Kraftfeld beschrieben.^{275,276} Die Protein-Ligand-Komplexe wurden mittels *LEaP* generiert und in einer oktaedrischen *TIP3P* Wasserbox mit einer Ausdehnung von mindestens 11 Å in jede Richtung vom Komplex plaziert.²⁷⁷ Ladungen wurden dabei mit Na⁺ oder Cl⁻ als Gegenionen ausgeglichen.

Die so erhaltenen gelösten Systeme wurden anschließend in zwei Schritten minimiert, um sterische Hinderungen zwischen dem Wasser und den gelösten Substanzen zu entfernen:

- 1) 50 Schritte steilsten Abfalls und 200 Schritte konjugierter Gradient Minimierung mit harmonischen Positionseinschränkungen von $25 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{Å}^{-2}$ auf alle gelösten Atome.
- 2) 50 Schritte steilsten Abfalls und 200 Schritte konjugierter Gradient Minimierung mit harmonischen Positionseinschränkungen von $5 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{Å}^{-2}$ auf alle gelösten Atome.

Anschließend erfolgten vier Schritte zur Equilibrierung des Systems:

- 1) 50 ps einer Simulation, in der Stoffmenge, Volumen und Temperatur konstant gehalten wurden (*NVT*-Simulation), um die Zieltemperatur des Thermostaten von 100 K auf 300 K zu erhöhen. Dabei wurde der Berendsen'sche Temperatur und Druck Kontrollalgorithmus mit Zeitkonstanten von 0,5 ps für Wärmebadkupplung und Druckrelaxation verwendet.
- 2) 50 ps einer Simulation, in der Stoffmenge, Volumen und Druck konstant gehalten wurden (*NPT*-Simulation). Der isotropische Druck wurde konstant bei 1 atm gehalten, um die Dichte des Systems auf $1 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$ einzustellen.
- 3) Fünf 50 ps *NVT*-Simulationen, in denen die Einschränkungen in Schritten von $1 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{Å}^{-2}$ verringert wurden.
- 4) Fünf 50 ps *NVT*-Simulationen ohne Einschränkungen.²⁷⁸

Nach Minimierung und Equilibrierung erfolgte die eigentliche Simulation über 100 ns. Hierbei wurde in 2 fs Simulationsschritten unter *NVT*-Bedingungen gearbeitet und alle 20 ps eine Momentaufnahme des Systems gespeichert. Hierbei wurde der *SHAKE*-Algorithmus verwendet, um alle Bindungen mit Wasserstoffatomen einzuschränken.²⁷⁹ Ein Radius von 8 Å wurde verwendet, um kurzreichweitige nicht-kovalente Interaktionen zu begrenzen. Langreichweitige Interaktionen wurden mit der Particle Mesh Ewald Methode behandelt.^{280,281} Die Temperatur wurde mit Hilfe des schwachen Kupplungsalgorithmus von Berendsen konstant bei 300 K gehalten.²⁷⁸

Durchschnittliche Energien wurden durch 100 ns konventioneller molekulardynamischer (cMD) Simulationen berechnet und als Referenzen für die 500 ns beschleunigter molekulardynamischer (aMD) Simulationen genutzt.²⁸² Die aMD Simulationen wurden unter denselben Bedingungen durchgeführt wie die cMD Simulationen, wobei von den equilibrierten Systemen gestartet wurde. Um die Berechnungen zu beschleunigen, wurde der *dual boost* Ansatz basierend auf getrennten totalen und torsionalen Potentialen verwendet.²⁸² Der totale Beschleunigungsparameter E_{tot} wurde auf die doppelte Anzahl aller Atome plus die durchschnittliche potentielle Energie gesetzt und α_{tot} auf die 0,2-fache Anzahl der Atome. Der torsionale Beschleunigungsparameter E_{dih} wurde auf $4 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ multipliziert mit der Anzahl der Aminosäuren im Komplex plus die durchschnittliche dihedrale Energie festgelegt und α_{dih} auf $4 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ multipliziert mit der 0,2-fachen Anzahl der Aminosäuren.

5.6.3 Auswertung der molekulardynamischen Simulationen

Die Analyse der aMD Trajektorien wurde mit Hilfe von *CPPTRAJ* durchgeführt. Eine visuelle Begutachtung der Momentaufnahmen aus den molekulardynamischen Simulationen erfolgte mittels *PyMol*. Die prozentuale Aufenthaltswahrscheinlichkeit der beiden reagierenden Atome (Schwefel aus der Cysteinseitenkette der jeweiligen Proteinvariante und α -Kohlenstoff der α -Chloracetamidgruppe des Liganden) innerhalb von 5 Å zueinander wurde durch die Berechnung von Abstandshäufigkeiten mittels *CPPTRAJ* unter Berücksichtigung aller Konformationen des jeweiligen Komplexes berechnet.^{283,284}

5.7 Techniken zur kovalenten Modifizierung von Proteinen mit Peptiden

5.7.1 Reaktivitätstest

Für den Reaktivitätstest wurden 1 mM Stammlösungen der fünf untersuchten Liganden **Cl-nL-f** in DMSO (Abschnitt 5.4.10) hergestellt. Anschließend wurden pro Protein-Liganden-Paar und Messzeitpunkt die Liganden mit Gelpermeationspuffer auf eine Konzentration von 20 μM und die Proteine mit demselben Puffer auf eine Konzentration von 40 μM in jeweils 25 μL eingestellt. Die so erhaltenen Lösungen wurden im Verhältnis 1:1 miteinander vermischt und bei 37°C inkubiert. Nach der gewünschten Reaktionszeit (1 Std. oder 6 Std.) wurden 0,5 μL TFA zugegeben und die Proben bis zu ihrer Auswertung mittels analytischer HPLC (Abschnitt 5.7.3) bei -20°C gelagert.

5.7.2 Reaktionen zur Bestimmung der initialen Reaktionsgeschwindigkeit einzelner Protein-Ligand-Paare

Zur Bestimmung des schnellsten Protein-Liganden-Paares wurden die initialen Reaktionsgeschwindigkeit der Proteinvariante **P(C638)** mit den Liganden **Cl-nL-f** ($n = 9, 13, 19$) in unabhängigen Dreifachmessungen bestimmt. Parallel wurden Messungen von **P(WT)** mit dem Liganden **Cl-9L-f** und **P(C638)** mit dem Liganden **H-9L-f** durchgeführt, um sicherzustellen, dass auf der analytischen HPLC tatsächlich nur kovalent-gebundene Reaktionsprodukte einen neuen Signalausschlag erzeugen. Messungen mit jeweils nur einem Reaktionspartner (Nukleophil oder Elektrophil) wurden vorgenommen, um mögliche Nebenreaktionen mit Puffersubstanzen zu untersuchen. Als Kontrollen für nicht-nachbarschaftsinduzierte Reaktionen wurden zum einen der Ligand **Cl-9iL-f** mit verminderter Affinität mit dem Protein **P(C638)** als auch der Ligand **Cl-9L-f** mit einem nicht-affinen Thiol, nämlich Glutathion (GSH), kombiniert. Dabei wurde mit zwei unterschiedlichen GSH-Konzentrationen gearbeitet, wobei die eine Konzentration derjenigen des Proteins **P(C638)** in den übrigen Reaktionen entsprach ($c_P = c_{GHS} = 20 \mu\text{M}$) und die andere Konzentration im Rahmen der zellulären Konzentration von GSH ($c_{GSH,Zelle} \approx 5\text{--}10 \text{ mM}$) lag.^{156,186} Für jede Messung wurden Proben nach 0,5 Min., 1 Min., 1,5 Min., 2 Min., 2,5 Min., 5 Min., 10 Min., 15 Min., 30 Min., 1 Std., 2 Std., 3 Std., 6 Std., 9 Std. und 12 Std. genommen. Auf Grund der Vielzahl der zu messenden Proben wurden alle

Reaktionen in 96er Reaktionsplatten durchgeführt und einzelne Proben in 96er Lagerplatten gequenchet.

Für die Reaktionen von Protein-Ligand-Paaren wurden analog zum Reaktivitätstest (Abschnitt 5.7.1) 1 mM Stammlösungen der Liganden in DMSO und der Proteine in Gelpermeationspuffer hergestellt. Diese wurden aliquotiert, bei -20°C (Liganden) oder -80°C (Proteine) gelagert und für alle Dreifachbestimmungen verwendet. Für jede einzelne Messung wurde der Ligand mit Reaktionspuffer 1 auf $90\ \mu\text{M}$ und das Protein auf $22,5\ \mu\text{M}$ verdünnt. Anschließend wurden diese Lösungen für 5 Minuten bei 37°C inkubiert und dann $100\ \mu\text{L}$ der Ligandlösung zu $800\ \mu\text{L}$ Proteinlösung zugegeben und durch schnelles Pipettieren für 3 Sekunden vermischt. Die finalen Konzentrationen der Reaktionspartner betragen somit $c_P = 20\ \mu\text{M}$ und $c_L = 10\ \mu\text{M}$, während das Reduktionsmittel TCEP aus dem Gelpermeationspuffer stammte und mit einer Konzentration von $c_{TCEP} = 40\ \mu\text{M}$ eingesetzt wurde. Anschließend wurden die Reaktionslösungen weiter bei 37°C inkubiert und zu definierten Zeitpunkten jeweils $53\ \mu\text{L}$ entnommen und zu $1,06\ \mu\text{L}$ vorgelegter TFA (2% im finalen Volumen) zugegeben. Die so erhaltenen Proben wurden bis zu ihrer Auswertung mittels analytischer HPLC (Abschnitt 5.7.3) bei -20°C gelagert.

Auch für die Reaktionen von GSH mit dem Liganden **CI-9L-f** wurde die zuvor hergestellte 1 mM Stammlösung in DMSO verwendet. Für die beiden verschiedenen GSH-Konzentrationen ($20\ \mu\text{M}$ und $5\ \text{mM}$) wurden Stammlösungen mit Konzentrationen von $22,5\ \mu\text{M}$ bzw. $5,625\ \text{mM}$ in GSH-Puffer hergestellt. Diese wurden aliquotiert, bei -80°C gelagert und für alle Dreifachbestimmungen verwendet. Für jede einzelne Messung wurde der Ligand mit Reaktionspuffer 1 auf $90\ \mu\text{M}$ verdünnt. Anschließend wurde diese Lösung sowie die benötigte GSH-Lösung für 5 Minuten bei 37°C inkubiert und dann $100\ \mu\text{L}$ der Ligandlösung zu $800\ \mu\text{L}$ GSH-Lösung zugegeben und durch schnelles Pipettieren für 3 Sekunden vermischt. Die finalen Konzentrationen der Reaktionspartner betrug somit $c_{GSH} = 20\ \mu\text{M}$ bzw. $c_{GSH} = 5\ \text{mM}$ und $c_L = 10\ \mu\text{M}$, während das Reduktionsmittel TCEP mit einer Konzentration von $c_{TCEP} = 40\ \mu\text{M}$ eingesetzt wurde. Anschließend wurde die Reaktionslösung weiter bei 37°C inkubiert und zu definierten Zeitpunkten jeweils $53\ \mu\text{L}$ entnommen und zu $1,06\ \mu\text{L}$ vorgelegter TFA (2% im finalen Volumen) zugegeben. Die so erhaltenen Proben wurden bis zu ihrer Auswertung mittels analytischer HPLC (Abschnitt 5.7.3) bei -20°C gelagert.

Für alle Messungen wurden zudem Proben angesetzt, die der Reaktionslösung vor der Reaktion entsprachen, indem zunächst das Doppelte der benötigten Nukleophilen-

Konzentration in 26,5 μL Reaktionspuffer eingestellt wurde. Diese Lösung wurde mit 1,06 μL TFA angesäuert, sodass die Reaktivität des Thiols herabgesetzt wurde. Anschließend wurden 26,5 μL einer 20 μM Elektrophil-Lösung zugegeben, die Lösung gründlich gemischt und bei -20°C gelagert bis sie auf der analytischen HPLC vermessen wurde.

5.7.3 Bestimmung von Reaktionsausbeuten und initialen Reaktionsgeschwindigkeiten mittels analytischer Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

5.7.3.1 Bestimmung von Reaktionsausbeuten mittels analytischer Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

Zur Bestimmung der Reaktionsausbeuten wurden 50 μL der jeweiligen Reaktionslösung in die analytischen Hochleistungsflüssigkeitschromatographen mit einem Gradienten von 30–95% des HPLC-Lösungsmittels B gegen das HPLC-Lösungsmittel A in 10 Minuten aufgetrennt. Die Detektion mittels UV/Vis-Messung erfolgte bei den Wellenlängen 210 nm und 440 nm. Dabei entspricht die Wellenlänge 210 nm dem Absorptionsmaximum der Peptidbindungen in Protein und Ligand, während bei 440 nm ein lokales Maximum der Absorption des zur Ligandmodifizierung genutzten FITC im sauren Milieu der HPLC-Lösungsmittel (0,1% TFA, pH = 0–2) liegt (Abbildung A83).^{181,182}

Der verwendete Gradient sorgte für eine ausreichende Trennung des freien Liganden **Cl-nL-f** und des entstehenden kovalenten Produktes zwischen Proteinen und Liganden, sodass die einzelnen Signalausschläge im Chromatogramm integriert werden konnten (Abbildung A84). Zur Berechnung der Reaktionsausbeute wurde die Absorption des Fluorophors heran gezogen, d. h. die bei $\lambda = 440$ nm erhaltenen Werte zueinander in Bezug gesetzt.^a Dazu wurden die Flächen unter beiden Signalausschlägen integriert, die Gesamtfläche auf 1 gesetzt und die Ausbeute des Produktes X_{L+P} bezüglich des Liganden mit Hilfe von Formel 6 berechnet (Tabelle A7 sowie Tabelle A9 bis Tabelle A14).

^a Da sowohl Protein als auch Ligand bei 210 nm absorbieren, konnten die bei dieser Wellenlänge erhaltenen Signalausschläge nicht zur Auswertung genutzt werden, da die Anteile der Absorption beider Edukte im Signalausschlag des Produktes nicht eindeutig bestimmt werden konnten. Dieses Chromatogramm diente daher nur einer visuellen Abschätzung, ob in allen untersuchten Messungen das gewünschte Verhältnis zwischen Protein und Ligand vorlag.

$$X_{P-L} = \frac{A_{P-L}}{A_L + A_{P-L}} \quad (6)$$

mit X_{P-L} : Ausbeute bezüglich des jeweils eingesetzten Liganden **Cl-nL-f**; A_{P-L} : Bei $\lambda = 440$ nm integrierte Fläche unter dem Signalausschlag des Produktes; A_L : Bei $\lambda = 440$ nm integrierte Fläche unter dem Signalausschlag des Liganden.

Bei Protein-Ligand-Paaren mit einer sehr langsamen Reaktionsgeschwindigkeit oder bei der Messung von Reaktionsausbeuten mit niedrigen Konzentrationen an Glutathion (GSH) traten Nebenprodukte des Liganden auf, die sehr wahrscheinlich durch seine Hydrolyse oder durch unerwartete Reaktion mit den Pufferbestandteilen TCEP und 4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonsäure (HEPES) entstanden. Die Fläche dieser Nebenprodukte wurde in jedem Fall integriert, jedoch nur bei einem Anteil über 2% an der Gesamtfläche (Detektionslimit der analytischen HPLC, entspricht 10 pmol FITC) in diese mit eingerechnet.

5.7.3.2 Abschätzung von initialen Reaktionsgeschwindigkeiten im Rahmen des Reaktivitätstests

Aus den nach Formel 6 erhaltenen Ausbeuten jedes Protein-Ligand-Paares zu verschiedenen Messzeitpunkten wurde im Falle des Reaktivitätstests (Abschnitt 5.7.1) die initiale Reaktionsgeschwindigkeit v_u nach Formel 7 abgeschätzt.

$$v_u \approx \frac{X_L \cdot c_L}{t} \quad (7)$$

mit v_u : Abgeschätzte initiale Reaktionsgeschwindigkeit; X_L : Ausbeute bezüglich des jeweils eingesetzten Liganden **Cl-nL-f**, c_L : Startkonzentration des Liganden in nM, t : Zeit der Umsatzbestimmung in Sek..

Hierbei mussten je nach Reaktionsgeschwindigkeit unterschiedliche Annahmen getroffen werden, die im Folgenden dargelegt sind.

1) Quantitative Ausbeute nach 1 Stunde

War die Ausbeute der Reaktion bereits nach 1 Stunde quantitativ, konnte lediglich eine Mindestgeschwindigkeit v_{min} der Reaktion bestimmt werden. Diese ergibt sich laut Formel 7 mit $X_L = 1$, $c = 10.000$ nM, $t = 3600$ Sek. zu $v_{min} = 2,7 \text{ nM} \cdot \text{s}^{-1}$.

2) Ausbeute nach 1 Stunde < 100%:

Lag die Ausbeute der Reaktion nach 1 Stunde unter 100%, war eine exakte Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeit mit einem einzelnen Messpunkt, der teilweise oberhalb des für kinetische Berechnungen als linear geltenden Bereichs von 30% Ausbeute lag,¹⁸³ nicht

möglich. Dennoch konnte mit Hilfe der Formel 7 eine ungefähre Reaktionsgeschwindigkeit abgeschätzt werden (Tabelle A8).

3) Ausbeute nach 6 Stunden < 0

Konnte im Reaktivitätstest nach 6 Stunden kein Produkt detektiert werden, wurde eine Maximalgeschwindigkeit v_{max} bestimmt. Diese ergibt sich laut Formel 7 mit $X_L = 0,016$, $c = 10.000 \text{ nM}$ und $t = 3600 \text{ Sek.}$ zu $v_{max} = 0,0\bar{4} \text{ nM} \cdot \text{s}^{-1}$.

5.7.3.3 Berechnung von initialen Reaktionsgeschwindigkeiten

Zur Bestimmung der initialen Reaktionsgeschwindigkeiten (Abschnitt 5.7.2) wurde zunächst mit Hilfe der Formel 6 die Ausbeute in jeder einzelnen Probe ermittelt (Tabelle A9 bis Tabelle A14). Da für kinetische Berechnungen von initialen Reaktionsgeschwindigkeiten nur Ausbeuten von weniger als 30% für lineare Auftragungen verwendet werden,¹⁸³ wurden nur diese Werte berücksichtigt und mit Hilfe der Software *GraphPad Prism* ausgewertet. Hierzu wurden zunächst alle benötigten Werte in Triplikaten in die Auswertungstabelle eingetragen und eine Ausgleichsgerade erstellt (Abbildung A86). Aus der Steigung m dieser Gerade, ließ sich mit Hilfe der Formel 8 die initiale Reaktionsgeschwindigkeit v berechnen.

$$v = \frac{c_L \cdot m}{t} \quad (8)$$

mit v : Initiale Reaktionsgeschwindigkeit in $\text{nM} \cdot \text{Sek.}^{-1}$; c_L : Startkonzentration des Liganden (10000 nM); m : Steigung der in *GraphPad Prism* erstellten Ausgleichsgeraden; $t = 60 \text{ Sek.}$

Die Messunsicherheit Δv der so erhaltenen initialen Reaktionsgeschwindigkeit wurde mit Hilfe einer Gauß'schen Fehlerfortpflanzung aus dem Fehler Δm der in *GraphPad Prism* erstellten Ausgleichsgeraden nach Formel 9 ermittelt.

$$\Delta v = \sqrt{\left[\left(\frac{c_L}{t}\right) \cdot \Delta m\right]^2 + \left[\left(\frac{m}{t}\right) \cdot \Delta c_L\right]^2 + \left[\left(\frac{c_L \cdot m}{-t^2}\right) \cdot \Delta t\right]^2} \quad (9)$$

mit Δv : Messunsicherheit der initialen Reaktionsgeschwindigkeit; c_L : Startkonzentration des Liganden (10.000 nM), $t = 60 \text{ Sek.}$; Δm : Fehler der in *GraphPad Prism* erstellten Ausgleichsgeraden; m : Steigung der in *GraphPad Prism* erstellten Ausgleichsgeraden; Δc_L : Messunsicherheit der Startkonzentration des Liganden (festgelegt auf 200 nM); Δt : Messunsicherheit des Messzeitpunktes (festgelegt auf 2 Sek.).

Um die einzelnen initialen Reaktionsgeschwindigkeiten miteinander zu vergleichen, wurde anschließend die relative Geschwindigkeit $r_{rel.}$ aller Reaktionen in Bezug auf die nicht-nachbarschaftsinduzierte Reaktion des Liganden **CI-9L-f** ($c_L = 10 \mu\text{M}$) mit GSH

($c_{GSH} = 20 \mu\text{M}$) nach Formel 10 berechnet. Die Messungenauigkeit Δr_{rel} wurde nach Formel 11 ermittelt.

$$v_{rel.} = \frac{v}{v_{GSH}} \quad (10)$$

mit $v_{rel.}$: skalierte Geschwindigkeit der Reaktion in Bezug zur Reaktion von **CI-9L-f** ($c_L = 10 \mu\text{M}$) mit GSH ($c_{GSH} = 20 \mu\text{M}$); v = Initiale Reaktionsgeschwindigkeit der untersuchten Reaktion; v_{GSH} : Initiale Reaktionsgeschwindigkeit der Reaktion von **CI-9L-f** ($c_L = 10 \mu\text{M}$) mit GSH ($c_{GSH} = 20 \mu\text{M}$) mit $v_{GSH} = 0.0036 \text{ nM} \cdot \text{s}^{-1}$.

$$\Delta v_{rel.} = \frac{\Delta v}{v_{GSH}} \quad (11)$$

mit $\Delta r_{rel.}$: skaliertes Fehler der Reaktion in Bezug zur Reaktion von **CI-9L-f** ($c_L = 10 \mu\text{M}$) mit GSH ($c_{GSH} = 20 \mu\text{M}$); Δv : Messungenauigkeit der initialen Reaktionsgeschwindigkeit der untersuchten Reaktion; v_{GSH} : Initiale Reaktionsgeschwindigkeit der Reaktion von **CI-9L-f** ($c_L = 10 \mu\text{M}$) mit GSH ($c_{GSH} = 20 \mu\text{M}$) mit $v_{GSH} = 0.0036 \text{ nM} \cdot \text{s}^{-1}$.

5.7.4 Analytische Hochleistungsflüssigkeitschromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie des Konjugates P(C638)-9L-f

Um das Protein-Ligand-Konjugat **P(C638)-9L-f** mittels analytischer HPLC-MS zu untersuchen, wurden die 1 mM Stammlösungen des Liganden in DMSO und des Proteins in Gelpermeationspuffer mit Reaktionspuffer 1 auf $20 \mu\text{M}$ (Ligand) bzw. $40 \mu\text{M}$ (Protein) in $25 \mu\text{L}$ verdünnt und miteinander vermischt. Nach einer einstündigen Inkubation bei 37°C wurde die Reaktion durch Zugabe von $0,5 \mu\text{L}$ TFA (1%) abgebrochen, die Lösung vollständig in die analytische HPLC-MS injiziert, mit einem Gradienten von 30–95% des HPLC-Lösungsmittels B gegen das HPLC-Lösungsmittel A in 20 Minuten aufgetrennt und in der Masse analysiert (Abbildung A87).

5.7.5 Tryptischer *In-Gel*-Verdau und analytische Hochleistungsflüssigkeitschromatographie gekoppelt mit Tandem-Massenspektrometrie des Protein-Ligand-Konjugates P(C638)-9L-f

5.7.5.1 Probenvorbereitung

Um das Konjugat **P(C638)-9-L** zu erhalten wurden zunächst aus den 1 mM Stammlösungen für die Reaktionen zur Bestimmung der initialen Reaktionsgeschwindigkeiten (Abschnitt 5.7.2) je 5 μL einer 200 μM Ligandlösung sowie einer 100 μM Proteinlösung in Reaktionspuffer 1 erstellt. Diese wurden miteinander vermischt, für 1 Stunde bei 37°C inkubiert und anschließend durch Zugabe von 2 μL 5x SDS-Probenpuffer und Erhitzen auf 95°C für 5 Minuten denaturiert. Zusätzlich wurden je 10 μL einer 50 μM Lösung der Proteine **P(WT)** und **P(C638)** in Reaktionspuffer 1 angesetzt, mit 2 μL 5x SDS-Probenpuffer versetzt und durch Erhitzen auf 95°C für 5 Minuten denaturiert. Als weitere Kontrolle wurde eine 10 μL BSA-Probe ($c = 0,5 \mu\text{M}$, $n = 5 \text{ pmol}$) hergestellt und mit 2 μL 5x SDS-Probenpuffer vermischt. Anschließend wurden alle Proben auf ein 17%–iges SDS-Polyacrylamidgel (Abschnitt 5.3.5.2) aufgetragen und für 1,5 Stunden bei 100 V und RT aufgetrennt, bevor das Gel mit Hilfe der Coomassie-Färbelösung angefärbt wurde (Abschnitt 5.3.5.4, Abbildung A88).

5.7.5.2 Tryptischer *In-Gel*-Verdau

Der tryptische *In-Gel*-Verdau wurde wie für die unmodifizierten Proteinvarianten beschrieben durchgeführt (Abschnitt 5.3.8.2).

5.7.5.3 Analytische Nano-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie gekoppelt mit Tandem-Massenspektrometrie

Zur Proteinidentifikation wurden die tryptischen Peptide mit Hilfe einer nano-HPLC aufgetrennt und mittels MS^2 analysiert. Dazu wurden die Proben in 20 μL HPLC-Lösungsmittel A gelöst und 3 μL dieser Lösung mit einer Flussrate von 30 $\mu\text{L} \cdot \text{Min}^{-1}$ desselben Lösungsmittels auf eine Vorsäulenkartusche injiziert. Zur Entsalzung wurde diese Kartusche für 5 Minuten mit HPLC-Lösungsmittel A gespült, ehe die Probe von der Kartusche auf die Trennsäule zurückgespült wurde, wo sie mit einem Gradienten von 5–30%

des HPLC-Lösungsmittels D gegen das HPLC-Lösungsmittel C innerhalb von 95 Minuten mit einer Flussrate von $300 \text{ nL} \cdot \text{Min}^{-1}$ aufgetrennt wurde.

Das Quadrupol-Orbitrap Massenspektrometer nahm einen Massenbereich von $m/z = 300\text{--}1650$ mit einer Auflösung von 70.000 für den „full scan“-Modus auf, gefolgt von bis zu zehn MS^2 -Scans der intensivsten, mindestens doppelt-geladenen Ionen, für die diese mittels kollisionsinduzierter Dissoziation fragmentiert wurden.

Die Datenanalyse wurde mit Hilfe der *MaxQuant* Software durchgeführt,¹⁶³ wobei mit dem *Andromeda* Suchalgorithmus sowohl das humane und *E. coli* Referenzproteom der *Uniprot* Datenbank als auch eine Datenbank mit Kontaminationen und eine *FASTA*-Datei mit den Sequenzen für die beiden Proteinvarianten **P(WT)** und **P(C638)** sowie für das Protein-Ligand-Konjugat **P(C638)-9L-f** durchsucht wurden. Dabei wurden folgende Einstellungen verwendet: Für den tryptischen Verdau wurden zwei falsche/fehlende Schnittstellen erlaubt. Als mögliche Proteinmodifikationen wurden Oxidationsprodukte des Methionins sowie die Acetylierung des *N*-Terminus und die Carbamidomethylierung von Cysteinen erlaubt. Um das Konjugat mit Hilfe der automatischen Analyse zu finden wurden außerdem die beiden möglichen Modifikationen des Cysteins in **P(C638)** durch den Liganden **CI-9L-f** eingefügt (Abbildung A89):

- 1) Die Modifikation eines Cysteins mit dem vollständigen Liganden, d. h. mit der formalen Addition von $\text{C}_{128}\text{H}_{179}\text{N}_{25}\text{O}_{35}\text{S}$, was einem Massenzuwachs von $2658,2716 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ entspricht.
- 2) Die Modifikation eines Cysteins mit einem durch Trypsin verdauten Liganden, da dieser in seiner Sequenz ebenfalls eine Schnittstelle aufweist. Der nach dem Schnitt am Protein verbleibende Rest entspricht der formalen Addition von $\text{C}_{74}\text{H}_{129}\text{N}_{14}\text{O}_{22}$ an das modifizierte Cystein, was einem Massenzuwachs von $1556,8702 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ entspricht.

Die Massengenauigkeit für MS-Spektren wurde auf 5 ppm und die für MS^2 -Messungen auf 20 ppm gesetzt. Die „false discovery rate“ für die Peptid- und Proteinidentifikation wurde auf 1% gesetzt. In der Arbeit gezeigte Massenspektren wurden direkt aus den Rohdaten entnommen.

5.7.6 Markierungsexperimente in Zelllysaten

5.7.6.1 Markierungsexperimente in *Escherichia coli*-Zelllysaten

Für die Markierungsexperimente in *E. coli*-Zelllysaten wurden zunächst 5 mL LB-Medium ohne Antibiotikum mit einem Aliquot chemisch kompetenter *E. coli* BL21 gold DE3 Zellen angeimpft und für 15 Stunden bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension abzentrifugiert (5x 1 mL bei 16.000 rcf, 4°C für 5 Min.) und der erhaltene Rückstand in 1 mL Reaktionspuffer 2 resuspendiert. Die Zellen wurden mit Hilfe des Ultraschall-Zelldisruptors aufgeschlossen, indem sie zweimal für 10 Sekunden einer Amplitude von 10% ausgesetzt wurden. Anschließend wurde die Proteinkonzentration des Lysates ermittelt (Abschnitt 5.3.2.4) und das Lysat aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schock gefroren und bei –80°C gelagert.

Für die Markierungsreaktion im Lysat wurde zunächst aus der 1 mM DMSO-Stammlösung des Liganden **Cl-9L-f** eine Reaktionslösung mit einer Konzentration von 80 µM im Reaktionspuffer 2 angesetzt. Zusätzlich wurden Lysat-Protein-Mischungen mit einer Gesamtproteinkonzentration von 10 mg·mL⁻¹ und einer Konzentration von 22,9 µM des Proteins **P(WT)** oder **P(C638)** erstellt. Die drei Lösungen wurden für 5 Minuten bei 37°C vorgewärmt, ehe je 10 µL der Peptidlösung zu 70 µL der Lysat-Protein-Mischungen zugegeben und bei 37°C inkubiert wurde. Aus dieser Lösung wurden zu definierten Zeitpunkten (0,5 Min., 1 Min., 1,5 Min., 2 Min., 2,5 Min., 5 Min., 10 Min., 15 Min., 30 Min., 1 Std., 2 Std., 3 Std.) 5 µL Aliquots entnommen, mit 1 µL 5x SDS-Probenpuffer vermischt, für 5 Minuten bei 95°C denaturiert und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

Als Kontrolle für die Bandenlage des kovalenten Protein-Ligand-Konjugates **P(C638)-9L-f** wurde eine 20 µL Reaktionslösung erstellt, in der die Konzentration des Liganden auf 10 µM und die des Proteins **P(C638)** auf 20 µM in Reaktionspuffer 2 eingestellt wurde. Diese wurde für 1 Stunde bei 37°C inkubiert, mit 2 µL 5x SDS-Probenpuffer vermischt, für 5 Minuten bei 95°C denaturiert und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

Nachdem alle Proben gewonnen worden waren, wurden 17%-ige denaturierende SDS-Polyacrylamidgele mit je 2,5 µL der Proben beladen, wobei jedes Gel den Proteingrößenstandard und die Kontrollreaktion für die Bandenlage des Konjugates **P(C638)-9L-f** enthielt. Die Proben wurden chronologisch aufgetragen und bei 100 V und RT

für 1,5 h auf den Gelen aufgetrennt, ehe diese zunächst mit Hilfe des Fluoreszenzscanners für Polyacrylamidgele analysiert (Abschnitt 5.3.5.3) und anschließend mit einer Zink-Imidazol-Färbung (Abschnitt 5.3.5.5) angefärbt wurden.

5.7.6.2 Markierungsexperimente in Hek293-Zelllysaten

Für die Markierungsexperimente in Hek293-Zelllysaten wurden Zelllysate der monoklonale Zelllinien verwendet, in denen **P(WT)-mCherry** und **P(C638)-mCherry** exprimiert wurden (Abschnitt 5.8.6). Von allen Zelllinien wurden Lysate aus je 10 Zellkulturplatten erstellt (Abschnitt 5.8.5), aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Nachdem die mCherry-Konzentration in den Lysaten bestimmt worden war (Abschnitt 5.3.3), wurden diese mit Reaktionspuffer 2 auf eine mCherry-Konzentration von $2\ \mu\text{M}$ in $65\ \mu\text{L}$ verdünnt. Zusätzlich wurde der Ligand **Cl-9L-f** aus der $1\ \text{mM}$ DMSO-Stammlösung mit Reaktionspuffer 2 auf $100\ \mu\text{M}$ verdünnt. Nach einer fünfminütigen Inkubation bei 37°C wurden jeweils $0,65\ \mu\text{L}$ dieser Ligandlösung zu jedem Lysat zugegeben, sodass der Ligand in einer finalen Konzentration von $1\ \mu\text{M}$ vorlag.^a Die Lysate wurden bei 37°C inkubiert und zu definierten Zeitpunkten (0,5 Min., 1 Min., 1,5 Min., 2 Min., 2,5 Min., 5 Min., 10 Min., 15 Min., 30 Min., 1 Std., 2 Std., 3 Std.) wurden $5\ \mu\text{L}$ Aliquots entnommen, mit $1\ \mu\text{L}$ 5x SDS-Probenpuffer vermischt, für 5 Minuten bei 95°C denaturiert und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

Als Kontrolle für die Bandenlage des kovalenten Protein-Ligand-Konjugates **P(C638)-9L-f-mCherry** wurde eine $10\ \mu\text{L}$ Reaktionslösung erstellt, in der die Konzentration des Liganden auf $2\ \mu\text{M}$ und die des Proteins **P(C638)-mCherry** auf $4\ \mu\text{M}$ in Reaktionspuffer 2 eingestellt wurde. Diese wurde für 1 Stunde bei 37°C inkubiert, mit $2\ \mu\text{L}$ 5x SDS-Probenpuffer vermischt, für 5 Minuten bei 95°C denaturiert und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

Nachdem alle Proben gewonnen worden waren, wurden 12%–ige denaturierende SDS-Gele mit den Proben beladen, wobei jedes Gel den Proteingrößenstandard und die Kontrolle für die Bandenlage des Konjugates **P(C638)-9L-f-mCherry** enthielt. Die Proben wurden chronologisch aufgetragen und bei $100\ \text{V}$ und RT für 1,5 h auf den Gelen aufgetrennt, ehe

^a Da die Cherry-Konzentration in den Lysaten sehr gering war, wurde auch die Konzentration des Liganden verringert, um weiterhin bei dem in den Reaktionen zur Bestimmung der initialen Reaktionsgeschwindigkeiten verwendeten Protein-Ligand-Verhältnisses von 2:1 zu arbeiten.

diese zunächst mit Hilfe des Fluoreszenzscanners für Polyacrylamidgele (Abschnitt 5.3.5.3) und anschließend mit einer Zink-Imidazol-Färbung (Abschnitt 5.3.5.5) angefärbt wurden.

5.7.7 Pulldown-Experimente

5.7.7.1 Pulldown der aufgereinigten Proteine P(WT) und P(C638)

Um das neue Pulldown-System zu etablieren, wurde zunächst mit den in *E. coli* exprimierten und vollständig aufgereinigten Proteinen **P(WT)** und **P(C638)** gearbeitet (Abschnitt 5.3.1). Dabei wurden diverse Proben und Kontrolllösungen erstellt (Tabelle 44).

Tabelle 44: Zusammensetzung der Proben und Kontrollansätze für den Pulldown mit den aufgereinigten Proteinen **P(WT)** und **P(C638)**.

Probe	Trägermaterial	Protein	Ligand
Kontrolle P(C638)	nein	P(C638)	-
Kontrolle P(C638)-9L-bt	nein	P(C638)	Cl-9L-bt
P(C638) -1	ja	P(C638)	-
P(C638) -2	ja	P(C638)	H-9L-bt
P(C638) -3	ja	P(C638)	Cl-9L-bt
P(C638) -4	ja	P(C638)	Cl-9iL-bt
Kontrolle P(WT)	nein	P(WT)	-
Kontrolle P(WT)+Cl-9L-bt	nein	P(WT)	Cl-9L-bt
P(WT) -1	ja	P(WT)	-
P(WT) -3	ja	P(WT)	Cl-9L-bt

Bei den Pulldown-Experimenten wurden zunächst für jede Probe 100 μ L STV-Dynabeads M-280 nach Anleitung des Herstellers mit dem Pulldownpuffer equilibriert. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Proben in 50 μ L dieses Puffers resuspendiert.

Um die Liganden **Cl-9L-bt**, **H-9L-bt** und **Cl-9iL-bt** auf dem Trägermaterial zu immobilisieren wurden jeweils 1000 pmol des benötigten Liganden zu den Kügelchen zugegeben. Dazu wurde zunächst eine 1 mM Stammlösung der Liganden in DMSO hergestellt (Abschnitt 5.4.10) und mit Pulldownpuffer auf eine Konzentration von 20 μ M in 50 μ L verdünnt. Diese Lösung wurde mit der Polymerkügelchen-Suspension vermischt und für 30 Minuten bei 12°C vorsichtig auf dem Rotator invertiert (2 rpm). Anschließend wurden die Kügelchen nach Anleitung des Herstellers je dreimal mit 500 μ L Pulldownpuffer gewaschen und in 50 μ L resuspendiert.

Zur Immobilisierung der Proteine an den Ligand-modifizierten Kügelchen, wurden je 50 μ L einer 20 μ M Proteinlösung pro Kügelchen-Ansatz hergestellt, indem die 1 mM Stammlösung in Gelpermeationspuffer mit Pulldownpuffer entsprechend verdünnt wurde.

Diese Lösung wurde zu den Kügelchen zugegeben und für 30 Minuten bei 12°C vorsichtig invertiert (2 rpm). Danach wurden die Kügelchen erneut je dreimal mit 500 µL Pulldownpuffer gewaschen.

Zur Elution wurden die Kügelchen mit 8 µL der PD-Elutionslösung 4 bei 95°C für 5 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Proben abgekühlt, die Kügelchen magnetischem abgetrennt, der Überstand mit 2 µL 5x SDS-Probenpuffer gemischt und für 5 Minuten bei 95°C erhitzt.

Als Kontrollen für die eingesetzte Proteinmenge wurden Lösungen der beiden aufgereinigten Proteine sowie der Proteine **P(C638)** und **P(WT)**, die mit dem Liganden **CI-9L-bt** inkubiert worden waren, verwendet. Um diese Kontrollen herzustellen, wurde zunächst die Stoffmenge n_p des Protein ermittelt, die theoretisch an die verwendete Kügelchen-Menge binden kann. Hierzu wurde die Angabe des Herstellers zur Bindekapazität BK_A von biotinylierten Antikörpern ($10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) verwendet. Da diese Antikörper in etwa dasselbe Molekulargewicht wie die Zielproteine besitzen, kann angenommen werden, dass seine Bindekapazität BK_P einen ähnlichen Wert hat. Mit Hilfe der Formel 12 lässt sich so die Stoffmenge n_p des Zielproteins, die an 100 µL der vom Hersteller erhaltenen Kügelchen-Suspension bindet, zu 200 pmol berechnen.

$$n_p = \frac{V_B \cdot BK_P}{M} \quad (12)$$

mit n_p : Stoffmenge der Zielproteine, die an die Kügelchen binden kann; V_B : Volumen des aus der vom Hersteller gelieferten Kügelchen-Suspension entnommenen Aliquots mit $V_B = 100 \mu\text{L}$; BK_P : Bindekapazität der Zielproteine an die Kügelchen mit $BK_P = 10 \text{ pg}/\mu\text{L}$; M : Molekulargewicht der Zielproteine mit $M = 10,5 \text{ kDa}$.

Auf Basis dieser Berechnungen wurden die vier benötigten Kontrolllösungen wie folgt hergestellt: Für die Kontrollen mit den reinem Proteinen wurden 8 µL einer 25 µM Lösung in Pulldownpuffer hergestellt. Für die Kontrollen, die mit dem Liganden inkubiert werden sollten, wurden 8 µL einer Lösung mit einer Proteinkonzentration von $c_p = 25 \mu\text{M}$ und einer Ligandkonzentration von $c_L = 100 \mu\text{M}$ hergestellt und bei 37°C für 1 Stunde inkubiert, um einen vollständigen Reaktionsumsatz zu erhalten. Anschließend wurde zu allen vier Kontrollen 2 µL 5x SDS-Probenpuffer zugegeben und die Proben wurden für 5 Minuten bei 95°C erhitzt.

Zur Analyse des Pulldowns wurden von jeder der erstellten Proben 2 µL auf ein 17%-iges SDS-Polyacrylamidgel (Abschnitt 5.3.5.2) aufgetragen und bei 100 V und RT für

1,5 Stunden elektrophoretisch aufgetrennt. Das Gel wurde anschließend mit einer Commassie-Färbelösung visualisiert (Abschnitt 5.3.5.4, Abbildung 32).

5.7.7.2 Pulldown von P(WT)-mCherry- und P(C638)-mCherry-Konjugaten aus Hek293-Zelllysaten

Für die Pulldownexperimente mit Hek293-Zelllysaten wurden Aliquots der Lysate genutzt, die bereits für die Markierungsexperimente in Hek293-Zelllysaten (Abschnitt 5.7.6.2) verwendet worden waren. Zusätzlich zu den Pulldownproben mit STV-Kügelchen wurden Kontrollen bezüglich der eingesetzten Lysatmengen erstellt (Tabelle 45).

Tabelle 45: Zusammensetzung der Proben und Kontrollansätze für den Pulldown aus Hek293-Zelllysaten mit endogen exprimierten Fusionsproteinen **mCherry-P(WT)** und **mCherry-P(C638)**.

Probe	Trägermaterial	Protein	Ligand
Kontrolle P(C638)	nein	P(C638)	-
P(C638) -1	ja	P(C638)	-
P(C638) -2	ja	P(C638)	H-9L-bt
P(C638) -3	ja	P(C638)	CI-9L-bt
P(C638) -4	ja	P(C638)	CI-9iL-bt
Kontrolle P(WT)	nein	P(WT)	-
P(WT) -1	ja	P(WT)	-
P(WT) -3	ja	P(WT)	CI-9L-bt

Da die Pulldown-Experimente mit dem Konjugat des fluoreszierenden Proteins mCherry durchgeführt wurden, wurden zwei verschiedenen Detektionsmethoden angewendet. Zum einen wurden die Proben mittels SDS-PAGE mit anschließendem Western Blot und zum anderen mit Hilfe einer nativen PAGE analysiert.

Pulldowns aus Hek293-Zelllysaten mit denaturierender Detektion

Bei den Pulldown-Experimenten aus Hek293-Zelllysaten mit denaturierender Detektion wurden zunächst für jede Probe 400 μ L STV-Dynabeads M-280 nach Anleitung des Herstellers mit dem Pulldownpuffer equilibriert. Nach dem letzten Waschschrift wurden 400 μ L einer 10 μ M Ligandlösung zugegeben. Diese wurde aus der 1 mM DMSO-Stammlösung des jeweiligen Liganden mit Pulldownpuffer hergestellt. Die erhaltene Kügelchen-Suspension wurde für 30 Minuten bei 12°C vorsichtig mit dem Rotator invertiert (2 rpm). Anschließend wurden die Kügelchen nach Anleitung des Herstellers je dreimal mit 500 μ L Pulldownpuffer gewaschen und in 200 μ L resuspendiert.

Zur Immobilisierung der Proteine an den Ligand-modifizierten Kügelchen wurden je 200 μL Lysatlösung hergestellt, welche auf eine mCherry-Konzentration von 2 μM mit Reaktionspuffer 2 eingestellt wurde (Abschnitt 5.3.2.4). Die Lysatlösung wurde zu der Kügelchen-Suspension zugegeben und für 3 Stunden bei 12°C vorsichtig invertiert (2 rpm). Danach wurden die Kügelchen erneut je dreimal mit 500 μL Pulldownpuffer gewaschen. Als Kontrollen für die eingesetzte Lysatmenge wurden 16 μL Proben angesetzt, die 1% des zuvor verwendeten Lysatvolumens enthielten.

Für die denaturierende Analyse wurden die Kontrolllösungen mit 4 μL 5x SDS-Probenpuffer und die Kügelchen mit 20 μL 1x SDS-Probenpuffer vermischt. Danach wurden alle Lösungen/Suspensionen für 10 Minuten bei 95°C inkubiert und die Hälfte des Überstand (10 μl) auf ein 12%-iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen (Abschnitt 5.3.5.2). Die Proben wurden für 1,5 Stunden bei 100 V und RT aufgetrennt und das Gel mit der reversiblen Zink-Imidazol-Färbung (Abschnitt 5.3.5.5) visualisiert. Anschließend wurde mit Hilfe eines Western Blots (Abschnitt 5.3.6) das Protein mCherry detektiert. Hierzu wurden der primäre Antikörper gegen mCherry und der sekundäre Antikörper gegen das Maus-IgG, welcher mit der alkalischen Phosphatase fusioniert war, verwendet (vgl. Tabelle 41, Abschnitt 5.3.6).

Pulldowns mit nativer Detektion

Die Immobilisierung der Liganden an die Kügelchen erfolgte wie für die Pulldowns mit denaturierender Detektion, es wurden allerdings die Desthiobiotinvarianten der Liganden, d. h. **Cl-9L-dtb**, **H-9L-dtb** und **Cl-9iL-dtb**, anstelle der biotinylierten Liganden verwendet.

Zur Immobilisierung der Proteine an den Ligand-modifizierten Kügelchen wurden je 200 μL Lysatlösung hergestellt, in welcher die mCherry-Konzentration mit Pulldownpuffer auf 2 μM eingestellt wurde. Die Lysatlösung wurde zu der Kügelchen-Suspension zugegeben und für 3 Stunden bei 12°C vorsichtig am Rotator invertiert (2 rpm). Danach wurden die Kügelchen wie bereits beschrieben gewaschen. Als Kontrollen für die eingesetzte Lysatmenge wurden auch hier Proben angesetzt, die 1% des zuvor verwendeten Lysatvolumens enthielten, jedoch betrug ihr Volumen dieses Mal 20 μL und sie wurden anschließend noch mit 5 μL 50% Glycerin-Lösung vermischt.

Zur Elution der Proteine von den Kügelchen wurden 20 μL PD-Elutionslösung 4 zugegeben und die Suspensionen für 15 Minuten bei RT inkubiert. Anschließend wurde der Überstand mit 5 μL Glycerin-Lösung vermischt.

Die Proben wurden für 2 Stunden bei 100 V unter Kühlung mit einem Eisbad auf einem nativen 12%–igen Polyacrylamidgel (Abschnitt 5.3.5.1) aufgetrennt und das Gel mit Hilfe des Fluoreszenzscanners für Gele visualisiert (Abschnitt 5.3.5.3).

5.8 Techniken zur Kultivierung und Manipulation von humanen Zellen

Im Verlaufe dieser Arbeit wurden diverse menschliche Zelllinien, welche alle von der Arbeitsgruppe von Dr. S. Hennig bezogen wurden, kultiviert und manipuliert. Die Zelllinien wurden jeweils in Medien analog zu ihren Wachstumsbedingungen kultiviert (Tabelle 46). Vor ihrer Verwendung wurden – soweit nicht anders vermerkt – alle Lösungen und Medien auf RT aufgewärmt. Während der Kultivierung und der verschiedenen Experimente wurden die humanen Zellen – soweit nicht anders vermerkt – im CO₂-Inkubator der Zellkultur mit einer konstanten CO₂-Konzentration von 5% inkubiert. Da Zellkulturmedien intrinsisch eine gute Nährlösung darstellen, sind diese stets in Gefahr von Bakterien, Hefen, Pilzen etc. bewachsen zu werden. Um solche Kontaminationen zu vermeiden, wurde bei der Handhabung von humanen Zellen stets unter sterilen Bedingungen gearbeitet, d. h. alle Lösungen und Geräte wurden steril erworben oder vor ihrer Verwendung autoklaviert und es wurde nur mit desinfizierten Handschuhen gearbeitet.

Tabelle 46: Liste der in dieser Arbeit untersuchten Zelllinien, ihres Ursprungsgewebes und ggf. der zugrunde liegenden Erkrankung, durch die die jeweilige Zelllinie entstanden ist. Auch das Zellkulturmedium, in dem die Zellen kultiviert wurden, ist angegeben. ^{a)} Diese Zelllinien wurden von der Arbeitsgruppe Hennig bezogen. ^{b)} Diese Zelllinien wurden im Verlauf dieser Arbeit erzeugt.

Zelllinie	Gewebe	Erkrankung	Zellkulturmedium
A549 ^{a)}	Lunge	Bronchialkarzinom	2
BJ ^{a)}	Vorhaut	-	1
DU145 ^{a)}	Prostata	Karzinom	1
HCT116 ^{a)}	Kolon	Karzinom	1
HeLa ^{a)}	Gebärmutter	Adenokarzinom	1
Hek293 ^{a)}	Niere	-	1
Hek293-mCherry ^{b)}	Niere	-	3
Hek293-mCherry-P(C638) ^{b)}	Niere	-	3
Hek293-mCherry-P(WT) ^{b)}	Niere	-	3
Hek293-P(C638)-mCherry ^{b)}	Niere	-	3
Hek293-P(WT)-mCherry ^{b)}	Niere	-	3
HepG2 ^{a)}	Leber	Hepatozelluläres Karzinom	1
HT29 ^{a)}	Kolon	Karzinom	1
MCF7 ^{a)}	Brust	Adenokarzinom	1
U2OS ^{a)}	Knochen	Osteosarkom	1
U373 ^{a)}	Gehirn	Glioblastom, Astrozytom	1
U87 ^{a)}	Gehirn	Glioblastom, Astrozytom	1

5.8.1 Kultivierung humaner Zellen

Wurden Zelllinien über längere Zeit in Kultur gehalten und für Experimente genutzt, wurden diese in 10 cm Zellkulturschalen inkubiert und passagiert (Abschnitt 5.8.1.1) sobald sie eine Konfluenz von 90–95% erreicht hatte. Dazwischen wurden die Zellen alle 1–2 Tage mit frischem Zellkulturmedium versorgt, indem das alte mit Hilfe des Vakuumsystems der Zellkultur vollständig entfernt, die Zellen kurz mit 5 mL PBS-Puffer gewaschen und 10 mL neues Medium hinzugegeben wurden. Sollten Zellen für Experimente genutzt werden, wurde während des Passagierens die benötigte Zellzahl entnommen (Abschnitt 5.8.1.2).

5.8.1.1 Passagieren humaner Zellen

Zum Passagieren der Zellen wurde das in der Zellkulturschale befindliche Medium mit Hilfe des Absaugsystems mit integrierter Vakuumpumpe der Zellkultur entfernt und die Zellen mit 5 mL PBS-Puffer gewaschen. Anschließend wurde 1 mL der Trypsinlösung zugegeben und gleichmäßig verteilt.²⁸⁵ Nach etwa 3 Minuten Inkubationszeit bei 37°C wurden 9 mL des zellspezifischen Zellkulturmediums zugegeben. Von der Zellsuspension wurden 0,5 mL, 1 mL oder 2 mL in eine neue Zellkulturschale überführt, in der 9,5 mL, 9 mL oder 8 mL Medium vorgelegt worden waren. Anschließend wurde die Dichte der ausgesäten Zellen mit Hilfe des invertierten Tischmikroskops überprüft. Enthielt die Schale zu viele oder zu wenige Zellen, wurde deren Konzentration durch Absaugen der Zellsuspension und Auffüllen mit neuem Medium oder durch Zugabe weiterer Zellsuspension angepasst. Anschließend wurde die Zellkulturschale im CO₂-Inkubator aufbewahrt bis die Zellen nach 3–4 Tagen zu einer Konfluenz von 90–95% herangewachsen waren.

5.8.1.2 Aussäen definierter Zellmengen mit Hilfe der Neubauer Zählkammer

Sollten Zellen für ein Experiment ausgesät werden, musste zunächst die Zahl lebender Zellen in der während des Passagierens erhaltenen Zellsuspension ermittelt werden. Dazu wurden 50 µL dieser Suspension mit 10 µL Trypanblau-Lösung vermischt. 10 µL der erhaltenen Suspension wurden in eine Neubauer Zählkammer pipettiert und die Zellen in dieser gezählt. Dabei konnten tote Zellen von lebenden unterschieden werden, da das Trypanblau durch perforierte Membranen diffundiert, sodass tote Zellen eine blaue Färbung aufweisen, während lebende Zellen ungefärbt sind.^{286,287} War in allen vier Kästchen der

Zählkammer die jeweilige Zellzahl ermittelt worden, ließ sich die Gesamtzellzahl n_G pro 1 mL der ursprünglichen Suspension nach Formel 13 berechnen.

$$n_G = \left(\frac{n_1 + n_2 + n_3 + n_4}{4} \right) \cdot \frac{V_G}{V_T} \cdot 10^4 \quad (13)$$

mit n_G : Anzahl der Zellen, die in 1 mL der ursprünglichen Zellsuspension vorlag; n_{1-4} : Zellzahl in jedem der ausgezählten 4x4-Kästchen; V_G : Volumen der Lösung aus Zellsuspension und Trypanblau-Lösung (hier 60 μ L); V_T : Volumen der Trypanblau-Lösung (hier 10 μ L).

Anschließend wurde das der gewünschten Zellzahl entsprechende Volumen aus der Suspension entnommen und kurz abzentrifugiert (200 rcf, 25°C, 3 Min). Nach Entfernen des Überstandes wurden die Zellen vorsichtig im gewünschten Volumen der Ziellösung resuspendiert und weiterverwendet.

5.8.1.3 Auftauen von DMSO-Kulturen humaner Zellen

Um humane Zellen aus den zur Lagerung verwendeten DMSO-Kulturen aufzutauen wurde diese durch Inkubation bei 37°C möglichst schnell aufgetaut und zu 4 mL des benötigten Zellkulturmediums zugegeben, die in einem 15 mL Reaktionsgefäß vorgelegt wurden. Die Zellen wurden vorsichtig mit dem Medium vermischt und abzentrifugiert (200 rcf, 25°C, 3 Min). Der Überstand wurde möglichst vollständig entfernt und die Zellen in 1 mL Medium resuspendiert. Anschließend wurden sie in eine 10 cm Zellkulturschale überführt, in welcher 9 mL Medium vorgelegt worden waren, und für 24 Stunden inkubiert. Das Medium wurde erneut gewechselt und sobald die Schale eine Konfluenz von 90–95% erreicht hatte, wurden die Zellen wie üblich passagiert (Abschnitt 5.8.1.1) und für Experimente genutzt.

5.8.1.4 Ansetzen von DMSO-Kulturen zur Lagerung humaner Zellen

Um Lagerkulturen von humanen Zelllinien zu erzeugen, wurden diese in einer Konzentration von etwa $1 \cdot 10^6$ Zellen \cdot mL⁻¹ in ihrem Zellkulturmedium resuspendiert. Anschließend wurde steriles DMSO zugegeben, sodass sein Gehalt bei 10% lag, und gründlich mit der Zellsuspension vermischt. Je 1 mL der erhaltenen Suspension wurde in ein Kryoröhrchen überführt und dieses in einem Gefrierbehälter im –80°C Gefrierschrank eingefroren. Zur kurzfristigen Lagerung wurden die Kryoröhrchen in diesem belassen. Sollten die DMSO-Kulturen länger als etwa 2 Monate aufbewahrt werden, wurden sie in der Gasphase von Flüssigstickstoff gelagert.

5.8.2 Untersuchung der Zellpermeabilität verschiedener Liganden

Zunächst wurde pro untersuchtes Peptid die benötigte Zelllinie in zwei Kavitäten einer 96er Zellkulturmikrotiterplatte ausgesät. Hierzu wurden je 5.000 HeLa-Zellen und 10.000 Hek293-Zellen in 200 μL Zellkulturmedium 1 verwendet. Für die Zellpermeabilitätsanalyse der Liganden wurden 1 mM DMSO-Stammlösungen ihrer FITC-modifizierten Varianten verwendet (Abschnitt 5.4.10). Nachdem die Zellen für 21 Stunden inkubiert worden waren, wurden die Peptide in einer Konzentration von 10 μM zugegeben. Dazu wurden je 8 μL der 1 mM Peptidstammlösung mit 800 μL Zellkulturmedium 1 vermischt. Anschließend wurde das auf den Zellen befindliche Medium durch das mit Peptid versetzte Medium ersetzt und die Zellen für 90 Minuten mit diesem inkubiert. Danach wurde das Medium entfernt und die Zellen dreimal mit je 200 μL PBS-Puffer gewaschen. Anschließend wurden sie für 20 Minuten in 200 μL Paraformaldehydlösung bei RT fixiert. Nach erneutem Waschen mit PBS-Puffer (3x200 μL) wurden die Zellen für 5 Minuten bei RT mit 100 μL DAPI-Lösung behandelt, um ihre genomische DNS anzufärben. Nach erneutem Waschen mit PBS-Puffer (3x100 μL) wurden die Zellen in diesem belassen und mit Hilfe des invertierten Tischmikroskopes untersucht. Dazu wurden Aufnahmen der Zellen mit Hilfe des 10x Objektivs sowie der FITC- und DAPI-Filter gemacht und mit Hilfe des Programmes *ImageJ* bearbeitet, indem beide Bilder angefärbt (FITC-Channel grün, DAPI-Channel blau) und überlagert wurden.

5.8.3 Transfektion humaner Zelllinien

5.8.3.1 Bestimmung der minimalen Antibiotikakonzentration für verschiedene Zelllinien

Um stabil transfizierte Zelllinien zu erhalten, müssen die Zellen mit einem Vektor transfiziert werden, welcher ein Resistenzgen für ein spezifisches Antibiotikum trägt. In dieser Arbeit wurde das Neomycin-Resistenzgen verwendet, welches in humanen Zellen eine G418-Resistenz induziert.^{288,289} Zur Selektion transfizierter Zellen wurde zunächst die G418-Konzentration ermittelt, bei welcher nicht-transfizierte humane Zellen abstarben. Dazu wurden pro Kavität 100.000 (150.000) Zellen HeLa- (Hek293-)Zellen in einer Mikrotiterplatte mit 24 Kavitäten ausgesät. Bei einer Konfluenz von 80–90% wurde das vorhandene Medium entfernt und durch G418-versetztes Medium ersetzt. Dabei wurde für die HeLa-Zellen eine Konzentration von 1000 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, 900 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, 800 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$,

700 ng· μL^{-1} , 600 ng· μL^{-1} , 500 ng· μL^{-1} , 400 ng· μL^{-1} , 300 ng· μL^{-1} , 200 ng· μL^{-1} , 100 ng· μL^{-1} und 50 ng· μL^{-1} G418 verwendet. Für die Hek293-Zellen wurden G418-Konzentrationen von 800 ng· μL^{-1} , 400 ng· μL^{-1} , 200 ng· μL^{-1} , 100 ng· μL^{-1} und 50 ng· μL^{-1} eingesetzt. Pro G418-Konzentration und Zelllinie wurden zwei Kavitäten untersucht. Als Kontrolle dienten Zellen, die ohne G418 inkubiert wurden. Das Medium wurde ab diesem Zeitpunkt alle 2 Tage gewechselt und die Zellen jeden Tag mit Hilfe des invertierten Tischmikroskops untersucht. Nach einer Woche waren bei beiden Zelllinien die Zellen, die mit einer G418-Konzentration von 400 ng· μL^{-1} oder darüber behandelt worden waren, vollständig abgestorben. Daher wurde diese G418-Konzentration in allen weiteren Versuchen eingesetzt, wenn stabil transfizierte Zelllinien hergestellt und kultiviert werden sollten.

5.8.3.2 Standardprotokoll zur Transfektion humaner Zellen mit Lipofectamin

Zur Transfektion mit dem Transfektionsreagenz Lipofectamin wurde die gewünschte Zelllinie zunächst pro untersuchtem Vektor in zwei Kavitäten einer 24er Zellkulturmikrotiterplatte ausgesät. Zusätzlich wurden von jeder Zelllinie zwei Kavitäten für die Kontrolltransfektion mit dem Vektor pmCherry C1 und zwei Kavitäten für die Kontrolltransfektion ohne Vektor vorbereitet. Sobald die Zellen eine Konfluenz von 80–95% erreicht hatten,^a wurden sie transfiziert. Hierzu wurden pro Kavität 200 ng^b des gewünschten Vektors in einer wässrigen Lösung zu 55 μL Opti-MEM zugegeben. Außerdem wurden 2,2 μL Lipofectamin Reagenz mit 55 μL Opti-MEM vorsichtig mit einer Pipette vermischt und für 5 Minuten bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Lipofektamin-Lösung zur DNS-Lösung zugegeben und die erhaltene Lösung erneut für 5 Minuten bei RT inkubiert, ehe sie tropfenweise zum Medium in einer Kavität der 24er Mikrotiterplatte zugegeben wurde. Die Zellen wurden für 10 Stunden mit diesem Medium inkubiert. Anschließend wurde das Medium abgesaugt und durch 0,5 mL frisches Zellkulturmedium ersetzt. 48 Stunden nach der Transfektion wurde die

^a Die dazu benötigte Inkubationszeit konnte je nach Zellteilungsrythmus und der durchschnittlichen Zellgröße der einzelnen Zelllinien variieren.

^b Diese Menge hatte sich bei der Optimierung der Transfektionsbedingungen für die HeLa-Zellen (Abschnitt 3.5.1.2) als optimal heraus gestellt. Um die Transfektionseffizienz der anderen Zelllinien mit den HeLa-Zellen zu vergleichen, wurden diese analog zur optimalen Transfektion der HeLa-Zellen behandelt. Möglicherweise wäre die Transfektionseffizienz anderer Zelllinien unter anderen Bedingungen besser gewesen.

Transfektionseffizienz abgeschätzt, indem die Zellen mit dem invertierten Tischmikroskop untersucht wurden. Dazu wurden mit der angeschlossenen Kamera Durchlichtbilder aufgenommen, um den allgemeinen Zustand der Zellen zu untersuchen. Zusätzlich wurde die Fluoreszenz des mCherry-Proteins detektiert, indem dieses mit einer Quecksilberlampe angeregt wurde. Die Detektion erfolgte mit Hilfe des mCherry-Filters (Abbildung A91 bis Abbildung A102). Sollte im Falle der Hek293-Zellen eine stabil transfizierte Zelllinie erhalten werden, wurde drei Tage nach der Transfektion erneut das Medium entfernt und mit Zellkulturmedium 3 ersetzt. Anschließend wurden diese Zellen genutzt, um poly- und monoklonale Zelllinien zu generieren (Abschnitt 5.8.6).

5.8.3.3 Transiente Transfektion von HeLa-Zellen mit X-tremeGENE

Um HeLa-Zellen transient mit den Vektoren pP(C638)-mCherry und pP(WT)-mCherry zu transfizieren, wurde das Reagenz X-tremeGENE verwendet. Dieses erlaubt die Transfektion der Zellen in Suspension während des Aussäens in die für die Mikroinjektion benötigten Zellkulturschalen mit Glasboden. Um die transiente Transfektion zu optimieren, wurden zunächst verschiedene Volumina des Transfektionsreagenz und des Opti-MEM-Zellkulturmediums verwendet (Tabelle 47), während alle übrigen Arbeitsschritte identisch waren. Dabei stellte sich Bedingung 4 als beste Variante heraus, sodass diese im Folgenden beschrieben wird.

Tabelle 47: Getestete Bedingungen für die transiente Transfektion von HeLa-Zellen mit dem Vektor pP(WT)-mCherry. Die Bedingungen unterschieden sich nur im verwendeten Volumen des Transfektionsreagenzes X-tremeGENE und des verwendeten Zellkulturmediums Opti-MEM.

Bedingung	$V_{X-tremeGENE} / \mu\text{L}$	$V_{Opti-MEM} / \mu\text{L}$
1	1,5	200
2	1,5	250
3	1,5	300
4	2,0	200
5	2,0	250
6	2,0	300

Für jede Transfektion wurden 200 μL Opti-MEM in einem 1,5 mL Reaktionsgefäß vorgelegt und mit 2000 ng DNS versetzt. 2 μL X-tremeGENE-Lösung wurden durch vorsichtiges Pipettieren mit dieser DNS-Lösung vermischt und für 15 Minuten bei RT inkubiert. Währenddessen wurden die Zellen passagiert (Abschnitt 5.8.1.1) und die Zellmenge in der erhaltenen Suspension bestimmt (Abschnitt 5.8.1.2). Anschließend wurden 200.000 Zellen mit der Transfektionslösung vermischt und in eine Zellkulturschale mit

Poly-D-Lysin-beschichtetem Glasboden, in denen sich 2 mL Zellkulturmedium 1 befanden, ausgesät. Nach etwa 16 Stunden konnten die Zellen für weitere Experimente genutzt werden.

5.8.4 Adhäsionstest für Hek293-Zellen

Für den Adhäsionstest der Hek293-Zellen wurden Zellkulturschalen mit unmodifiziertem Glasboden sowie mit Poly-D-Lysin- und Kollagenbeschichtung verwendet. In je zwei Zellkulturschalen pro Oberflächenbeschichtung wurden 50.000 Hek293-Zellen auf die Glasfläche der Schalen ausgesät. Nach 3 Stunden wurden 2 mL Zellkulturmedium 1 hinzugegeben und die Zellen für weitere 16 Stunden inkubiert bis sie eine Konfluenz von ca. 50% erreicht hatten. Das Medium wurde abgesaugt und in alle Schalen wurden 2 mL PBS-Puffer gefüllt. Der Einfluss dieses Absaug- und Auffüllungsschrittes wurde mit Hilfe des inversen Tischmikroskopes überprüft. Anschließend wurden noch zwei weitere Absaug- und Auffüllungsschritte durchgeführt und analysiert. Es zeigte sich, dass in den Zellkulturschalen mit unbeschichtetem Glas bereits nach zwei Schritten kaum noch Zellen vorhanden waren. Bei der Kollagen-beschichteten Platte war dies nach drei Waschschritten der Fall. Auch bei der Poly-D-Lysin-beschichteten Oberfläche verringerte sich die Anzahl der adhärenen Zellen im Verlaufe der Zeit, jedoch zeigte sie nach drei Waschschritten noch einen akzeptablen Bewuchs.

5.8.5 Zellyse

Die Zellyse humaner Zellen wurde im Rahmen dieser Arbeit für diverse Experimente durchgeführt. Je nach benötigter Lysatmenge wurden dazu unterschiedlich viele 10 cm Zellkulturschalen verwendet. Unabhängig von der Plattenanzahl wurde jede Platte mit denselben Lösungen und Lösungsvolumina behandelt. Nachdem die Lysatlösungen aller Platten vereinigt worden waren, wurden die Volumina an die Anzahl der Platten angepasst. Daher wird im Folgenden nur das Protokoll für eine einzelne 10 cm Zellkulturschale beschrieben, welches bei Verwendung mehrerer Schalen hochskaliert wurde.

Für die Zellyse wurden 10 mL des Lysepuffers für Hek293-Zellen mit je 1 Tablette Kinase-Inhibitoren versetzt.^a Um die konfluent gewachsenen Zellen für die Zellyse vorzubereiten, wurde zunächst das Medium vollständig entfernt und jede Schale mit 5 mL PBS-Puffer gewaschen. Nachdem dieser entfernt worden war, wurden 200 µL des

^a Dieser Puffer konnte bei -20°C gelagert werden.

Lysepuffers für Hek293-Zellen zugegeben und die Zellen in diesem resuspendiert. Die Lösung wurde in ein 15 mL Reaktionsgefäß überführt und die Zellen mittels Ultraschall aufgeschlossen. Dazu wurde die Zellsuspension zweimal für 10 Sekunden mit einer Amplitude von 10% behandelt. Anschließend wurden die unlöslichen Zellbestandteile abzentrifugiert (4°C, 3000 rcf, 5 Min.) und die Überstände abgenommen. Nachdem die Gesamtproteinkonzentration der Lysate ermittelt worden war (Abschnitt 5.3.2.4), wurden diese aliquotiert.

5.8.6 Etablierung poly- und monoklonaler Hek293-Zelllinien

5.8.6.1 Durchflusszytometrie

Um einzelne Zelllinien für die Fluoreszenz-induzierte Zellsortierung in Suspension zu bringen, wurde von einer konfluent bewachsenen 10 cm Zellkulturschale das Medium vollständig entfernt. Anschließend wurde diese mit 5 mL PBS-Puffer gewaschen und 1 mL Trypsinlösung zugegeben. Nach 3 Minuten Inkubation wurden 4 mL Zellkulturmedium 4 verwendet um die Zellen zu resuspendieren. Die Zellen wurden in ein 15 mL Reaktionsgefäß überführt und bei 200 rcf und 25°C für 3 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand entfernt, die Zellen in 1 mL PBS-Puffer resuspendiert und in ein 2 mL Reaktionsgefäß überführt. Direkt vor der Injektion in das Durchflusszytometer wurden sie durch ein Filterröhrchen pipettiert, um Partikel zu entfernen, die das Zytometer verstopfen könnten.

Die eigentliche Durchflusszytometrie wurde von Herrn Dr. M. Schulz durchgeführt. Dabei wurden zunächst die nicht-transfizierten Hek293-Zellen vermessen, um die durch die Morphologie der Zellen beeinflussten Parameter im Gerät einstellen zu können. Anschließend wurden die Hek293-mCherry-P(WT)-Zellen untersucht. Mit ihnen wurden die zur Sortierung benötigten Fluoreszenzparameter bestimmt. Anschließend wurden die Hek293-mCherry-P(WT)-Zellen sowie die Hek293-mCherry-P(C638)- und Hek293-mCherry-Zellen sortiert, indem jeweils $2 \cdot 10^6$ Detektionsereignisse aufgenommen wurden. Diese enthielten zum einen die beiden gewünschten Unterpopulationen unterschiedlicher Fluoreszenzintensitäten, welche in zwei 15 mL Reaktionsgefäßen gesammelt wurden, zum anderen auch tote Zellen, Zelltrümmer und Zellen, die den festgelegten Parametern nicht entsprachen. Somit wurden von allen Unterpopulationen unterschiedlich viele Zellen zurückgewonnen (Tabelle 48).

Tabelle 48: Ergebnisse der Durchflusszytometrie zur Gewinnung von zwei Unterpopulationen aus den Zelllinien Hek293-mCherry, Hek293-mCherry-P(C638) und Hek293-mCherry-P(WT).

Untersuchte Zelllinie	Erhaltene Unterpopulation	Zurückgewonnene Zellmenge
Hek293-mCherry	Hek293-mCherry-hell	$1,1 \cdot 10^6$
	Hek293-mCherry-dunkel	400.000
Hek293-mCherry-P(C638)	Hek293-mCherry-P(C638)-hell	40.000
	Hek293-mCherry-P(C638)-dunkel	$1,0 \cdot 10^6$
Hek293-mCherry-P(WT)	Hek293-mCherry-P(WT)-hell	43.000
	Hek293-mCherry-P(WT)-dunkel	850.000

Im Anschluss an die Durchflusszytometrie wurden die in PBS erhaltenen Zellen mit 1 mL Zellkulturmedium 4 vermischt und bei 200 rcf und 25°C für 3 Minuten abzentrifugiert. Anschließend wurden sie in Zellkulturschalen ausgesät, wobei für Unterpopulationen mit einer Zellmenge oberhalb von 100.000 Zellen eine 10 cm Zellkulturschale mit 10 mL Zellkulturmedium 4 und für Unterpopulationen mit einer Zellmenge unterhalb von 100.000 Zellen eine Kavität einer 6er Zellkulturmikrotiterplatte mit 2,5 mL Zellkulturmedium 4 verwendet wurde. Da die Zellsortierung im verwendeten Durchflusszytometer nicht steril erfolgen konnte, wurden die sortierten Zellen nach der Sortierung für eine weitere Woche mit diesem Medium behandelt. Am nächsten Tag wurden die gewonnenen Unterpopulationen mit Hilfe des inversen Tischmikroskops auf ihre fluoreszenten Eigenschaften untersucht.

5.8.6.2 Isolation einzelner Hek293-Zellen

Zur Isolation einzelner Zellen wurde zunächst für jede Zelllinie eine 10 cm Zellkulturschale mit Zellkulturmedium 3 vorbereitet, in die 1000 Zellen der entsprechenden Zelllinie ausgesät wurden. Die Schale wurde für eine Woche inkubiert, um aus einzelnen Zellen kleine Kolonien zu expandieren. Diese wurden am invertierten Tischmikroskop auf ihre mCherry-Intensität untersucht und potentiell nutzbare Kolonien markiert. Anschließend wurde das Medium aus der Schale entfernt und durch 10 mL PBS-Puffer mit 100 μ L Trypsinlösung ersetzt. Dies führte zu einer verminderten Zellenadhäsion, sodass die Zellen mit einer sterilen 200 μ L Pipettenspitze mit Filter von der Oberfläche abgenommen und in einer Kavität einer 96er Zellkulturmikrotiterplatte in 100 μ L Zellkulturmedium 4 resuspendiert werden konnten.

5.8.6.3 Expansion monoklonaler Zelllinien

Die zur Isolation in eine 96er Zellkulturmikrotiterplatte umgesetzten Zellkolonien wurden in je 100 μL Zellkulturmedium 4 inkubiert bis sie 90–95% Konfluenz erreichten. Anschließend wurden sie in je eine Kavität einer 6er Zellkulturmikrotiterplatte überführt, indem das Medium entfernt und die Zellen mit 100 μL PBS-Puffer gewaschen wurden. Nach Zugabe von 50 μL Trypsinlösung und Inkubation bei RT für 3 Minuten wurden die Zellen in 200 μL Zellkulturmedium 3 resuspendiert und in jeweils eine Kavität einer 6er Zellkulturmikrotiterplatte mit 5 mL Zellkulturmedium 3 überführt. Nachdem die Zellen auch in diesen Kavitäten eine Konfluenz von 90–95% erreicht hatten, wurden sie mit 2 mL PBS-Puffer gewaschen und für 3 Minuten mit 250 μL Trypsinlösung inkubiert. Nach Zugabe von 1 mL Zellkulturmedium 3 wurden die Zellen in eine 10 cm Zellkulturschale überführt, in welcher 9 mL Medium vorgelegt waren. Ab diesem Zeitpunkt wurden sie nach Standardprotokoll passagiert (Abschnitt 5.8.1.1) und für Experimente verwendet.

5.8.6.4 Expressionsanalyse

Um den Expressionsgrad des gewünschten Fusionsproteins einer Hek293-Zelllinie zu untersuchen, wurde eine Expressionsanalyse durchgeführt. Hierzu wurde aus je einer 10 cm Zellkulturschale ein Lysat der zu untersuchenden Zelllinie gewonnen (Abschnitt 5.8.5). Von diesem wurde eine SDS-Probe mit definiertem Gesamtproteingehalt des jeweiligen Hek293-Zelllysates hergestellt (Tabelle 49), indem 2 μL 5x SDS-Probenpuffer mit Lysat und ddH₂O auf 10 μL aufgefüllt wurden. Diese Proben wurden für 5 Minuten bei 95°C denaturiert und mittels SDS-PAGE aufgetrennt.

Tabelle 49: Zur Expressionsanalyse verwendeter Gesamtproteingehalt aller untersuchten Zelllinien.

Zelllinie	Gesamtproteingehalt / μg
Hek293	30
Hek293-mCherry C1-poly-hell	30
Hek293-mCherry C1-poly-dunkel	30
Hek293-mCherry C1-mono	10
Hek293-mCherry N1-poly	10
Hek293-mCherry-P(C638)-poly-hell	30
Hek293-mCherry-P(C638)-poly-dunkel	30
Hek293-mCherry-P(C638)-mono	40
Hek293-mCherry-P(WT)-poly-hell	30
Hek293-mCherry-P(WT)-poly-dunkel	30
Hek293-mCherry-P(WT)-mono	40
Hek293-P(C638)-mCherry-poly	40
Hek293-P(C638)-mCherry-mono	40
Hek293-P(WT)-mCherry-poly	40
Hek293-P(WT)-mCherry-mono	40

Anschließend wurden die SDS-Polyacrylamidgele mit Hilfe eines Western Blots auf ihren Gehalt an mCherry(-Fusionsproteinen) untersucht (Abschnitt 5.3.6). Hierzu wurden der primäre Antikörper gegen mCherry und die sekundären Antikörper gegen das Maus-IgG, welche entweder mit der Merrettichperoxidase oder mit der alkalischen Phosphatase fusioniert war, verwendet (vgl. Tabelle 41, Abschnitt 5.3.6).

5.8.7 Konfokale Mikroskopie

Alle konfokalen Zellbilder wurden am konfokalen LSM 510 Mikroskop der Abteilung 2 unter Leitung von Prof. Dr. P. Bastiaens des MPI für molekulare Physiologie in Dortmund aufgenommen. Hierzu wurde stets das Luftobjektiv mit 60-facher Auflösung verwendet. Die verwendeten Laser-, Filter- und Lochblendeneinstellungen waren Fluorophor-abhängig (Tabelle 50). Die Laserstärke zur Anregung der Fluorophore wurde je nach deren Intensität für jede Aufnahme variiert.

Tabelle 50: Zur konfokalen Mikroskopie verwendete Fluorophore mit ihren maximalen Extinktions- und Emmisionswellenlängen sowie den für sie verwendeten Laser-, Filter- und Lochblendeneinstellungen.

Fluorophor	λ_{Ex}	λ_{em}	λ_{Laser}	Filter _{ex}	Lochblende
eGFP ⁵³	484	507	488	BP 505–550	98
Fluorescein(-derivate) ^{115,181}	494	512	488	BP 505–550	98
mCherry ⁵³	587	610	561	LP 575	108
mTurquoise2 ²⁹⁰	434	474	405	BP 420–480	98

5.8.8 Mikroinjektion

Für alle Mikroinjektionsexperimente wurden die benötigten Zellen einen Tag vor dem eigentlichen Experiment in einer Zellkulturschale mit Glasoberfläche, welche mit poly-D-Lysin beschichtet war, ausgesät. Ggf. wurden sie dabei auch transfiziert (Abschnitt 5.8.3.3). Während des Mikroinjektionsexperimentes wurden mit dem konfokalen Mikroskop je zwei Bilder von den Zellen aufgenommen. Das erste erfolgte vor der Mikroinjektion, das zweite danach. Durch Vergleich dieser beiden Bilder konnten durch die Mikroinjektion induzierte Veränderungen detektiert werden.

5.8.8.1 Mikroinjektion an Hek293-Zellen

Um zu testen, ob die stabil transfizierten Hek293-Zelllinien zur Mikroinjektion geeignet waren, wurden 500.000 Zellen in 2 mL Zellkulturmedium 3 in eine Zellkulturschale mit Glasoberfläche, welche mit poly-D-Lysin beschichtet war, ausgesät und für 24 Stunden inkubiert. Anschließend wurde das Medium entfernt und durch 2 mL Mikroskopiemedium ersetzt. Die Schale wurde in einer Styroporbox mit Wärmekissen zum konfokalen Mikroskop transportiert, welches auf 37°C vorgewärmt worden war und mit CO₂ durchströmt wurde. Die Zellen wurden mit der Fluorescein-Lösung, welche 1:1 mit PBS-Puffer verdünnt und für 1 Stunde bei 4°C und 16.000 rcf zentrifugiert worden war, unter Verwendung des Mikroinjektionssystems und der Mikroinjektionsnadeln injiziert. Der Kompensationsdruck betrug dabei konstant 20 hPa, die Injektionszeit 0,5 Sek. und der Injektionsdruck 100 hPa.

5.8.8.2 Mikroinjektion von peptidischen Lokalisationsignalen

24 Stunden vor jedem Injektionsexperiment wurden 250.000 HeLa-Zellen in 2 mL Zellkulturmedium 1 in eine Zellkulturschale mit Glasoberfläche, welche mit Poly-D-Lysin beschichtet war, ausgesät. Anschließend wurde das Medium entfernt und durch 2 mL Mikroskopiemedium ersetzt. Die Schale wurde in einer Styroporbox mit Wärmekissen zum konfokalen Mikroskop transportiert, welches auf 37°C vorgewärmt worden war und mit CO₂ durchströmt wurde.

Um die Lokalisationsfähigkeit der Lokalisationssequenzen zu überprüfen wurden die FICT-modifizierte Varianten **f-9MA1**, **f-9MA2**, **f-9MA3** und **f-9NLS** in einer 1 mM DMSO-Stammlösung angesetzt (Abschnitt 5.4.10) und bei -20°C gelagert. Für die Mikroinjektion wurde 1 µL der Stammlösung mit 9 µL PBS-Puffer vermischt und

abzentrifugiert (16.000 rcf, 4°C, 1 Std.). Der Überstand wurde abgenommen und zur Injektion verwendet. Der Kompensationsdruck betrug konstant 20 hPa, die Injektionszeit betrug 0,5 Sek. und der Injektionsdruck 100 hPa. Die Aufnahme der Bilder erfolgte ca. 5 Minuten und 1 Stunde nach der Injektion.

5.8.8.3 Mikroinjektion von lokalisierenden Liganden

Wie bereits beschrieben wurden 24 Stunden vor jedem Mikroinjektionsexperiment 250.000 HeLa-Zellen in 2 mL Zellkulturmedium 1 in eine Zellkulturschale mit Glasoberfläche, welche mit poly-D-Lysin beschichtet war, ausgesät. Dabei wurden sie entweder mit dem Vektor pmCherry-P(WT) oder pmCherry-P(C638) transfiziert (Abschnitt 5.8.3.3). Nach der Inkubationszeit wurde das Medium entfernt und durch 2 mL Mikroskopiemedium ersetzt. Die Schale wurde in einer Styroporbox mit Wärmekissen zum Mikroskop LSM 510 transportiert, welches auf 37°C vorgewärmt worden war und mit CO₂ durchströmt war.

Die zu injizierenden Peptide wurden in einer 10 mM DMSO-Stammlösung angesetzt (Abschnitt 5.4.10), welche bei -20°C gelagert wurde. Für die Mikroinjektion wurde 0,1 µL der Stammlösung mit 0,2 µL Fluorescein-Lösung und 0,7 µL DMSO vermischt und abzentrifugiert (16.000 rcf, 4°C, 1 Std.). Der Überstand wurde abgenommen und zur Injektion verwendet. Die Injektionszeit wurde dabei konstant bei 0,5 Sek. gehalten, während der Injektionsdruck je nach Verstopfungsgrad der Nadelspitze zwischen 100 hPa und 300 hPa variiert wurde. Der Kompensationsdruck betrug konstant 20 hPa. Die Aufnahme der Bilder erfolgte ca. 5 Minuten und 1 Stunde nach der Injektion.

5.8.8.4 Auswertung der konfokalen Mikroskopiebilder zu den Mikroinjektionsexperimenten

Um die nach der Mikroinjektion der verschiedenen Liganden erhaltenen konfokalen Mikroskopiebilder auszuwerten wurden diese mit dem Programm *ImageJ* bearbeitet. Hierzu wurden sie zunächst gedreht, um die längere Achse der zu untersuchende Zelle horizontal anzuordnen. Anschließend wurden die einzelnen Kanäle des Bildes (mCherry- und FITC-Fluoreszenz sowie die Durchlichtaufnahme) voneinander getrennt, ihr Hintergrund subtrahiert (*rolling ball* Algorithmus mit einem Radius von 50 Pixeln) und ggf. Kontrast und Helligkeit der einzelnen Aufnahmen variiert, um eine optimale Darstellung der jeweils analysierten Zelle zu erhalten. Anschließend wurde eine 50 Pixel breite Linie durch die Zelle

gezogen und ein Profil der Fluoreszenzintensität entlang dieser Linie erstellt. Die so erhaltene Fluoreszenz jeder Zelle wurde an einer repräsentativen cytosolischen Position auf 1 normiert und die Intensitätsprofile jeder Zelle mit Hilfe des Programms *GraphPad Prism* aufgetragen.

Um die Translokationseffizienz einzelner Protein-Ligand-Paare zu bestimmen wurden zunächst alle konfokalen Mikroskopieaufnahmen, die aus Mikroinjektionsexperimenten der reaktiven Peptide CI-9(i)L-NLS/MA2/MA3 sowie des reinen Puffers stammten, anonymisiert, um eine unbeeinflusste Zuordnung der unterschiedlichen Phänotypen zu ermöglichen. Dabei wurden die Bilder vor und nach der Mikroinjektion gemeinsam behandelt. Für jede Aufnahme nach der Mikroinjektion wurden die mCherry-exprimierenden Zellen gezählt, welche im Vergleich zur Aufnahme vor der Mikroinjektion folgende Phänotypen aufweisen:

- 1) Verstärkte Lokalisation der mCherry-Fluoreszenz in der Kernmembran
- 2) Verstärkte Lokalisation der mCherry-Fluoreszenz in der Plasmamembran
- 3) Verstärkte Lokalisation der mCherry-Fluoreszenz im Nukleus

Anschließend wurden die einzelnen Aufnahmen den unterschiedlichen Protein-Ligand-Paaren zugeordnet und die Anzahl der Zellen mit den verschiedenen Phänotypen bestimmt (Tabelle 51).

Tabelle 51: Anzahl der HeLa-Zellen mit verstärkter Lokalisation in der Kern- oder Plasmamembran sowie dem Nukleus, wie sie für die unterschiedlichen Protein-Ligand-Paare der Mikroinjektionsexperimente erhalten wurde. Da für das Protein-Ligand-Paar **P(C638)+CI-9L-MA2** keine verstärkte Lokalisation in der Plasmamembran beobachtet werden konnte, wurde die Kontrolle aus **P(WT)+CI-9L-MA2** nicht durchgeführt (n.d.).

Protein-variante	Injiziertes Peptid	Gesamtzahl transfizierter Zellen	Anzahl Zellen mit verstärkter Lokalisation in		
			Kernmembran	Plasmamembran	Nukleus
P(C638)	CI-9L-NLS	148	-	-	9
P(C638)	CI-9iL-NLS	38	-	-	2
P(WT)	CI-9L-NLS	49	-	-	2
P(C638)	CI-9L-MA2	150	-	-	-
P(C638)	CI-9iL-MA2	44	-	3	-
P(WT)	CI-9L-MA2	n.d.	-	n.d.	-
P(C638)	CI-9L-MA3	123	46	-	-
P(C638)	CI-9iL-MA3	103	26	-	-
P(WT)	CI-9L-MA3	94	26	-	-
P(C638)	-	150	10	3	4

6 Abkürzungsverzeichnis

Für Aminosäuren wird der Einbuchstabencode verwendet. Die unnatürliche Aminosäure Norleucin wird dabei als „B“ bezeichnet, die unnatürliche Aminosäure (S)-N-Fmoc-2-(4-pentenyl)alanine als „S5“.

Ac ₂ O	Essigsäureanhydrid, Acetanhydrid
ACN	Acetonitril
AGE	Agarosegelelektrophorese
aMD Simulation	beschleunigte molekulardynamische Simulation engl. <i>accelerated molecular dynamic simulation</i>
Amp	Ampicillin
AP	alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
b	Biotin
bp	Basenpaar
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3'-indolylphosphat
BL	β-Lactamase
Boc	tert-Butyloxycarbonyl-Schutzgruppe
BRD	engl. <i>bromodomain</i>
BSA	bovines Serumalbumin
CBP	CREB-bindendes Protein
CH2	engl. <i>cysteine-histidine-rich domain 2</i>
c-Jun	zelluläres Jun-Protein
cMD Simulation	konventionelle molekulardynamische Simulation engl. <i>conventional molecular dynamic simulation</i>
COMU	(1-Cyano-2-ethoxy-2-oxoethylidenaminoxy)dimethylamino-

	morpholino-carbenium hexafluorophosphat
CMV	Cytomegalovirus
CPP2	CAAX Prenylprotease 2
CREB	engl. <i>cyclic AMP-responsive element-binding protein 1</i>
CRD1	engl. <i>cyclin-dependent kinase inhibitor-reactive domain</i>
CuAAC	Cu(I)-katalysierte Alkin-Azid-Cycloaddition (engl. <i>Cu(I)-catalyzed alkyne-azide cycloaddition</i>)
CyP	Cyclophilin
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DCE	Dichlorethan
DCM	Dichlormethan
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser
DIPEA	N,N-Diisopropylethylamin
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotid
dtb	Desthiobiotin
DTT	1,4-Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
eDHFR	Dihydrofolatreduktase aus <i>Escherichia coli</i>
EDT	1,2-Ethandithiol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eGFP	intensiv grün fluoreszierendes Protein (engl. <i>enhanced green fluorescent protein</i>)

EI	Elektrophil
ER	endoplasmatisches Reticulum
f	FITC, Fluoresceinisothiocyanat Isomer I
FASTA-Datei	Datei in textbasiertem FASTA-Format (zur Speicherung von Primärstrukturen von Proteinen und Nukleinsäuren)
FCS	Serum aus Rinderföten (engl. <i>fetal calf serum</i>)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat Isomer I
FKBP12	FK506 bindendes Protein 12
Fmoc	9-Fluorenylmethyloxycarbonyl
FP	fluoreszierendes Protein
FRB	Fragment der humanen Serine/threonine-protein kinase mTOR
FTase	Farnesyltransferase
fw	forwärts
G418	Gentamycinsulfat
GA	Golgi-Apparat
GAFF	generales Amber Kraftfeld (engl. <i>general Amber force field</i>)
GAI	Gibberellin <i>insensitive</i>
GAP	GTPase aktivierendes Protein
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	Guanosintriphosphat-Austauschfaktor (engl. <i>guanine nucleotide exchange factor</i>)
GePe	Gelpermeationschromatographie
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GGTase	Geranylgeranyltransferase
GID1	Gibberellin Rezeptor 1
GSH	Glutathion

GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
GyrB	B-Untereinheit der DNS-Gyrase
HAT	engl. <i>histone acetyltransferase domain</i>
HCTU	O-(6-Chlorobenzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium hexafluorophosphat
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonsäure
HIV-1	Humanes Immundefizienz Virus 1
HIV-1 rev	rev-Protein aus dem Humanen Immundefizienz Virus 1
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl. <i>high performance liquid chromatographie</i>)
HPLC-MS	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) gekoppelt mit Massenspektrometrie (MS)
HRMS	hochaufgelöste Massenspektrometrie (engl. <i>high resolution mass spectrometrie</i>)
HRP	Merretichperoxidase (engl. <i>horseredish peroxidase</i>)
IEDDAC	Diels-Alder-Cycloaddition mit inversem Elektronenbedarf (engl. <i>inverse-electron demand Diels-Alder-cycloaddition</i>)
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranosid
Kan	Kanamycin
LB	engl. <i>lysogeny broth</i>
m/z-Verhältnis	Masse-zu-Ladungsverhältnis
MA	Membrananker
MAP	Methionin-Aminopeptidase
mCherry	mCherry <i>fluorescent protein</i> , ein rot fluoreszierendes Protein

MD	molekulardynamisch
MLL	engl. <i>mixed lineage leukemia</i>
Mmt	4-Monomethoxytrityl
MS	Massenspektrometrie
MS ²	Tandem-Massenspektrometrie (MS)
mTurquoise2	mTurquoise <i>fluorescent protein</i> , ein blau fluoreszierendes Protein
MWCO	Molekulargewichtsgrenzwert (engl. <i>molecular weight cut off</i>)
NADC	Nitrilimin-Alken/Alkin-1,3-dipolare Cycloaddition (engl. <i>nitrilimine-alkene/alkyne 1,3-dipolar cycloaddition</i>)
NBT	2,2'-bis(4-Nitrophenyl)-5,5'-diphenyl-3,3'-(3,3'-dimethoxy- 4,4'-diphenylene)ditetrazoliumchlorid
NCBD	engl. <i>nuclear receptor coactivator binding domain</i>
NEAA	Nicht-essentielle Aminosäure
NES	Kernexportsignal (engl. <i>nuclear export signal</i>)
NLS	Kernlokalisationsignal (engl. <i>nuclear localization signal</i>)
NMM	4-Methylmorpholin
NMP	N-Methyl-2-pyrrolidon
NMR	Kernspinresonanz(spektroskopie) (engl: <i>nuclear magnetic resonance (spectroscopy)</i>)
NMT	<i>N</i> -Myristoyltransferase
NP-40	4-Nonylphenylpoly(ethylenglycol)
NPT-Simulation	Simulation, in der Stoffmenge, Druck und Temperatur konstant gehalten werden
NRID	engl. <i>nuclear receptor interaction domain</i>
NTF2	nuklearer Transportfaktor 2

Nu	Nukleophil
NVT-Simulation	Simulation, in der Stoffmenge, Volumen und Temperatur konstant gehalten werden
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei Messung mit Licht der Wellenlänge 600 nm
Oxyma	Ethyl(hydroxyimino)cianoacetat
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAT	Palmitoyltransferase
PCR	Polymerasekettenreaktion (engl. <i>polymerase chain reaction</i>)
PDB	Proteindatenbank
PDB-Datei	Datei aus der Proteindatenbank (zur Speicherung von Strukturdaten von Proteinen und Nukleinsäuren)
PEG	Polyethylenglycol
PEG2	Diethylenglycol
Pen	Penicillin
PhyB	Phytochrome B
PIF	Phytochrome-interagierender Faktor
PIM	Protein-S-isoprenylcysteine-O-methyltransferase
PKI α	cAMP-abhängiger Proteinkinaseinhibitor α (engl. <i>cAMP-dependent protein kinase inhibitor α</i>)
pKID	phosphorylierte KIX-interagierende Domäne
PM	Plasmamembran
PMEMD	engl. <i>particle mesh Ewald molecular dynamics</i>
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PPI	Protein-Protein-Interaktion
PTE	Palmitoylproteinthioesterase

PyBOP	Benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphonium-Hexafluorophosphat
PYP	photoaktives gelbes Protein (engl. <i>photoactive yellow protein</i>)
Ran	GTP-bindendes Kernprotein Ran
Ran-GDP	Ran im Komplex mit GDP
Ran-GTP	Ran im Komplex mit GTP
RESP	eingeschränkte elektrostatischen Potentiale (engl. <i>restrained electrostatic potential</i>)
RP-LC	Umkehrphasen-Flüssigkeitschromatographie (engl. <i>reversed phase liquid chromatographie</i>)
RSM	Ringschlussmetathese
RT	Raumtemperatur
rw	rückwärts
SANDER	engl. <i>simulated annealing with NMR-derived energy restraints</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl. <i>sodium dodecylsulfate</i>)
SDS-PAGE	denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) mit Natriumdodecylsulfat (SDS)
SPAAC	Ringspannungsinduzierte Alkin-Azid-Cycloaddition (engl. <i>strain-promoted alkyne-azide cycloaddition</i>)
SPY	engl. <i>major pilin protein Spy0128</i>
Strep	Streptomycin
SOC	engl. <i>super optimal broth with catabolite repression</i>
SPPS	Festphasenpeptidsynthese
STV	Streptavidin
SV	Säulenvolumen
SV40	Simian-Virus 40

TAD	Transaktivierungsdomäne
TAZ1/TAZ2	engl. <i>transcriptional adapter zinc binding motifs</i>
TB	engl. <i>terrific broth</i>
tBu	tert-Butyl-Schutzgruppe
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphin
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TEV	Tobacco Etch Virus
TFA	Trifluoressigsäure (engl. <i>trifluoroacetic acid</i>)
TIP3P	engl. <i>transferable intermolecular potential 3P</i>
TIPS	Triisopropylsilan
Tricin	N-[Tris(hydroxymethyl)methyl]glycine
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethane
Trt	Trityl-Schutzgruppe
UV	Ultraviolett
Vis	sichtbar (engl. <i>visible</i>)
w/o	ohne (engl. <i>without</i>)
WT	Wildtyp
YFP	gelb fluoreszierendes protein (engl. <i>yellow fluorescent protein</i>)
ZZ	engl. <i>dystrophin-like small zinc binding domain</i>

7 Literaturverzeichnis

1. Bauer, N. C., Doetsch, P. W. & Corbett, A. H. Mechanisms Regulating Protein Localization. *Traffic* **16**, 1039–1061 (2015).
2. Voß, S., Klewer, L. & Wu, Y. Chemically induced dimerization: reversible and spatiotemporal control of protein function in cells. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **28**, 194–201 (2015).
3. Chen, X. & Wu, Y.-W. Selective chemical labeling of proteins. *Org. Biomol. Chem.* **14**, 5417–39 (2016).
4. Hayashi, T. & Hamachi, I. Traceless affinity labeling of endogenous proteins for functional analysis in living cells. *Acc. Chem. Res.* **45**, 1460–9 (2012).
5. Tsukiji, S., Miyagawa, M., Takaoka, Y., Tamura, T. & Hamachi, I. Ligand-directed tosyl chemistry for protein labeling in vivo. *Nat. Chem. Biol.* **5**, 341–3 (2009).
6. Tsukiji, S. *et al.* Quenched ligand-directed tosylate reagents for one-step construction of turn-on fluorescent biosensors. *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 9046–54 (2009).
7. Fujishima, S., Yasui, R., Miki, T., Ojida, A. & Hamachi, I. Ligand-directed acyl imidazole chemistry for labeling of membrane-bound proteins on live cells. *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 3961–4 (2012).
8. Matsuo, K. *et al.* One-step construction of caged carbonic anhydrase I using a ligand-directed acyl imidazole-based protein labeling method. *Chem. Sci.* **4**, 2573 (2013).
9. Takaoka, Y., Nishikawa, Y., Hashimoto, Y., Sasaki, K. & Hamachi, I. Ligand-directed dibromophenyl benzoate chemistry for rapid and selective acylation of intracellular natural proteins. *Chem. Sci.* **6**, 3217–3224 (2015).
10. Tamura, T., Tsukiji, S. & Hamachi, I. Native FKBP12 engineering by ligand-directed tosyl chemistry: labeling properties and application to photo-cross-linking of protein complexes in vitro and in living cells. *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 2216–26 (2012).
11. Jing, C. & Cornish, V. W. A fluorogenic TMP-tag for high signal-to-background intracellular live cell imaging. *ACS Chem. Biol.* **8**, 1704–12 (2013).
12. Miki, T. *et al.* LDAI-based chemical labeling of intact membrane proteins and its pulse-chase analysis under live cell conditions. *Chem. Biol.* **21**, 1013–22 (2014).

13. Reinhardt, U. *et al.* Peptide-templated acyl transfer: a chemical method for the labeling of membrane proteins on live cells. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **53**, 10237–41 (2014).
14. Reinhardt, U., Lotze, J., Mörl, K., Beck-Sickinger, A. G. & Seitz, O. Rapid covalent fluorescence labeling of membrane proteins on live cells via coiled-coil templated acyl transfer. *Bioconjug. Chem.* **26**, 2106–17 (2015).
15. Uchinomiya, S., Nonaka, H., Wakayama, S., Ojida, A. & Hamachi, I. In-cell covalent labeling of reactive His-tag fused proteins. *Chem. Commun. (Camb)*. **49**, 5022–4 (2013).
16. Chen, Z., Jing, C., Gallagher, S. S., Sheetz, M. P. & Cornish, V. W. Second-generation covalent TMP-tag for live cell imaging. *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 13692–9 (2012).
17. Krusemark, C. J. & Belshaw, P. J. Covalent labelling of fusion proteins in live cells via an engineered receptor-ligand pair. *Org. Biomol. Chem.* **5**, 2201–4 (2007).
18. Takaoka, Y., Ojida, A. & Hamachi, I. Protein organic chemistry and applications for labeling and engineering in live-cell systems. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **52**, 4088–4106 (2013).
19. Di Ventura, B. & Kuhlman, B. Go in! Go out! Inducible control of nuclear localization. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **34**, 62–71 (2016).
20. Ibarra, A. & Hetzer, M. W. Nuclear pore proteins and the control of genome functions. *Genes Dev.* **29**, 337–349 (2015).
21. Paine, P. L., Moore, L. C. & Horowitz, S. B. Nuclear envelope permeability. *Nature* **254**, 109–14 (1975).
22. Kalderon, D., Roberts, B. L., Richardson, W. D. & Smith, A. E. A short amino acid sequence able to specify nuclear location. *Cell* **39**, 499–509 (1984).
23. Robbins, J., Dilworth, S. M., Laskey, R. A. & Dingwall, C. Two interdependent basic domains in nucleoplasmin nuclear targeting sequence: identification of a class of bipartite nuclear targeting sequence. *Cell* **64**, 615–23 (1991).
24. Fornerod, M., Ohno, M., Yoshida, M. & Mattaj, I. W. CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals. *Cell* **90**, 1051–60 (1997).

25. Fischer, U., Huber, J., Boelens, W. C., Mattaj, I. W. & Lührmann, R. The HIV-1 Rev activation domain is a nuclear export signal that accesses an export pathway used by specific cellular RNAs. *Cell* **82**, 475–83 (1995).
26. Wen, W., Meinkoth, J. L., Tsien, R. Y. & Taylor, S. S. Identification of a signal for rapid export of proteins from the nucleus. *Cell* **82**, 463–73 (1995).
27. Moll, T., Tebb, G., Surana, U., Robitsch, H. & Nasmyth, K. The role of phosphorylation and the CDC28 protein kinase in cell cycle-regulated nuclear import of the *S. cerevisiae* transcription factor SWI5. *Cell* **66**, 743–58 (1991).
28. Sbia, M. *et al.* Regulation of the yeast Ace2 transcription factor during the cell cycle. *J. Biol. Chem.* **283**, 11135–45 (2008).
29. Ge, Q. *et al.* Importin- α protein binding to a nuclear localization signal of carbohydrate response element-binding protein (ChREBP). *J. Biol. Chem.* **286**, 28119–27 (2011).
30. Saporita, A. J. *et al.* Identification and characterization of a ligand-regulated nuclear export signal in androgen receptor. *J. Biol. Chem.* **278**, 41998–2005 (2003).
31. Armstrong, E. H., Goswami, D., Griffin, P. R., Noy, N. & Ortlund, E. A. Structural basis for ligand regulation of the fatty acid-binding protein 5, peroxisome proliferator-activated receptor β/δ (FABP5-PPAR β/δ) signaling pathway. *J. Biol. Chem.* **289**, 14941–54 (2014).
32. Suzuki, H. *et al.* Heme regulates gene expression by triggering Crm1-dependent nuclear export of Bach1. *EMBO J.* **23**, 2544–53 (2004).
33. Resh, M. D. Covalent lipid modifications of proteins. *Curr. Biol.* **23**, R431–R435 (2013).
34. Resh, M. D. Fatty acylation of proteins: The long and the short of it. *Prog. Lipid Res.* **63**, 120–131 (2016).
35. Giang, D. K. & Cravatt, B. F. A second mammalian N-myristoyltransferase. *J. Biol. Chem.* **273**, 6595–8 (1998).
36. Rudnick, D. A. *et al.* Kinetic and structural evidence for a sequential ordered Bi Bi mechanism of catalysis by *Saccharomyces cerevisiae* myristoyl-CoA:protein N-myristoyltransferase. *J. Biol. Chem.* **266**, 9732–9 (1991).

37. Peitzsch, R. M. & McLaughlin, S. Binding of acylated peptides and fatty acids to phospholipid vesicles: pertinence to myristoylated proteins. *Biochemistry* **32**, 10436–43 (1993).
38. Sebti, S. M. Protein farnesylation: implications for normal physiology, malignant transformation, and cancer therapy. *Cancer Cell* **7**, 297–300 (2005).
39. Silvius, J. R., Bhagatji, P., Leventis, R. & Terrone, D. K-ras4B and prenylated proteins lacking ‘second signals’ associate dynamically with cellular membranes. *Mol. Biol. Cell* **17**, 192–202 (2006).
40. Mitchell, D. A., Mitchell, G., Ling, Y., Budde, C. & Deschenes, R. J. Mutational analysis of *Saccharomyces cerevisiae* Erf2 reveals a two-step reaction mechanism for protein palmitoylation by DHHC enzymes. *J. Biol. Chem.* **285**, 38104–38114 (2010).
41. Gottlieb, C. D., Zhang, S. & Linder, M. E. The cysteine-rich domain of the DHHC3 palmitoyltransferase is palmitoylated and contains tightly bound zinc. *J. Biol. Chem.* **290**, 29259–29269 (2015).
42. Kong, E. *et al.* Dynamic palmitoylation links cytosol-membrane shuttling of acyl-protein thioesterase-1 and acyl-protein thioesterase-2 with that of proto-oncogene H-Ras product and growth-associated Protein-43. *J. Biol. Chem.* **288**, 9112–9125 (2013).
43. Lin, D. T. S. & Conibear, E. ABHD17 proteins are novel protein depalmitoylases that regulate N-Ras palmitate turnover and subcellular localization. *Elife* **4**, 1–14 (2015).
44. Ullrich, O. *et al.* Rab GDP dissociation inhibitor as a general regulator for the membrane association of rab proteins. *J. Biol. Chem.* **268**, 18143–50 (1993).
45. Hoffman, G. R., Nassar, N. & Cerione, R. A. Structure of the Rho family GTP-binding protein Cdc42 in complex with the multifunctional regulator RhoGDI. *Cell* **100**, 345–56 (2000).
46. Bivona, T. G. *et al.* PKC regulates a farnesyl-electrostatic switch on K-Ras that promotes its association with Bcl-Xl on mitochondria and induces apoptosis. *Mol. Cell* **21**, 481–493 (2006).
47. Ames, J. B., Tanaka, T., Stryer, L. & Ikura, M. Portrait of a myristoyl switch protein. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **6**, 432–8 (1996).

48. Goldberg, J. Structural basis for activation of ARF GTPase: mechanisms of guanine nucleotide exchange and GTP-myristoyl switching. *Cell* **95**, 237–48 (1998).
49. Schroeder, H. *et al.* S-Acylation and plasma membrane targeting of the farnesylated carboxyl-terminal peptide of N-ras in mammalian fibroblasts. *Biochemistry* **36**, 13102–9 (1997).
50. Kanwal, C., Mu, S., Kern, S. E. & Lim, C. S. Bidirectional on/off switch for controlled targeting of proteins to subcellular compartments. *J. Control. Release* **98**, 379–93 (2004).
51. Lim, R. K. V, Li, N., Ramil, C. P. & Lin, Q. Fast and sequence-specific palladium-mediated cross-coupling reaction identified from phage display. *ACS Chem. Biol.* **9**, 2139–2148 (2014).
52. Giepmans, B. N. G., Adams, S. R., Ellisman, M. H. & Tsien, R. Y. The fluorescent toolbox for assessing protein location and function. *Science* **312**, 217–24 (2006).
53. Olenych, S. G., Claxton, N. S., Ottenberg, G. K. & Davidson, M. W. The fluorescent protein color palette. *Curr. Protoc. Cell Biol.* **Chapter 21**, Unit 21.5 (2007).
54. Tsien, R. Y. Constructing and exploiting the fluorescent protein paintbox (Nobel lecture). *Angew. Chemie Int. Ed.* **48**, 5612–5626 (2009).
55. Henderson, B. R. & Eleftheriou, A. A comparison of the activity, sequence specificity, and CRM1-dependence of different nuclear export signals. *Exp. Cell Res.* **256**, 213–224 (2000).
56. Szeto, T. H., Rowland, S. L., Habrukowich, C. L. & King, G. F. The MinD membrane targeting sequence is a transplantable lipid-binding helix. *J. Biol. Chem.* **278**, 40050–6 (2003).
57. Beutel, O. *et al.* High-fidelity protein targeting into membrane lipid microdomains in living cells. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **53**, 1311–5 (2014).
58. Jullien, L. & Gautier, A. Fluorogen-based reporters for fluorescence imaging: a review. *Methods Appl. Fluoresc.* **3**, 042007 (2015).
59. Spencer, D., Wandless, T., Schreiber, S. & Crabtree, G. Controlling signal transduction with synthetic ligands. *Science (80-.).* **262**, 1019–1024 (1993).

60. Rivera, V. M. *et al.* A humanized system for pharmacologic control of gene expression. *Nat. Med.* **2**, 1028–32 (1996).
61. Belshaw, P. J., Ho, S. N., Crabtree, G. R. & Schreiber, S. L. Controlling protein association and subcellular localization with a synthetic ligand that induces heterodimerization of proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 4604–7 (1996).
62. Czapinski, J. L. *et al.* Conditional glycosylation in eukaryotic cells using a biocompatible chemical inducer of dimerization. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 13186–13187 (2008).
63. Miyamoto, T. *et al.* Rapid and orthogonal logic gating with a gibberellin-induced dimerization system. *Nat. Chem. Biol.* **8**, 465–470 (2012).
64. Haruki, H., Nishikawa, J. & Laemmli, U. K. The anchor-away technique: Rapid, conditional establishment of yeast mutant phenotypes. *Mol. Cell* **31**, 925–932 (2008).
65. Robinson, M. S., Sahlender, D. A. & Foster, S. D. Rapid inactivation of proteins by rapamycin-induced rerouting to mitochondria. *Dev. Cell* **18**, 324–31 (2010).
66. Beyer, H. M. *et al.* Red light-regulated reversible nuclear localization of proteins in mammalian cells and zebrafish. *ACS Synth. Biol.* **4**, 951–958 (2015).
67. Clackson, T. *et al.* Redesigning an FKBP-ligand interface to generate chemical dimerizers with novel specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 10437–42 (1998).
68. Erhart, D. *et al.* Chemical development of intracellular protein heterodimerizers. *Chem. Biol.* **20**, 549–557 (2013).
69. Farrar, M. A., Alberola-Illa, J. & Perlmutter, R. M. Activation of the Raf-1 kinase cascade by coumermycin-induced dimerization. *Nature* **383**, 178–181 (1996).
70. Yang, X., Jost, A. P.-T., Weiner, O. D. & Tang, C. A light-inducible organelle-targeting system for dynamically activating and inactivating signaling in budding yeast. *Mol. Biol. Cell* **24**, 2419–30 (2013).
71. Hinner, M. J. & Johnsson, K. How to obtain labeled proteins and what to do with them. *Curr. Opin. Biotechnol.* **21**, 766–76 (2010).
72. Keppler, A. *et al.* A general method for the covalent labeling of fusion proteins with small molecules in vivo. *Nat. Biotechnol.* **21**, 86–89 (2002).

73. Mizukami, S., Watanabe, S., Hori, Y. & Kikuchi, K. Covalent protein labeling based on noncatalytic β -lactamase and a designed FRET substrate. *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 5016–5017 (2009).
74. Mizukami, S., Watanabe, S., Akimoto, Y. & Kikuchi, K. No-Wash Protein Labeling with Designed Fluorogenic Probes and Application to Real-Time Pulse-Chase Analysis. *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 1623–1629 (2012).
75. Gautier, A. *et al.* An engineered protein tag for multiprotein labeling in living cells. *Chem. Biol.* **15**, 128–136 (2008).
76. Los, G. V. *et al.* HaloTag: A novel protein labeling technology for cell imaging and protein analysis. *ACS Chem. Biol.* **3**, 373–382 (2008).
77. Hori, Y., Ueno, H., Mizukami, S. & Kikuchi, K. Photoactive yellow protein-based protein labeling system with turn-on fluorescence intensity. *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 16610–16611 (2009).
78. Hori, Y. *et al.* Development of fluorogenic probes for quick no-wash live-cell imaging of intracellular proteins. *J. Am. Chem. Soc.* **135**, 12360–5 (2013).
79. Zakeri, B. & Howarth, M. Spontaneous intermolecular amide bond formation between side chains for irreversible peptide targeting. *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 4526–7 (2010).
80. Bedbrook, C. N. *et al.* Genetically encoded spy peptide fusion System to detect plasma membrane-localized proteins in vivo. *Chem. Biol.* **22**, 1108–1121 (2015).
81. Calloway, N. T. *et al.* Optimized fluorescent trimethoprim derivatives for in vivo protein labeling. *ChemBioChem* **8**, 767–774 (2007).
82. Gallagher, S. S., Sable, J. E., Sheetz, M. P. & Cornish, V. W. An in vivo covalent TMP-Tag based on proximity-induced reactivity. *ACS Chem. Biol.* **4**, 547–556 (2009).
83. Liu, D. S. *et al.* Computational design of a red fluorophore ligase for site-specific protein labeling in living cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**, E4551–E4559 (2014).
84. Kapanidis, A. N., Ebright, Y. W. & Ebright, R. H. Site-specific incorporation of fluorescent probes into protein: hexahistidine-tag-mediated fluorescent labeling with (Ni²⁺:nitrilotriacetic acid)_n–fluorochrome conjugates. *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 12123–12125 (2001).

85. Tsutsumi, H. *et al.* Fluorogenically active leucine zipper peptides as tag-probe pairs for protein imaging in living cells. *Angew. Chemie Int. Ed.* **48**, 9164–9166 (2009).
86. Nomura, W., Ohashi, N., Mori, A. & Tamamura, H. An in-cell fluorogenic tag–probe system for protein dynamics imaging enabled by cell-penetrating peptides. *Bioconjug. Chem.* **26**, 1080–1085 (2015).
87. Griffin, B. A., Adams, S. R. & Tsien, R. Y. Specific covalent labeling of recombinant protein molecules inside live cells. *Science* **281**, 269–72 (1998).
88. Adams, S. R. *et al.* New biarsenical ligands and tetracysteine motifs for protein labeling in vitro and in vivo: synthesis and biological applications. *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 6063–76 (2002).
89. Lotze, J., Reinhardt, U., Seitz, O. & Beck-Sickinger, A. G. Peptide-tags for site-specific protein labelling in vitro and in vivo. *Mol. Biosyst.* **12**, 1731–1745 (2016).
90. Uchinomiya, S. *et al.* Site-specific covalent labeling of His-tag fused proteins with a reactive Ni(ii)–NTA probe. *Chem. Commun.* 5880 (2009). doi:10.1039/b912025d
91. Uchinomiya, S., Ojida, A. & Hamachi, I. Peptide tag/probe pairs based on the coordination chemistry for protein labeling. *Inorg. Chem.* **53**, 1816–1823 (2014).
92. Wang, L., Brock, A., Herberich, B. & Schultz, P. G. Expanding the genetic code of *Escherichia coli*. *Science (80-.)*. **292**, 498–500 (2001).
93. Neumann-Staubitz, P. & Neumann, H. The use of unnatural amino acids to study and engineer protein function. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **38**, 119–128 (2016).
94. Lang, K. & Chin, J. W. Cellular incorporation of unnatural amino acids and bioorthogonal labeling of proteins. *Chem. Rev.* **114**, 4764–806 (2014).
95. Chin, J. W. Expanding and reprogramming the genetic code of cells and animals. *Annu. Rev. Biochem.* **83**, 379–408 (2014).
96. Patterson, D. M. & Prescher, J. A. Orthogonal bioorthogonal chemistries. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **28**, 141–149 (2015).
97. Chang, H. *et al.* Light-induced protein translocation by genetically encoded unnatural amino acid in *Caenorhabditis elegans*. *Protein Cell* **4**, 883–886 (2013).
98. Li, J. *et al.* Palladium-triggered deprotection chemistry for protein activation in living cells. *Nat. Chem.* **6**, 352–361 (2014).

99. Wang, Y., Song, W., Hu, W. J. & Lin, Q. Fast alkene functionalization in vivo by photoclick chemistry: HOMO lifting of nitrile imine dipoles. *Angew. Chemie Int. Ed.* **48**, 5330–5333 (2009).
100. Zhang, X. *et al.* Second generation TQ-ligation for cell organelle imaging. *ACS Chem. Biol.* **10**, 1676–1683 (2015).
101. Hong, V., Steinmetz, N. F., Manchester, M. & Finn, M. G. Labeling live cells by copper-catalyzed alkyne–azide click chemistry. *Bioconjug. Chem.* **21**, 1912–1916 (2010).
102. Lang, K. *et al.* 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. *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 10317–10320 (2012).
103. Seitchik, J. L. *et al.* Genetically encoded retrazine amino acid directs rapid site-specific in vivo bioorthogonal ligation with trans -cyclooctenes. *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 2898–2901 (2012).
104. Kurra, Y. *et al.* Two rapid catalyst-free click reactions for in vivo protein labeling of genetically encoded strained alkene/alkyne functionalities. *Bioconjug. Chem.* **25**, 1730–1738 (2014).
105. Li, N., Lim, R. K. V, Edwardraja, S. & Lin, Q. Copper-free sonogashira cross-coupling for functionalization of alkyne-encoded proteins in aqueous medium and in bacterial cells. *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 15316–15319 (2011).
106. Laughlin, S. T., Baskin, J. M., Amacher, S. L. & Bertozzi, C. R. In vivo imaging of membrane-associated glycans in developing zebrafish. *Science* **320**, 664–7 (2008).
107. Chang, P. V *et al.* Copper-free click chemistry in living animals. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**, 1821–1826 (2010).
108. Ishida, M. *et al.* Synthetic self-localizing ligands that control the spatial location of proteins in living cells. *J. Am. Chem. Soc.* **135**, 12684–12689 (2013).
109. Long, M. J. C., Poganik, J. R. & Aye, Y. On-demand targeting: investigating biology with proximity-directed chemistry. *J. Am. Chem. Soc.* **138**, 3610–3622 (2016).
110. Baker, B. R. *Design of Active-Site-Directed Irreversible Enzyme Inhibitors.* (John Wiley & Sons, Inc., 1967).

111. Shannon, D. A. & Weerapana, E. Covalent protein modification: the current landscape of residue-specific electrophiles. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **24**, 18–26 (2015).
112. Garske, A. L., Peters, U., Cortesi, A. T., Perez, J. L. & Shokat, K. M. Chemical genetic strategy for targeting protein kinases based on covalent complementarity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 15046–52 (2011).
113. Tsuboi, K. *et al.* Potent and selective inhibitors of Glutathione S-Transferase omega 1 that impair cancer drug resistance. *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 16605–16616 (2011).
114. Leproult, E., Barluenga, S., Moras, D., Wurtz, J.-M. & Winssinger, N. Cysteine mapping in conformationally distinct kinase nucleotide binding sites: application to the design of selective covalent inhibitors. *J. Med. Chem.* **54**, 1347–1355 (2011).
115. Brauckhoff, N., Hahne, G., Yeh, J. T.-H. & Grossmann, T. N. Protein-templated peptide ligation. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **53**, 4337–40 (2014).
116. Cohen, M. S. Structural bioinformatics-based design of selective, irreversible kinase inhibitors. *Science (80-.)*. **308**, 1318–1321 (2005).
117. Meares, C. F. The chemistry of irreversible capture. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **60**, 1383–8 (2008).
118. Gunnoo, S. B. & Madder, A. Chemical protein modification through cysteine. *ChemBioChem* **17**, 529–553 (2016).
119. Chen, G. *et al.* Reactivity of functional groups on the protein surface: development of epoxide probes for protein labeling. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 8130–8133 (2003).
120. Marquez, B. V *et al.* Enhancing peptide ligand binding to vascular endothelial growth factor by covalent bond formation. *Bioconjug. Chem.* **23**, 1080–9 (2012).
121. Tanaka, K. *et al.* Cell surface biotinylation by azaelectrocyclization: easy-handling and versatile approach for living cell labeling. *Bioorg. Med. Chem.* **20**, 1865–8 (2012).
122. Yamaguchi, T. *et al.* Turn-ON fluorescent affinity labeling using a small bifunctional O-nitrobenzoxadiazole unit. *Chem. Sci.* **5**, 1021–1029 (2014).
123. Xiang, Z. *et al.* Adding an unnatural covalent bond to proteins through proximity-enhanced bioreactivity. *Nat. Methods* **10**, 885–8 (2013).

124. Amara, N. *et al.* Covalent Inhibition of Bacterial Quorum Sensing. *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 10610–10619 (2009).
125. Fry, D. W. *et al.* Specific, irreversible inactivation of the epidermal growth factor receptor and erbB2, by a new class of tyrosine kinase inhibitor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 12022–7 (1998).
126. Hagel, M. *et al.* Selective irreversible inhibition of a protease by targeting a noncatalytic cysteine. *Nat. Chem. Biol.* **7**, 22–4 (2011).
127. Gushwa, N. N., Kang, S., Chen, J. & Taunton, J. Selective targeting of distinct active site nucleophiles by irreversible SRC-family kinase inhibitors. *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 20214–7 (2012).
128. Janovjak, H., Szobota, S., Wyart, C., Trauner, D. & Isacoff, E. Y. A light-gated, potassium-selective glutamate receptor for the optical inhibition of neuronal firing. *Nat. Neurosci.* **13**, 1027–32 (2010).
129. Levitsky, K., Boersma, M. D., Ciolli, C. J. & Belshaw, P. J. Exo-mechanism proximity-accelerated alkylations: Investigations of linkers, electrophiles and surface mutations in engineered cyclophilin-cyclosporin systems. *ChemBioChem* **6**, 890–899 (2005).
130. Rayo, J., Amara, N., Krief, P. & Meijler, M. M. Live cell labeling of native intracellular bacterial receptors using aniline-catalyzed oxime ligation. *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 7469–7475 (2011).
131. Adam, G. C., Cravatt, B. F. & Sorensen, E. J. Profiling the specific reactivity of the proteome with non-directed activity-based probes. *Chem. Biol.* **8**, 81–95 (2001).
132. Hughes, C. C. *et al.* Marinopyrrole A target elucidation by acyl dye transfer. *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 12094–6 (2009).
133. Moreira, I. S., Fernandes, P. A. & Ramos, M. J. Hot spots - A review of the protein-protein interface determinant amino-acid residues. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **68**, 803–812 (2007).
134. London, N., Movshovitz-Attias, D. & Schueler-Furman, O. The structural basis of peptide-protein binding strategies. *Structure* **18**, 188–99 (2010).

135. Pelay-Gimeno, M., Glas, A., Koch, O. & Grossmann, T. N. Structure-based design of inhibitors of protein-protein interactions: Mimicking peptide binding epitopes. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **54**, 8896–927 (2015).
136. Chrivia, J. C. *et al.* Phosphorylated CREB binds specifically to the nuclear protein CBP. *Nature* **365**, 855–859 (1993).
137. Giordano, A. & Avantaggiati, M. L. p300 and CBP: partners for life and death. *J. Cell. Physiol.* **181**, 218–30 (1999).
138. Dyson, H. J. & Wright, P. E. Role of intrinsic protein disorder in the function and interactions of the transcriptional coactivators CREB-binding protein (CBP) and p300. *J. Biol. Chem.* **291**, 6714–6722 (2016).
139. Radhakrishnan, I. *et al.* Solution structure of the KIX domain of CBP bound to the transactivation domain of CREB: a model for activator:coactivator interactions. *Cell* **91**, 741–52 (1997).
140. Campbell, K. M. & Lumb, K. J. Structurally distinct modes of recognition of the KIX domain of CBP by Jun and CREB. *Biochemistry* **41**, 13956–64 (2002).
141. Parker, D. *et al.* Role of secondary structure in discrimination between constitutive and inducible activators. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 5601–7 (1999).
142. Vendel, A. C. & Lumb, K. J. NMR mapping of the HIV-1 Tat interaction surface of the KIX domain of the human coactivator CBP. *Biochemistry* **43**, 904–8 (2004).
143. Ernst, P., Wang, J., Huang, M., Goodman, R. H. & Korsmeyer, S. J. MLL and CREB bind cooperatively to the nuclear coactivator CREB-binding protein. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 2249–58 (2001).
144. Brüsweiler, S., Konrat, R. & Tollinger, M. Allosteric communication in the KIX domain proceeds through dynamic repacking of the hydrophobic core. *ACS Chem. Biol.* **8**, 1600–10 (2013).
145. Bayly, R. *et al.* E2A-PBX1 interacts directly with the KIX domain of CBP/p300 in the induction of proliferation in primary hematopoietic cells. *J. Biol. Chem.* **279**, 55362–71 (2004).

146. Lee, C. W., Arai, M., Martinez-Yamout, M. A., Dyson, H. J. & Wright, P. E. Mapping the interactions of the p53 transactivation domain with the KIX domain of CBP. *Biochemistry* **48**, 2115–24 (2009).
147. Garber, P. M., Vidanes, G. M. & Toczyski, D. P. Damage in transition. *Trends Biochem. Sci.* **30**, 63–6 (2005).
148. Denis, C. M. *et al.* Structural basis of CBP/p300 recruitment in leukemia induction by E2A-PBX1. *Blood* **120**, 3968–77 (2012).
149. Toto, A. & Gianni, S. Mutational analysis of the binding-induced folding reaction of the mixed-lineage leukemia protein to the KIX domain. *Biochemistry* **55**, 3957–3962 (2016).
150. De Guzman, R. N., Goto, N. K., Dyson, H. J. & Wright, P. E. Structural basis for cooperative transcription factor binding to the CBP coactivator. *J. Mol. Biol.* **355**, 1005–13 (2006).
151. Goto, N. K., Zor, T., Martinez-Yamout, M., Dyson, H. J. & Wright, P. E. Cooperativity in transcription factor binding to the coactivator CREB-binding protein (CBP). The mixed lineage leukemia protein (MLL) activation domain binds to an allosteric site on the KIX domain. *J. Biol. Chem.* **277**, 43168–74 (2002).
152. Arai, M., Dyson, H. J. & Wright, P. E. Leu628 of the KIX domain of CBP is a key residue for the interaction with the MLL transactivation domain. *FEBS Lett.* **584**, 4500–4 (2010).
153. Smith, D. B. & Johnson, K. S. Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene* **67**, 31–40 (1988).
154. Salamon, H. Mutation der KIX-Domäne zur selektiven Einführung von Cystein. (Technische Universität Dortmund, 2013).
155. Burns, J. a, Butler, J. C., Moran, J. & Whitesides, G. M. Selective reduction of disulfides by tris(2-carboxyethyl)phosphine. *J. Org. Chem.* **56**, 2648–2650 (1991).
156. Pullela, P. K., Chiku, T., Carvan, M. J. & Sem, D. S. Fluorescence-based detection of thiols in vitro and in vivo using dithiol probes. *Anal. Biochem.* **352**, 265–73 (2006).

157. Getz, E. B., Xiao, M., Chakrabarty, T., Cooke, R. & Selvin, P. R. A comparison between the sulfhydryl reductants Tris(2-carboxyethyl)phosphine and Dithiothreitol for use in protein biochemistry. *Anal. Biochem.* **273**, 73–80 (1999).
158. Harper, S. & Speicher, D. W. Purification of proteins fused to glutathione S-transferase. *Methods Mol. Biol.* **681**, 259–80 (2011).
159. Frangioni, J. V & Neel, B. G. Solubilization and purification of enzymatically active glutathione S-transferase (pGEX) fusion proteins. *Anal. Biochem.* **210**, 179–87 (1993).
160. Terpe, K. Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **60**, 523–533 (2003).
161. Schägger, H. & von Jagow, G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* **166**, 368–79 (1987).
162. Thiede, B. *et al.* Analysis of missed cleavage sites, tryptophan oxidation and N-terminal pyroglutamylation after in-gel tryptic digestion. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **14**, 496–502 (2000).
163. Cox, J. & Mann, M. MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nat. Biotechnol.* **26**, 1367–72 (2008).
164. Janning, P. persönliche Mitteilung.
165. Atherton, E. *et al.* A mild procedure for solid phase peptide synthesis: use of fluorenylmethoxycarbonylamino-acids. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **3**, 537 (1978).
166. Atherton, E., Fox, H., Harkiss, D. & Sheppard, R. C. Application of polyamide resins to polypeptide synthesis: an improved synthesis of β -endorphin using fluorenylmethoxycarbonylamino-acids. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **3**, 539–540 (1978).
167. Fields, G. B. Introduction to peptide synthesis. *Curr. Protoc. Immunol.* **Chapter 9**, Unit 9.1 (2002).

168. Albericio, F. *et al.* Preparation and application of the 5-(4-(9-fluorenylmethyloxycarbonyl)aminomethyl-3,5-dimethoxyphenoxy)-valeric acid (PAL) handle for the solid-phase synthesis of C-terminal peptide amides under mild conditions. *J. Org. Chem.* **55**, 3730–3743 (1990).
169. Gentilucci, L., De Marco, R. & Cerisoli, L. Chemical modifications designed to improve peptide stability: incorporation of non-natural amino acids, pseudo-peptide bonds, and cyclization. *Curr. Pharm. Des.* **16**, 3185–203 (2010).
170. Dubowchik, G. M. & Radia, S. Monomethoxytrityl (MMT) as a versatile amino protecting group for complex prodrugs of anticancer compounds sensitive to strong acids, bases and nucleophiles. *Tetrahedron Lett.* **38**, 5257–5260 (1997).
171. Matysiak, S., Böldicke, T., Tegge, W. & Frank, R. Evaluation of monomethoxytrityl and dimethoxytrityl as orthogonal amino protecting groups in Fmoc solid phase peptide synthesis. *Tetrahedron Lett.* **39**, 1733–1734 (1998).
172. Fretz, M. M. *et al.* Temperature-, concentration- and cholesterol-dependent translocation of L- and D-octa-arginine across the plasma and nuclear membrane of CD34 + leukaemia cells. *Biochem. J.* **403**, 335–342 (2007).
173. Dias, E. L., Nguyen, S. T. & Grubbs, R. H. Well-defined Ruthenium olefin metathesis catalysts: mechanism and activity. *J. Am. Chem. Soc.* **119**, 3887–3897 (1997).
174. Walensky, L. D. & Bird, G. H. Hydrocarbon-stapled peptides: principles, practice, and progress. *J. Med. Chem.* **57**, 6275–6288 (2014).
175. Toniolo, C. *et al.* Structures of peptides from α -amino acids methylated at the α -carbon. *Biopolymers* **33**, 1061–1072 (1993).
176. Blackwell, H. E. & Grubbs, R. H. Highly efficient synthesis of covalently cross-linked peptide helices by ring-closing metathesis. *Angew. Chemie Int. Ed.* **37**, 3281–3284 (1998).
177. Sun, T.-L., Sun, Y., Lee, C. & Huang, H. W. Membrane permeability of hydrocarbon-cross-linked peptides. *Biophys. J.* **104**, 1923–1932 (2013).
178. Glas, A. *et al.* Constrained peptides with target-adapted cross-links as inhibitors of a pathogenic protein-protein interaction. *Angew. Chemie Int. Ed.* **53**, 2489–2493 (2014).

179. Chu, Q. *et al.* Towards understanding cell penetration by stapled peptides. *Med. Chem. Commun.* **6**, 111–119 (2015).
180. Grossmann, T. N. *et al.* Inhibition of oncogenic Wnt signaling through direct targeting of -catenin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**, 17942–17947 (2012).
181. Sjöback, R., Nygren, J. & Kubista, M. Absorption and fluorescence properties of fluorescein. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **51**, L7–L21 (1995).
182. Klonis, N., Sawyer, W. H. & Sawyer, H. Spectral properties of the prototropic forms of fluorescein in aqueous solution. *J. Fluoresc.* **6**, 147–157 (1996).
183. Grossmann, T. N. & Seitz, O. Nucleic acid templated reactions: consequences of probe reactivity and readout strategy for amplified signaling and sequence selectivity. *Chem. - A Eur. J.* **15**, 6723–6730 (2009).
184. Weerapana, E. *et al.* Quantitative reactivity profiling predicts functional cysteines in proteomes. *Nature* **468**, 790–795 (2010).
185. Hol, W. G. Effects of the alpha-helix dipole upon the functioning and structure of proteins and peptides. *Adv. Biophys.* **19**, 133–65 (1985).
186. Østergaard, H., Tachibana, C. & Winther, J. R. Monitoring disulfide bond formation in the eukaryotic cytosol. *J. Cell Biol.* **166**, 337–345 (2004).
187. Kronman, C. *et al.* Production and secretion of high levels of recombinant human acetylcholinesterase in cultured cell lines: microheterogeneity of the catalytic subunit. *Gene* **121**, 295–304 (1992).
188. Fang, X. J., Keating, A., de Villiers, J. & Sherman, M. Tissue-specific activity of heterologous viral promoters in primary rat hepatocytes and Hep G2 cells. *Hepatology* **10**, 781–7 (1989).
189. Thompson, T. A., Gould, M. N., Burkholder, J. K. & Yang, N. Transient promoter activity in primary rat mammary epithelial cells evaluated using particle bombardment gene transfer. *Vitr. Cell Dev Biol* **29A**, 165–170 (1993).
190. Wenger, R. H., Moreau, H. & Nielsen, P. J. A comparison of different promoter, enhancer, and cell type combinations in transient transfections. *Anal. Biochem.* **221**, 416–418 (1994).

191. Foecking, M. K. & Hofstetter, H. Powerful and versatile enhancer-promoter unit for mammalian expression vectors. *Gene* **45**, 101–105 (1986).
192. Liu, Z., Cashion, L. M. & Twu, J. J. A systematic comparison of relative promoter/enhancer activities in mammalian cell lines. *Anal. Biochem.* **246**, 150–2 (1997).
193. Zarrin, A. A. *et al.* Comparison of CMV, RSV, SV40 viral and Vlambda1 cellular promoters in B and T lymphoid and non-lymphoid cell lines. *Biochim. Biophys. Acta* **1446**, 135–9 (1999).
194. Fairman, K. & Jacobson, B. S. Unique morphology of HeLa cell attachment, spreading and detachment from microcarrier beads covalently coated with a specific and non-specific substratum. *Tissue Cell* **15**, 167–180 (1983).
195. Thakur, J. K., Yadav, A. & Yadav, G. Molecular recognition by the KIX domain and its role in gene regulation. *Nucleic Acids Res.* **42**, 2112–2125 (2014).
196. Patel, M. *et al.* Modification of HEK 293 cell integrin expression profile allows convenient large-scale roller bottle production of lentiviral vectors. *Mol. Ther.* **9**, 33 (2004).
197. Thomas, P. & Smart, T. G. HEK293 cell line: A vehicle for the expression of recombinant proteins. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* **51**, 187–200 (2005).
198. Lea, T. *et al.* Monosized, magnetic polymer particles: their use in separation of cells and subcellular components, and in the study of lymphocyte function in vitro. *J. Mol. Recognit.* **1**, 9–18 (1988).
199. DeChancie, J. & Houk, K. N. The origins of femtomolar protein–ligand binding: Hydrogen-bond cooperativity and desolvation energetics in the Biotin–(Strept)Avidin binding site. *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 5419–5429 (2007).
200. Bao, B., Rodriguez-Melendez, R., Wijeratne, S. S. K. & Zempleni, J. Biotin regulates the expression of holocarboxylase synthetase in the miR-539 pathway in HEK-293 cells. *J. Nutr.* **140**, 1546–1551 (2010).
201. Mall, G. K., Chew, Y. C. & Zempleni, J. Biotin requirements are lower in human Jurkat lymphoid cells but homeostatic mechanisms are similar to those of HepG2 liver cells. *J. Nutr.* **140**, 1086–1092 (2010).

202. González, M. *et al.* Interaction of biotin with streptavidin. Thermostability and conformational changes upon binding. *J. Biol. Chem.* **272**, 11288–94 (1997).
203. Holmberg, A. *et al.* The biotin-streptavidin interaction can be reversibly broken using water at elevated temperatures. *Electrophoresis* **26**, 501–10 (2005).
204. Schmidt, T. G. M. & Skerra, A. The Strep-tag system for one-step purification and high-affinity detection or capturing of proteins. *Nat. Protoc.* **2**, 1528–35 (2007).
205. Hirsch, J. D. *et al.* Easily reversible desthiobiotin binding to streptavidin, avidin, and other biotin-binding proteins: uses for protein labeling, detection, and isolation. *Anal. Biochem.* **308**, 343–57 (2002).
206. Finn, F. M., Titus, G. & Hofmann, K. Ligands for insulin receptor isolation. *Biochemistry* **23**, 2554–2558 (1984).
207. Müller, W. *et al.* Attempts to mimic docking processes of the immune system: recognition-induced formation of protein multilayers. *Science* **262**, 1706–8 (1993).
208. Chaloin, L. *et al.* Design of carrier peptide-oligonucleotide conjugates with rapid membrane translocation and nuclear localization properties. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **243**, 601–8 (1998).
209. Bader, B. *et al.* Bioorganic synthesis of lipid-modified proteins for the study of signal transduction. *Nature* **403**, 223–6 (2000).
210. Resh, M. D. Trafficking and signaling by fatty-acylated and prenylated proteins. *Nat. Chem. Biol.* **2**, 584–590 (2006).
211. Schmick, M. *et al.* KRas localizes to the plasma membrane by spatial cycles of solubilization, trapping and vesicular transport. *Cell* **157**, 459–71 (2014).
212. Smith, G. P. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* **228**, 1315–7 (1985).
213. Goldflam, M. & Ullman, C. G. Recent advances toward the discovery of drug-like peptides de novo. *Front. Chem.* **3**, 69 (2015).
214. Duplan, V. *et al.* Synthesis of sesquiterpene-inspired derivatives designed for covalent binding and their inhibition of the NF- κ B pathway. *Org. Biomol. Chem.* **12**, 370–5 (2014).

215. Barglow, K. T. & Cravatt, B. F. Discovering disease-associated enzymes by proteome reactivity profiling. *Chem. Biol.* **11**, 1523–1531 (2004).
216. Zhang, F., Timm, K. A., Arndt, K. M. & Woolley, G. A. Photocontrol of coiled-coil proteins in living cells. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **49**, 3943–3946 (2010).
217. Pace, N. J., Pimental, D. R. & Weerapana, E. An inhibitor of glutathione S-transferase omega 1 that selectively targets apoptotic cells. *Angew. Chemie Int. Ed.* **51**, 8365–8368 (2012).
218. Liu, P. *et al.* A bioorthogonal small-molecule-switch system for controlling protein function in live cells. *Angew. Chemie Int. Ed.* **53**, 10049–10055 (2014).
219. Feng, S. *et al.* A rapidly reversible chemical dimerizer system to study lipid signaling in living cells. *Angew. Chemie Int. Ed.* **53**, 6720–6723 (2014).
220. Heitz, F., Morris, M. C. & Divita, G. Twenty years of cell-penetrating peptides: from molecular mechanisms to therapeutics. *Br. J. Pharmacol.* **157**, 195–206 (2009).
221. Ruben, S. *et al.* Structural and functional characterization of human immunodeficiency virus tat protein. *J. Virol.* **63**, 1–8 (1989).
222. Vives, E., Brodin, P. & Lebleu, B. A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the Ccell nucleus. *J. Biol. Chem.* **272**, 16010–16017 (1997).
223. Morris, M. C., Deshayes, S., Heitz, F. & Divita, G. Cell-penetrating peptides: from molecular mechanisms to therapeutics. *Biol. Cell* **100**, 201–17 (2008).
224. Mandel, M. & Higa, A. Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J. Mol. Biol.* **53**, 159–62 (1970).
225. Dagert, M. & Ehrlich, S. D. Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of Escherichia coli cells. *Gene* **6**, 23–8 (1979).
226. Cohen, S. N., Chang, A. C. & Hsu, L. Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of Escherichia coli by R-factor DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **69**, 2110–4 (1972).
227. Matsumura, I. Why Johnny can't clone: Common pitfalls and not so common solutions. *Biotechniques* **59**, IV–XIII (2015).

228. Teare, J. M. *et al.* Measurement of nucleic acid concentrations using the DyNA Quant and the GeneQuant. *Biotechniques* **22**, 1170–4 (1997).
229. Gallagher, S. R. Quantitation of DNA and RNA with absorption and fluorescence spectroscopy. *Curr. Protoc. Neurosci.* **Appendix 1**, Appendix 1K (2011).
230. Lacks, S. & Greenberg, B. A deoxyribonuclease of *Diplococcus pneumoniae* specific for methylated DNA. *J. Biol. Chem.* **250**, 4060–66 (1975).
231. Vovis, G. F. & Lacks, S. Complementary action of restriction enzymes endo R · DpnI and endo R · DpnII on bacteriophage f1 DNA. *J. Mol. Biol.* **115**, 525–538 (1977).
232. Weiss, B., Jacquemin-Sablon, A., Live, T. R., Fareed, G. C. & Richardson, C. C. Enzymatic breakage and joining of deoxyribonucleic acid. VI. Further purification and properties of polynucleotide ligase from *Escherichia coli* infected with bacteriophage T4. *J. Biol. Chem.* **243**, 4543–55 (1968).
233. Oliner, J. D., Kinzler, K. W. & Vogelstein, B. In vivo cloning of PCR products in *E. coli*. *Nucleic Acids Res.* **21**, 5192–7 (1993).
234. Ornstein, L. Disc electrophoresis-I background and theory*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **121**, 321–349 (2006).
235. Dyballa, N. & Metzger, S. in *Quantitative Methods in Proteomics* **893**, 47–59 (Springer Science+Business Media, 2012).
236. Winkler, C., Denker, K., Wortelkamp, S. & Sickmann, A. Silver- and Coomassie-staining protocols: detection limits and compatibility with ESI MS. *Electrophoresis* **28**, 2095–9 (2007).
237. Ortiz, M. L. *et al.* Imidazole-SDS-Zn reverse staining of proteins in gels containing or not SDS and microsequence of individual unmodified electroblotted proteins. *FEBS Lett.* **296**, 300–4 (1992).
238. Lin, C.-Y. *et al.* A comprehensive evaluation of imidazole-zinc reverse stain for current proteomic researches. *Proteomics* **9**, 696–709 (2009).
239. Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **76**, 4350–4 (1979).

240. Marquette, C. A. & Blum, L. J. Applications of the luminol chemiluminescent reaction in analytical chemistry. *Anal. Bioanal. Chem.* **385**, 546–54 (2006).
241. Osman, A. M., Zomer, G., Laane, C. & Hilhorst, R. Comparative studies of the chemiluminescent horseradish peroxidase-catalysed peroxidation of acridan (GZ-11) and luminol reactions: effect of pH and scavengers of reactive oxygen species on the light intensity of these systems. *Luminescence* **15**, 189–97 (2000).
242. MacPhee, D. J. Methodological considerations for improving Western blot analysis. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* **61**, 171–7 (2010).
243. Ambroz, K. L. H. Improving quantification accuracy for western blots. *Image Anal.* (2006).
244. Smejkal, G. B. & Kaul, C. A. Stability of nitroblue tetrazolium-based alkaline phosphatase substrates. *J. Histochem. Cytochem.* **49**, 1189–90 (2001).
245. McGadey, J. A tetrazolium method for non-specific alkaline phosphatase. *Histochemie.* **23**, 180–4 (1970).
246. Blake, M. S., Johnston, K. H., Russell-Jones, G. J. & Gotschlich, E. C. A rapid, sensitive method for detection of alkaline phosphatase-conjugated anti-antibody on Western blots. *Anal. Biochem.* **136**, 175–9 (1984).
247. Fields, G. B. in *Peptide Synthesis Protocols* (eds. Pennington, M. W. & Dunn, B. M.) **35**, 17–28 (Humana Press, 1994).
248. Coste, J., Le-Nguyen, D. & Castro, B. PyBOP®: A new peptide coupling reagent devoid of toxic by-product. *Tetrahedron Lett.* **31**, 205–208 (1990).
249. Sabatino, G. *et al.* Assessment of new 6-CI-HOBt based coupling reagents for peptide synthesis. Part 1: Coupling efficiency study. *Lett. Pept. Sci.* **9**, 119–123 (2002).
250. El-Faham, A., Funosas, R. S., Prohens, R. & Albericio, F. COMU: A safer and more effective replacement for benzotriazole-based uronium coupling reagents. *Chem. - A Eur. J.* **15**, 9404–9416 (2009).
251. Al-Warhi, T. I., Al-Hazimi, H. M. A. & El-Faham, A. Recent development in peptide coupling reagents. *J. Saudi Chem. Soc.* **16**, 97–116 (2012).

252. König, W. & Geiger, R. Eine neue Methode zur Synthese von Peptiden: Aktivierung der Carboxylgruppe mit Dicyclohexylcarbodiimid unter Zusatz von 1-Hydroxybenzotriazolen. *Chem. Ber.* **103**, 788–798 (1970).
253. Carpino, L. A. 1-Hydroxy-7-azabenzotriazole. An efficient peptide coupling additive. *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 4397–4398 (1993).
254. Subirós-Funosas, R., Prohens, R., Barbas, R., El-Faham, A. & Albericio, F. Oxyma: An efficient additive for peptide synthesis to replace the Benzotriazole-based HOBt and HOAt with a lower risk of explosion. *Chem. - A Eur. J.* **15**, 9394–9403 (2009).
255. Spiegel, J. persönliche Mitteilung.
256. Kaiser, E., Colescott, R. L., Bossinger, C. D. & Cook, P. I. Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides. *Anal. Biochem.* **34**, 595–598 (1970).
257. Vojtkovsky, T. Detection of secondary amines on solid phase. *Pept. Res.* **8**, 236–7
258. Claerhout, S., Ermolat'ev, D. S. & Van der Eycken, E. V. A new colorimetric test for solid-phase amines and thiols. *J. Comb. Chem.* **10**, 580–585 (2008).
259. Boas, U. & Mirsharghi, S. Color test for selective detection of secondary amines on resin and in solution. *Org. Lett.* **16**, 5918–21 (2014).
260. *CRC handbook of chemistry and physics: a ready-reference book of chemical and physical data.* (CRC Press LLC, 1999).
261. Subirós-Funosas, R., Nieto-Rodríguez, L., Jensen, K. J. & Albericio, F. COMU: scope and limitations of the latest innovation in peptide acyl transfer reagents. *J. Pept. Sci.* **19**, 408–14 (2013).
262. Küpper, A. persönliche Mitteilung.
263. Dietrich, L. persönliche Mitteilung.
264. Klonis, N., Clayton, A. H., Voss, E. W. & Sawyer, W. H. Spectral properties of fluorescein in solvent-water mixtures: applications as a probe of hydrogen bonding environments in biological systems. *Photochem. Photobiol.* **67**, 500–10 (1998).
265. Perrin, F. Polarisation de la lumière de fluorescence. Vie moyenne des molécules dans l'état excité. *J. Phys. le Radium* **7**, 390–401 (1926).

266. Roehrl, M. H. A., Wang, J. Y. & Wagner, G. A general framework for development and data analysis of competitive high-throughput screens for small-molecule inhibitors of protein–protein interactions by fluorescence polarization. *Biochemistry* **43**, 16056–16066 (2004).
267. Huang, X. & Aulabaugh, A. in *High Throughput Screening, Methods and Protocols* (eds. Janzen, W. P. & Bernasconi, P.) **565**, 127–143 (Humana Press, 2009).
268. Zhang, R. *et al.* Fluorescence polarization assay and inhibitor design for MDM2/p53 interaction. *Anal. Biochem.* **331**, 138–46 (2004).
269. Case, D. A. Berryman, J. T. Betz, R. M. Cerutti, D. S. Cheatham, T. E. III, Darden, T. A. Duke, R. E. Giese, T. J. Gohlke, H. Goetz, A.W. Homeyer, N. Izadi, S. Janowski, P. Kaus, J. Kovalenko, A. Lee, T. S. LeGrand, S. Li, P. Luchko, T. Luo, R. Madej, B., S. F. AMBER14. (2015).
270. Götz, A. W. *et al.* Routine microsecond molecular dynamics simulations with AMBER on GPUs. 1. Generalized born. *J. Chem. Theory Comput.* **8**, 1542–1555 (2012).
271. Salomon-Ferrer, R., Götz, A. W., Poole, D., Le Grand, S. & Walker, R. C. Routine microsecond molecular dynamics simulations with AMBER on GPUs. 2. Explicit solvent particle mesh ewald. *J. Chem. Theory Comput.* **9**, 3878–3888 (2013).
272. Wang, J., Wolf, R. M., Caldwell, J. W., Kollman, P. A. & Case, D. A. Development and testing of a general amber force field. *J. Comput. Chem.* **25**, 1157–74 (2004).
273. Bayly, C. I., Cieplak, P., Cornell, W. & Kollman, P. A. A well-behaved electrostatic potential based method using charge restraints for deriving atomic charges: the RESP model. *J. Phys. Chem.* **97**, 10269–10280 (1993).
274. Wang, J., Wang, W., Kollman, P. A. & Case, D. A. Automatic atom type and bond type perception in molecular mechanical calculations. *J. Mol. Graph. Model.* **25**, 247–60 (2006).
275. Hornak, V. *et al.* Comparison of multiple Amber force fields and development of improved protein backbone parameters. *Proteins* **65**, 712–25 (2006).
276. Maier, J. A. *et al.* ff14SB: Improving the accuracy of protein side chain and backbone parameters from ff99SB. *J. Chem. Theory Comput.* **11**, 3696–3713 (2015).

277. Jorgensen, W. L., Chandrasekhar, J., Madura, J. D., Impey, R. W. & Klein, M. L. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *J. Chem. Phys.* **79**, 926 (1983).
278. Berendsen, H. J. C., Postma, J. P. M., van Gunsteren, W. F., DiNola, A. & Haak, J. R. Molecular dynamics with coupling to an external bath. *J. Chem. Phys.* **81**, 3684 (1984).
279. Ryckaert, J.-P., Ciccotti, G. & Berendsen, H. J. C. Numerical integration of the cartesian equations of motion of a system with constraints: molecular dynamics of n-alkanes. *J. Comput. Phys.* **23**, 327–341 (1977).
280. Darden, T., York, D. & Pedersen, L. Particle mesh Ewald: An N·log(N) method for Ewald sums in large systems. *J. Chem. Phys.* **98**, 10089 (1993).
281. Essmann, U. *et al.* A smooth particle mesh Ewald method. *J. Chem. Phys.* **103**, 8577 (1995).
282. Pierce, L. C. T., Salomon-Ferrer, R., Augusto F. de Oliveira, C., McCammon, J. A. & Walker, R. C. Routine Access to Millisecond Time Scale Events with Accelerated Molecular Dynamics. *J. Chem. Theory Comput.* **8**, 2997–3002 (2012).
283. Aqvist, J., Luzhkov, V. B. & Brandsdal, B. O. Ligand binding affinities from MD simulations. *Acc. Chem. Res.* **35**, 358–65 (2002).
284. Brandsdal, B. O. *et al.* Free energy calculations and ligand binding. *Adv. Protein Chem.* **66**, 123–58 (2003).
285. Huang, H. *et al.* Trypsin-induced proteome alteration during cell subculture in mammalian cells. *J. Biomed. Sci.* **17**, 36 (2010).
286. Strober, W. in *Current Protocols in Immunology* **Appendix 3**, Appendix 3B (John Wiley & Sons, Inc., 2001).
287. Melzer, S. *et al.* Trypan blue as an affordable marker for automated live-dead cell analysis in image cytometry. *Scanning* **9999**, 1–7 (2016).
288. Webster, T. D. & Dickson, R. C. Direct selection of *Saccharomyces cerevisiae* resistant to the antibiotic G418 following transformation with a DNA vector carrying the kanamycin-resistance gene of Tn903. *Gene* **26**, 243–52 (1983).

289. Meneguzzi, G., Binétruy, B., Grisoni, M. & Cuzin, F. Plasmidial maintenance in rodent fibroblasts of a BPV1-pBR322 shuttle vector without immediately apparent oncogenic transformation of the recipient cells. *EMBO J.* **3**, 365–71 (1984).
290. Goedhart, J. *et al.* Structure-guided evolution of cyan fluorescent proteins towards a quantum yield of 93%. *Nat. Commun.* **3**, 751 (2012).
291. Garen, A. & Levinthal, C. A fine-structure genetic and chemical study of the enzyme alkaline phosphatase of *E. Coli* I. Purification and characterization of alkaline phosphatase. *Biochim. Biophys. Acta* **38**, 470–483 (1960).
292. Maxam, A. M. & Gilbert, W. in *METHODS IN ENZYMOLOGY* **65**, 499–560 (1980).

8 Anhang

8.1 Daten zu Plasmiden

8.1.1 Vektorkarten

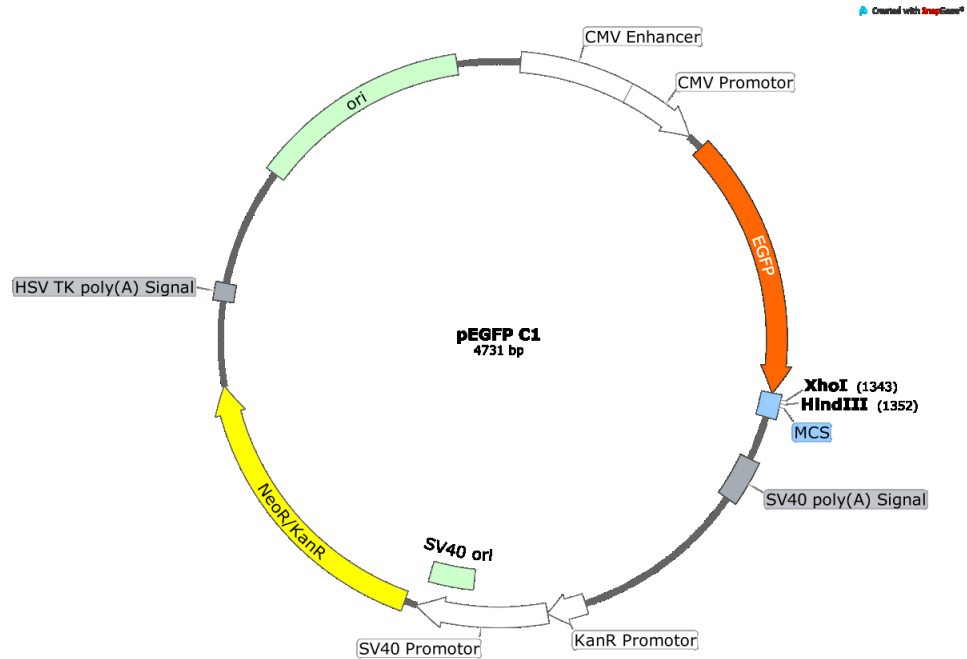


Abbildung A1: Vektorkarte des in humanen Zellen zu exprimierenden Vektors pEGFP C1 zur Klonierung C-terminaler Fusionsproteine mit dem fluoreszierenden Protein eGFP. Die Schnittstellen der in dieser Arbeit zur Klonierung verwendeten Endorestriktionsnukleasen sind markiert.

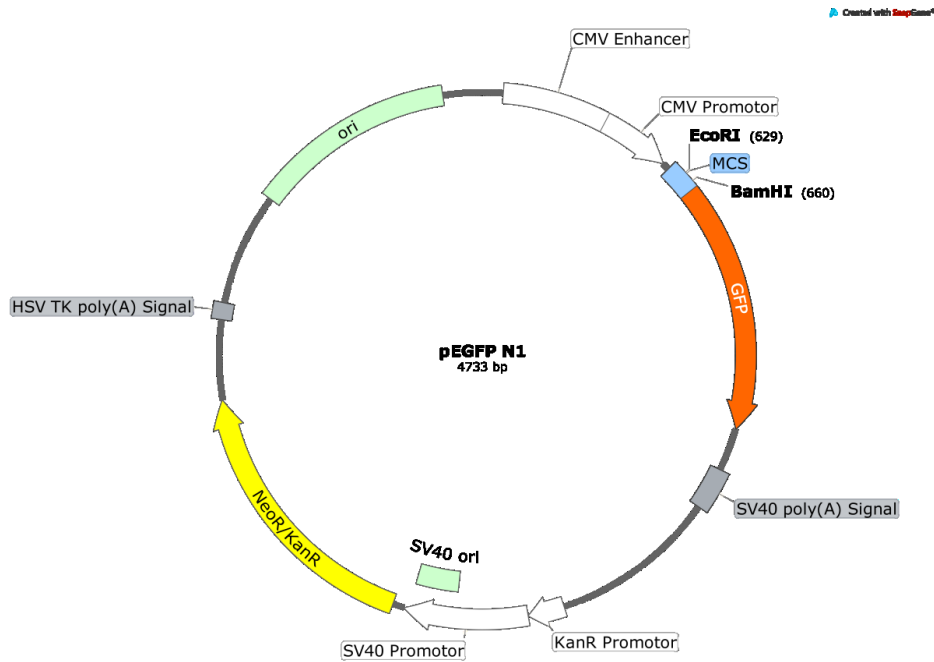


Abbildung A2: Vektorkarte des in humanen Zellen zu exprimierenden Vektors pEGFP N1 zur Klonierung N-terminaler Fusionsproteine mit dem fluoreszierenden Protein eGFP. Die Schnittstellen der in dieser Arbeit zur Klonierung verwendeten Endorestriktionsnukleasen sind markiert.

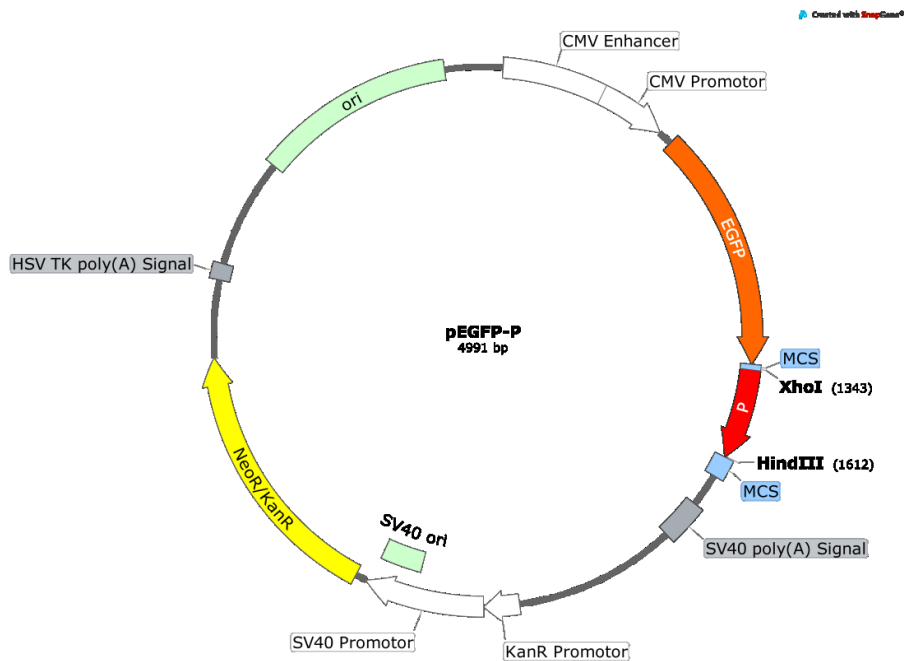


Abbildung A3: Vektorkarte des in humanen Zellen zu exprimierenden Vektors pEGFP-P zur Expression von eGFP-P-Fusionsproteinen der Proteinvarianten P(WT) und P(C638) mit dem fluoreszierenden Protein eGFP. Die Schnittstellen der in dieser Arbeit zur Klonierung verwendeten Endorestriktionsnukleasen sind markiert.

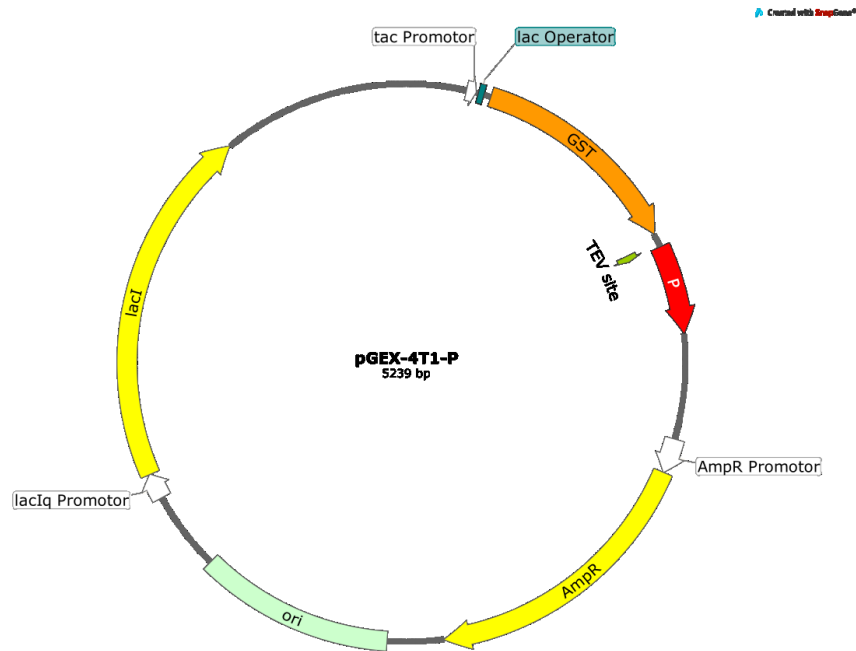


Abbildung A4: Vektorkarte des in *E. coli*-Zellen zu exprimierenden Vektors pGEX-4T1-P zur Expression von GST-P-Fusionsproteinen aller sieben Proteinvarianten.

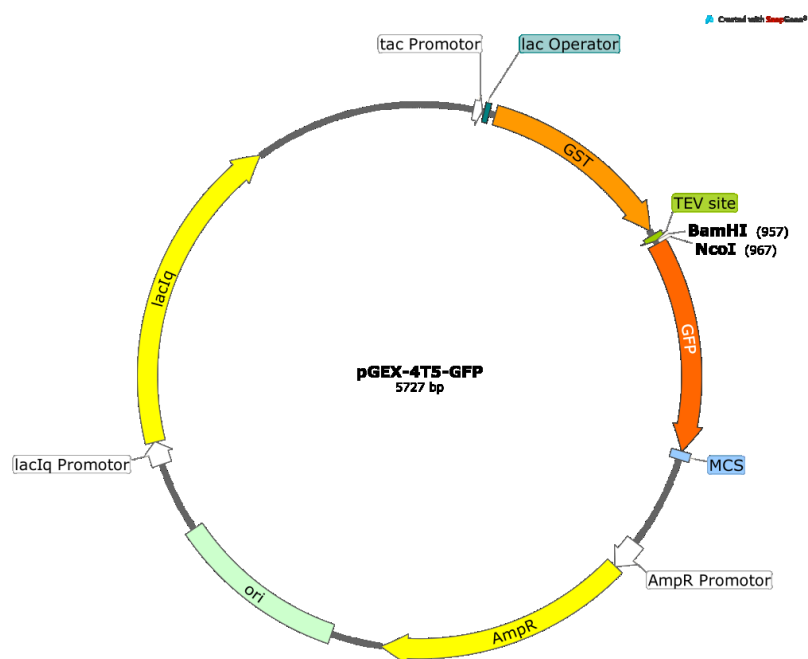


Abbildung A5: Vektorkarte des in *E. coli*-Zellen zu exprimierenden Vektors pGEX-4T5-GFP zur Expression eines GST-GFP-Fusionsproteins. Die Schnittstellen der in dieser Arbeit zur Klonierung verwendeten Endorestriktionsnukleasen sind markiert.

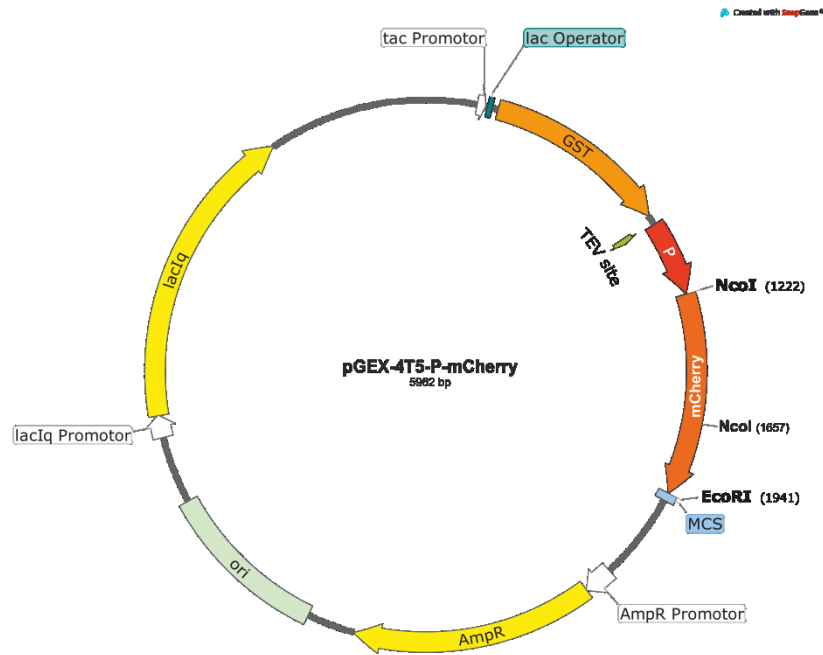


Abbildung A6: Vektorkarte des in *E. coli*-Zellen zu exprimierenden Vektors pGEX-4T5-P-mCherry zur Expression eines **GST-P-mCherry**-Fusionsproteins der Proteinvarianten **P(WT)** und **P(C638)**. Die Schnittstelle der in dieser Arbeit zur *in vivo*-Klonierung verwendeten Endorestriktionsnukleasen *NcoI* und *EcoRI* sind ebenso markiert wie die bei der Restriktions-Ligations-Klonierung störende *NcoI*-Schnittstelle innerhalb der mCherry-Sequenz.

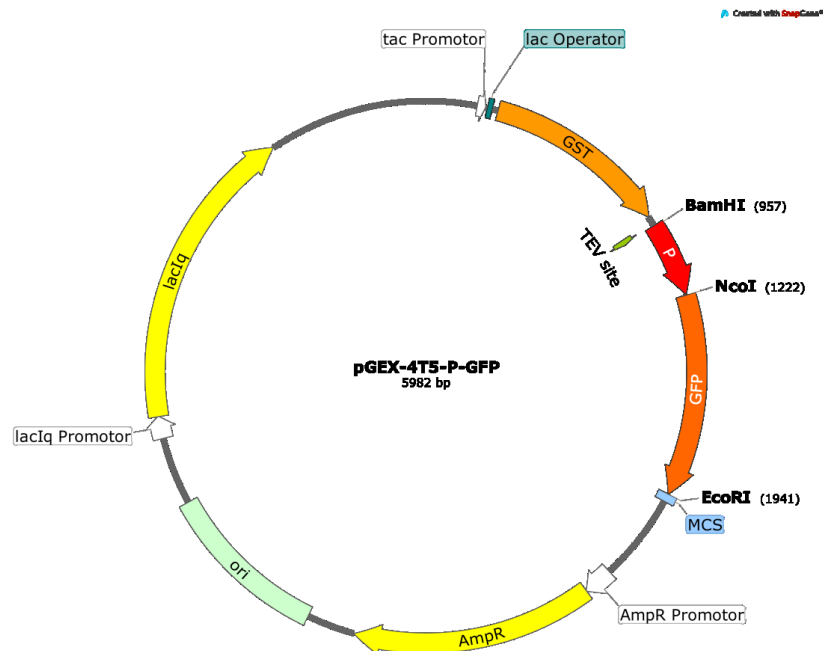


Abbildung A7: Vektorkarte des in *E. coli*-Zellen zu exprimierenden Vektors pGEX-4T5-P-GFP zur Expression eines **GST-P-GFP**-Fusionsproteins der Proteinvarianten **P(WT)** und **P(C638)**. Die Schnittstellen der in dieser Arbeit zur Klonierung verwendeten Endorestriktionsnukleasen sind markiert.

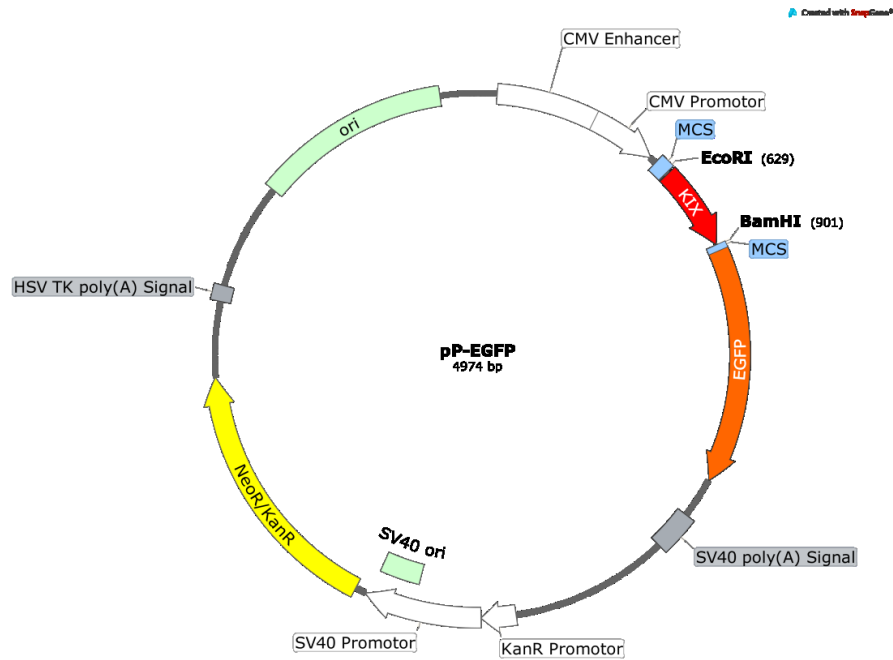


Abbildung A8: Vektorkarte des in humanen Zellen zu exprimierenden Vektors pP-eGFP zur Expression eines **P-eGFP**-Fusionsproteins der Proteinvarianten **P(WT)** und **P(C638)**. Die Schnittstellen der in dieser Arbeit zur Klonierung verwendeten Endorestriktionsnukleasen sind markiert.

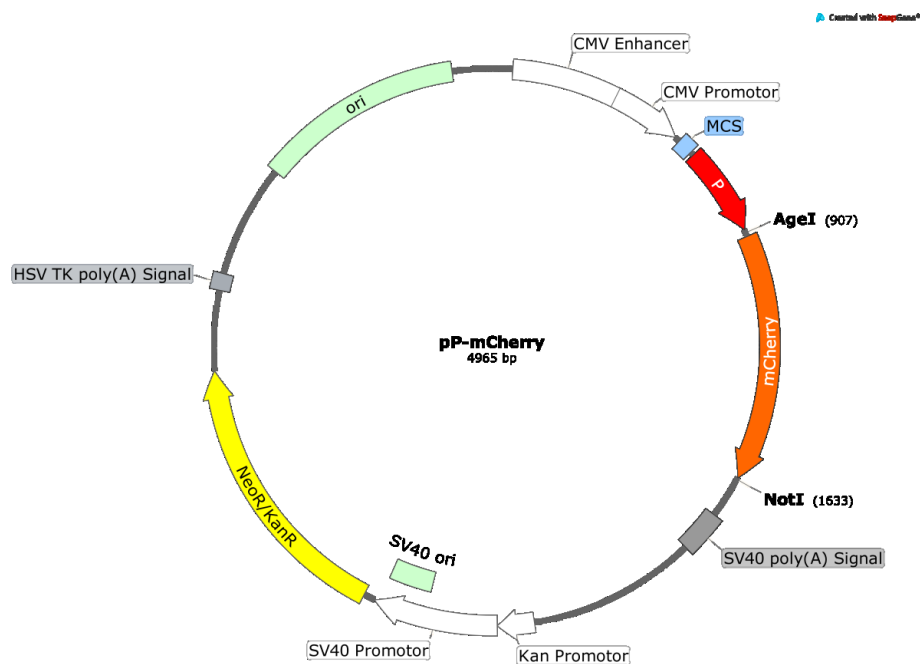


Abbildung A9: Vektorkarte des in humanen Zellen zu exprimierenden Vektors pP-mCherry zur Expression eines **P-mCherry**-Fusionsproteins der Proteinvarianten **P(WT)** und **P(C638)**. Die Schnittstellen der in dieser Arbeit zur Klonierung verwendeten Endorestriktionsnukleasen sind markiert.

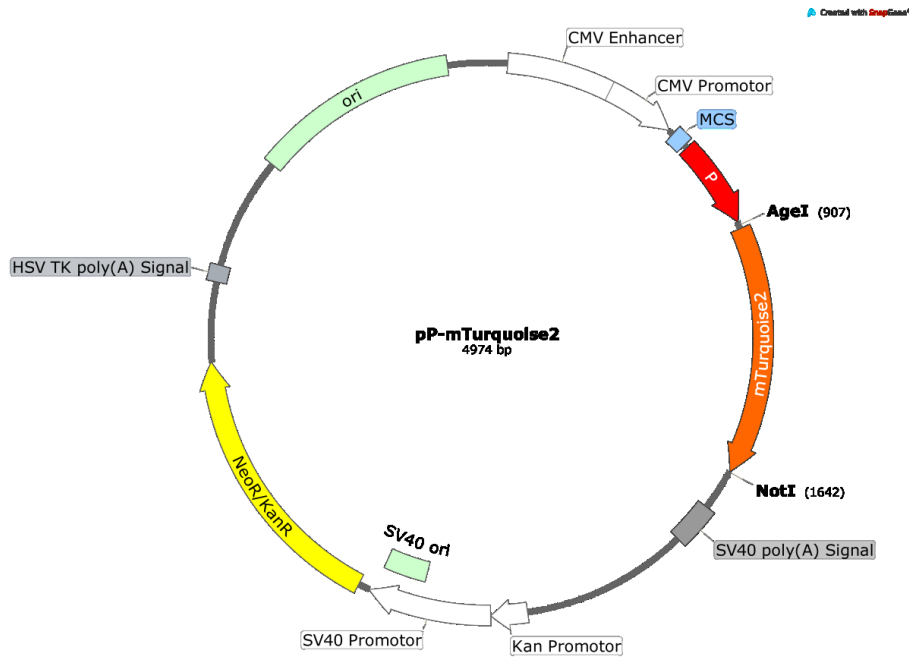


Abbildung A10: Vektorkarte des in humanen Zellen zu exprimierenden Vektors pP-mTurquoise2 zur Expression eines **P-mTurquoise2**-Fusionsproteins der Proteinvarianten **P(WT)** und **P(C638)**. Die Schnittstelle, der in dieser Arbeit zur Klonierung verwendeten Endorestriktionsnukleasen, sind markiert.

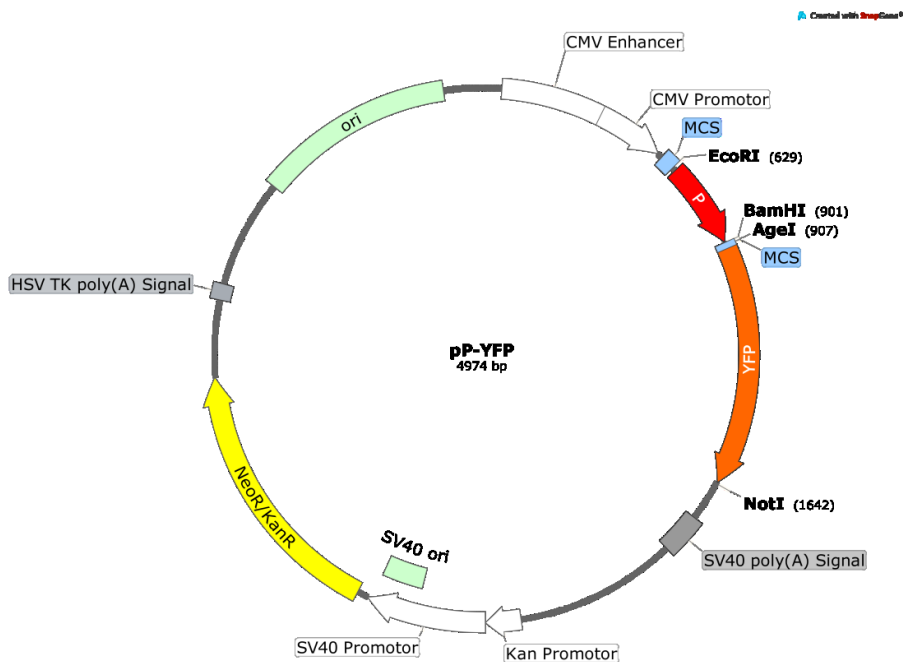


Abbildung A11: Vektorkarte des in humanen Zellen zu exprimierenden Vektors pP-YFP zur Expression eines **P-YFP**-Fusionsproteins der Proteinvarianten **P(WT)** und **P(C638)**. Die Schnittstellen der in dieser Arbeit zur Klonierung verwendeten Endorestriktionsnukleasen sind markiert.

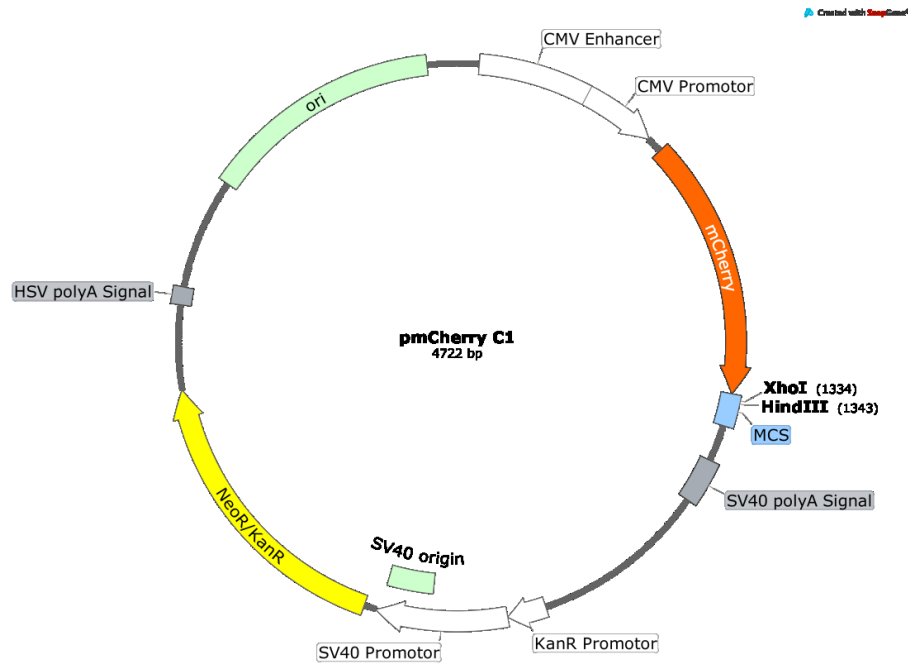


Abbildung A12: Vektorkarte des in humanen Zellen zu exprimierenden Vektors pmCherry C1 zur Klonierung C-terminaler Fusionsproteine mit dem fluoreszierenden Protein mCherry. Die Schnittstellen, der in dieser Arbeit zur Klonierung verwendeten Endorestriktionsnukleasen, sind markiert.

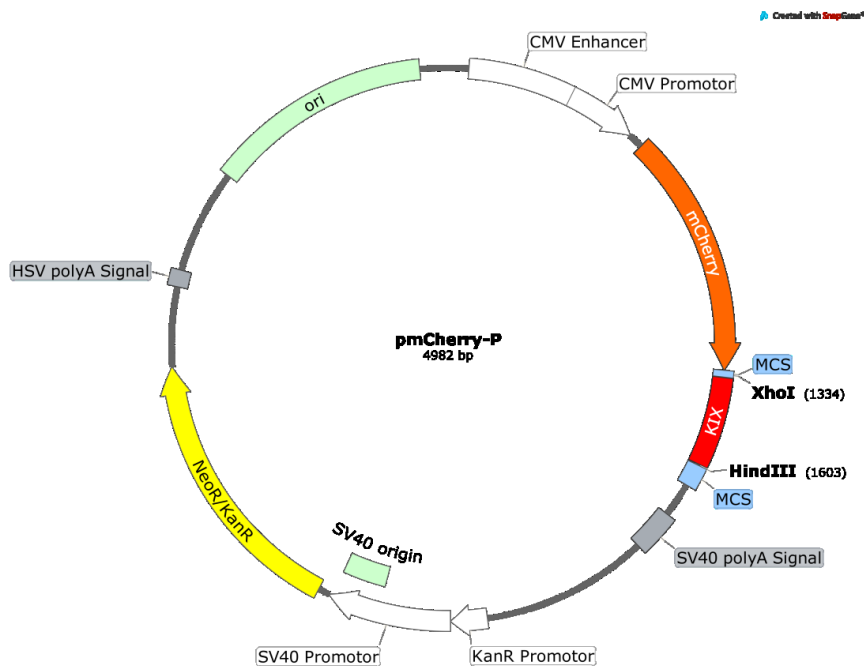


Abbildung A13: Vektorkarte des in humanen Zellen zu exprimierenden Vektors pmCherry-P zur Expression eines **mCherry-P**-Fusionsproteins der Proteinvarianten **P(WT)** und **P(C638)** mit dem fluoreszierenden Protein mCherry. Die Schnittstellen, der in dieser Arbeit zur Klonierung verwendeten Endorestriktionsnukleasen, sind markiert.

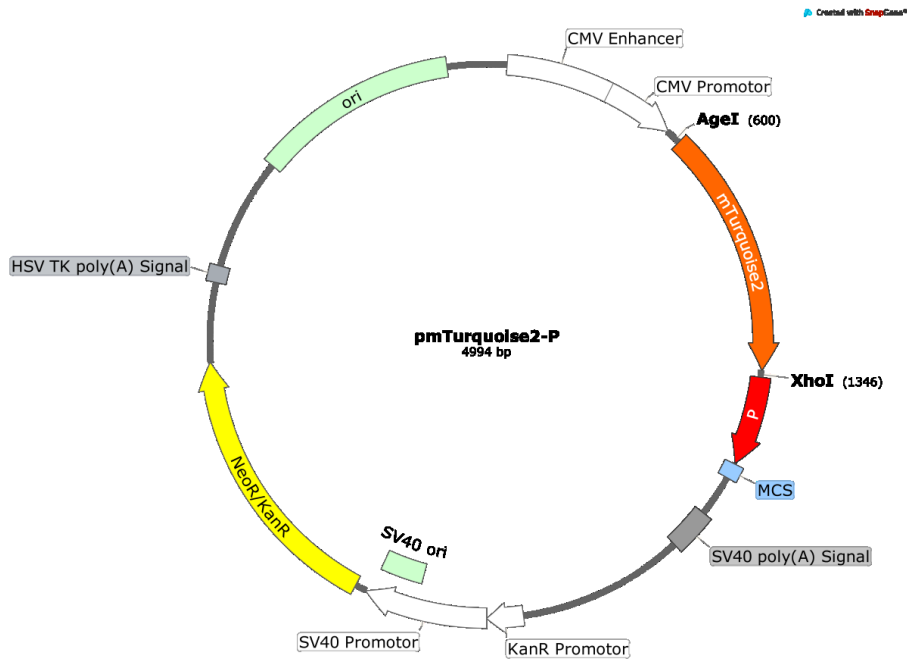


Abbildung A14: Vektorkarte des in humanen Zellen zu exprimierenden Vektors pmTurquoise2-P zur Expression eines **mTurquoise2-P**-Fusionsproteins der Proteinvarianten **P(WT)** und **P(C638)**. Die Schnittstellen der in dieser Arbeit zur Klonierung verwendeten Endorestriktionsnukleasen sind markiert.

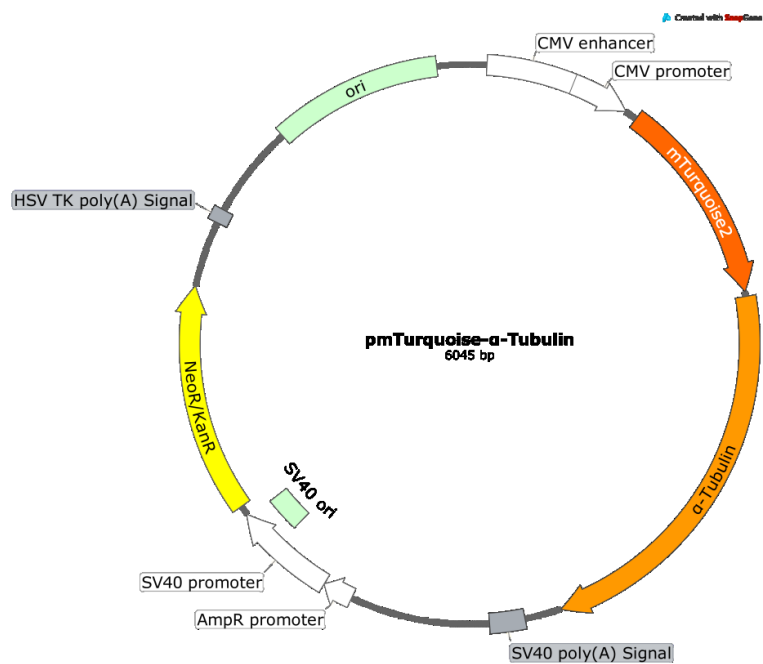


Abbildung A15: Vektorkarte des in humanen Zellen zu exprimierenden Vektors pmTurquoise- α -Tubulin zur Expression von pmTurquoise2- α -Tubulin-Fusionsproteinen. Die Schnittstellen, der in dieser Arbeit zur Klonierung verwendeten Endorestriktionsnukleasen, sind markiert.

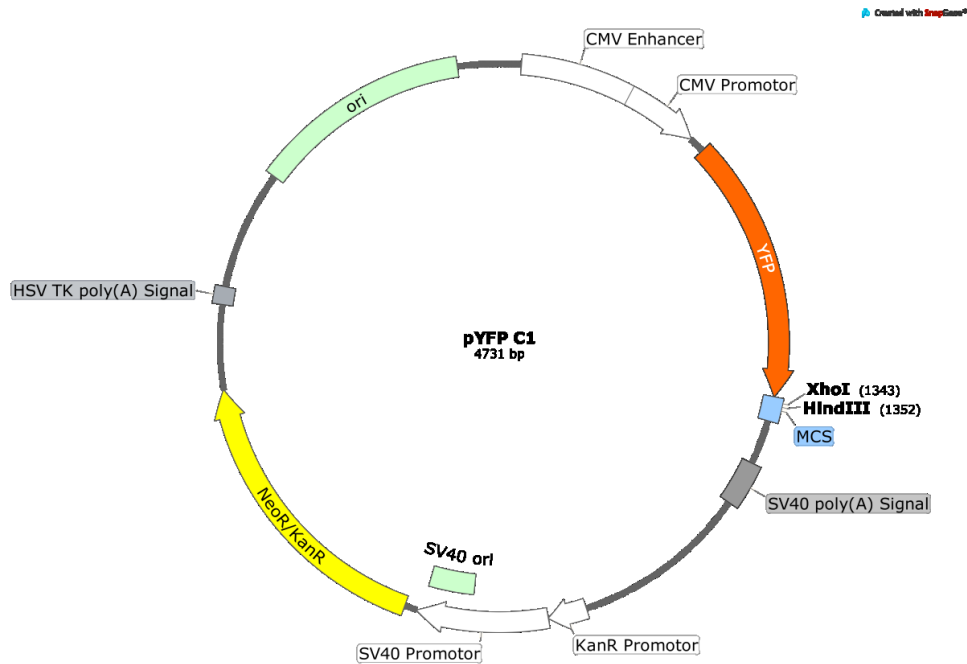


Abbildung A16: Vektorkarte des in humanen Zellen zu exprimierenden Vektors pYFP C1 zur Klonierung C-terminaler Fusionsproteine mit dem fluoreszierenden Protein YFP. Die Schnittstellen der in dieser Arbeit zur Klonierung verwendeten Endorestriktionsnukleasen sind markiert.

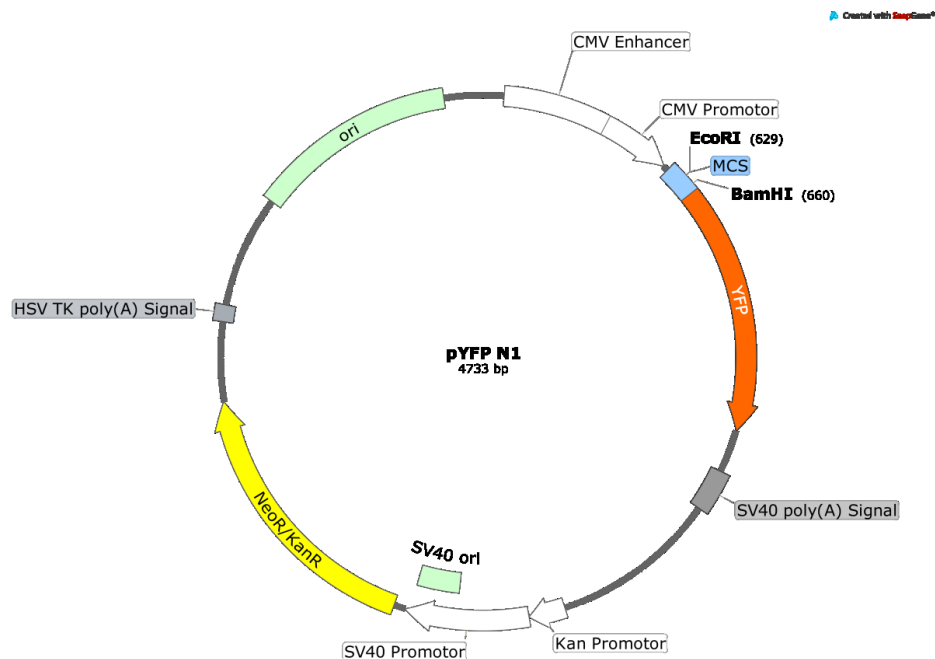


Abbildung A17: Vektorkarte des in humanen Zellen zu exprimierenden Vektors pYFP N1 zur Klonierung N-terminaler Fusionsproteine mit dem fluoreszierenden Protein YFP. Die Schnittstellen der in dieser Arbeit zur Klonierung verwendeten Endorestriktionsnukleasen sind markiert.

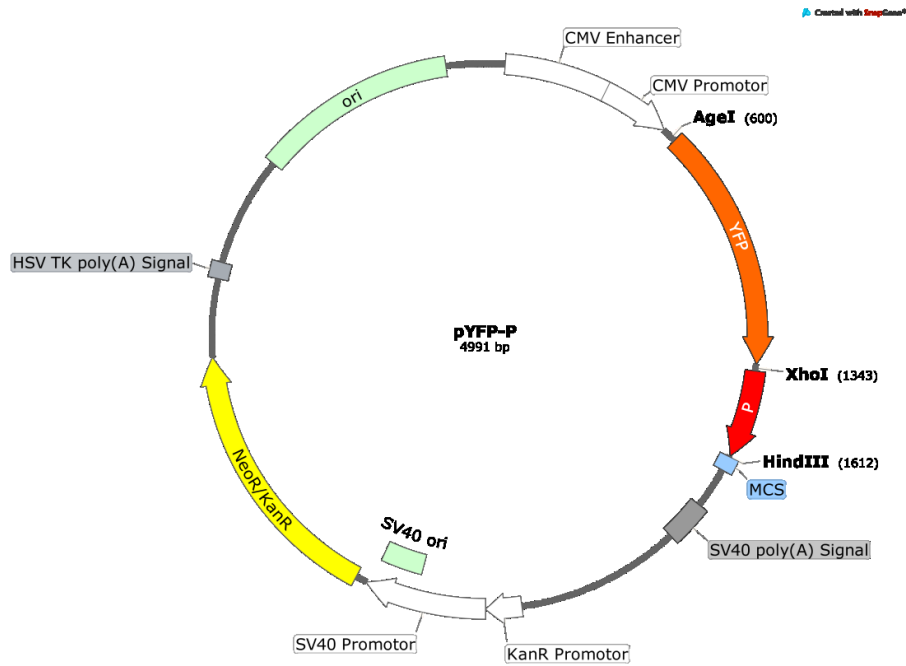


Abbildung A18: Vektorkarte des in humanen Zellen zu exprimierenden Vektors pYFP-P zur Expression eines YFP-P- Fusionsproteins der Proteinvarianten **P(WT)** und **P(C638)** mit dem fluoreszierenden Protein YFP. Die Schnittstellen, der in dieser Arbeit zur Klonierung verwendeten Endorestriktionsnukleasen, sind markiert.

8.1.2 DNS-Sequenzen exprimierter Proteine

Tabelle A1: DNS-Sequenzen aller offenen Leseraster der exprimierten Proteine. Sofern enthalten wurde die Sequenz für die Erkennungssequenz der TEV-Protease unterstrichen. Die Proteinvarianten sind schwarz hinterlegt. Die Codons für die eingebrachten Cysteine sind gelb hinterlegt. Die fluoreszierenden Proteine eGFP, mCherry und mTurquoise sind hellgrau hinterlegt. Weiß hinterlegte Bereiche codieren für die GST, das Stopcodon am Ende des Leserasters oder stellen Codons dar, die als Klonierungsartefakt exprimiert werden.

eGFP

```

ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACACGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCTG
AGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCG
AGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGG
CAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTG
CAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTC
CGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGAC
GGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGA
ACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGG
GCACAAGCTGGAGTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACA
AGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGA
GGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGGCGACG
GCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAG
CAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCTGCTGGAGTTCGTGACC
GCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTCCGGACTCAGAT
CTCGAGCTCAAGCTTCGAATTCTGCAGTCGACGGTACCGCGGGGCCCGGGATC
CACCGGATCTAGATAA

```

GST-P(WT)

```

ATGTCCCCTATACTAGGTTATTGGAAAATTAAGGGCCTTGTGCAACCCACTCGA
CTTCTTTTGAATATCTTGAAGAAAAATATGAAGAGCATTGTATGAGCGCGAT
GAAGGTGATAAATGGCGAAACAAAAGTTTGAATTGGGTTTGGAGTTTCCCAAT
CTTCTTATTATATTGATGGTGTGTTAAATTAACACAGTCTATGGCCATCATAC
GTTATATAGCTGACAAGCACAACATGTTGGGTGGTTGTCCAAAAGAGCGTGCA
GAGATTTCAATGCTTGAAGGAGCGGTTTTGGATATTAGATACGGTGTTCGAGA
ATTGCATATAGTAAAGACTTTGAAACTCTCAAAGTTGATTTTCTTAGCAAGCTAC
CTGAAATGCTGAAAATGTTCAAGATCGTTTATGTCATAAAACATATTTAAATGG
TGATCATGTAACCCATCCTGACTTCATGTTGTATGACGCTCTTGATGTTGTTTA
TACATGGACCCAATGTGCCTGGATGCGTTCCCAAATTAGTTTGTTTAAAAAA
CGTATTGAAGCTATCCCACAAATTGATAAGTACTTGAAATCCAGCAAGTATATA
GCATGGCCTTTGCAGGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTGGTGGCGACCATCCTC
CAAAATCGGATCTGGTTCCGCGTGGATCTGAAAACCTTTATTTTCAGIGGCGCC
ATGGGTGTAAGGAAAGGCTGGCACGAACATGTCACTCAGGACCTGCGGAGCC
ATCTAGTGCATAAACTCGTCCAAGCCATCTTCCCAACACCTGATCCCGCAGCTC
TAAAGGATCGCCGCATGGAAAACCTGGTAGCCTATGCTAAGAAAGTGGAAAGG
GACATGTACGAGTCTGCCAACAGCAGGGATGAATATTACTTATTAGCAGAG
AAAATCTACAAGATACAAAAGAAGTGAAGAAAACGGAGGTCGCGTTGA

```

GST-P(C626)

ATGTCCCCTATACTAGGTTATTGGAAAATTAAGGGCCTTGTGCAACCCACTCGA
 CTTCTTTTGAATATCTTGAAGAAAAATATGAAGAGCATTGTATGAGCGCGAT
 GAAGGTGATAAATGGCGAAACAAAAAGTTTGAATTGGGTTTGGAGTTTCCCAAT
 CTTCTTATTATATTGATGGTGATGTTAAATTAACACAGTCTATGGCCATCATA
 GTTATATAGCTGACAAGCACAACATGTTGGGTGGTTGTCCAAAAGAGCGTGCA
 GAGATTTCAATGCTTGAAGGAGCGGTTTTGGATATTAGATACGGTGTTTTCGAGA
 ATTGCATATAGTAAAGACTTTGAACTCTCAAAGTTGATTTTCTTAGCAAGCTAC
 CTGAAATGCTGAAAATGTTTGAAGATCGTTTATGTCATAAAAACATATTTAAATGG
 TGATCATGTAACCCATCCTGACTTCATGTTGTATGACGCTCTTGATGTTGTTTTA
 TACATGGACCCAATGTGCCTGGATGCGTTCCCAAATTAGTTTGTAAAAA
 CGTATTGAAGCTATCCACAAATTGATAAGTACTTGAAATCCAGCAAGTATATA
 GCATGGCCTTTGCAGGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTGGTGGCGACCATCCTC
 CAAAATCGGATCTGGTTCCGCGTGGATCTGAAAACCTTTATTTTCAG|GGCGCC
 ATGGGTGTAAGGAAAGGCTGGCACGAACATGTCACTCAGGACCTGCGGAGCC
 ATCTAGTGCATAAACTCGTCCAAGCCATCTTCCCAACACCTGATCCCGCAGCTC
 TAAAGGATCGCCGCATGTGC AACCTGGTAGCCTATGCTAAGAAAGTGAAGGG
 GACATGTACGAGTCTGCCAACAGCAGGGATGAATATTATCACTTATTAGCAGAG
 AAAATCTACAAGATACAAAAGAAGTGAAGAAAACGGAGGTTCGCGTTGA

GST-P(C630)

ATGTCCCCTATACTAGGTTATTGGAAAATTAAGGGCCTTGTGCAACCCACTCGA
 CTTCTTTTGAATATCTTGAAGAAAAATATGAAGAGCATTGTATGAGCGCGAT
 GAAGGTGATAAATGGCGAAACAAAAAGTTTGAATTGGGTTTGGAGTTTCCCAAT
 CTTCTTATTATATTGATGGTGATGTTAAATTAACACAGTCTATGGCCATCATA
 GTTATATAGCTGACAAGCACAACATGTTGGGTGGTTGTCCAAAAGAGCGTGCA
 GAGATTTCAATGCTTGAAGGAGCGGTTTTGGATATTAGATACGGTGTTTTCGAGA
 ATTGCATATAGTAAAGACTTTGAACTCTCAAAGTTGATTTTCTTAGCAAGCTAC
 CTGAAATGCTGAAAATGTTTGAAGATCGTTTATGTCATAAAAACATATTTAAATGG
 TGATCATGTAACCCATCCTGACTTCATGTTGTATGACGCTCTTGATGTTGTTTTA
 TACATGGACCCAATGTGCCTGGATGCGTTCCCAAATTAGTTTGTAAAAA
 CGTATTGAAGCTATCCACAAATTGATAAGTACTTGAAATCCAGCAAGTATATA
 GCATGGCCTTTGCAGGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTGGTGGCGACCATCCTC
 CAAAATCGGATCTGGTTCCGCGTGGATCTGAAAACCTTTATTTTCAG|GGCGCC
 ATGGGTGTAAGGAAAGGCTGGCACGAACATGTCACTCAGGACCTGCGGAGCC
 ATCTAGTGCATAAACTCGTCCAAGCCATCTTCCCAACACCTGATCCCGCAGCTC
 TAAAGGATCGCCGCATGGAAAACCTGGTATGC ATGCTAAGAAAGTGAAGGG
 GACATGTACGAGTCTGCCAACAGCAGGGATGAATATTATCACTTATTAGCAGAG
 AAAATCTACAAGATACAAAAGAAGTGAAGAAAACGGAGGTTCGCGTTGA

GST-P(C634)

ATGTCCCCTATACTAGGTTATTGGAAAATTAAGGGCCTTGTGCAACCCACTCGA
 CTTCTTTTGAATATCTTGAAGAAAAATATGAAGAGCATTGTATGAGCGCGAT
 GAAGGTGATAAATGGCGAAACAAAAAGTTTGAATTGGGTTTGGAGTTTCCCAAT
 CTTCTTATTATATTGATGGTGATGTTAAATTAACACAGTCTATGGCCATCATA
 GTTATATAGCTGACAAGCACAACATGTTGGGTGGTTGTCCAAAAGAGCGTGCA

GAGATTTCAATGCTTGAAGGAGCGGTTTTGGATATTAGATACGGTGTTCGAGA
ATTGCATATAGTAAAGACTTTGAAACTCTCAAAGTTGATTTTCTTAGCAAGCTAC
CTGAAATGCTGAAAATGTTGAAGATCGTTTATGTCATAAAACATATTTAAATGG
TGATCATGTAACCCATCCTGACTTCATGTTGTATGACGCTCTTGATGTTGTTTTA
TACATGGACCCAATGTGCCTGGATGCGTTCCTCAAATTAGTTTGTAAAAA
CGTATTGAAGCTATCCCACAAATTGATAAGTACTTGAAATCCAGCAAGTATATA
GCATGGCCTTTGCAGGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTGGTGGCGACCATCCTC
CAAAATCGGATCTGGTTCGCGTGGATCTGAAAACCTTTATTTTCAGIGGCGCC
ATGGGTGTAAGGAAAGGCTGGCACGAACATGTCACTCAGGACCTGCGGAGCC
ATCTAGTGCATAAACTCGTCCAAGCCATCTTCCCAACACCTGATCCCGCAGCTC
TAAAGGATCGCCGCATGGAAAACCTGGTAGCCTATGCTAAGTGC GTGGAAGG
GGACATGTACGAGTCTGCCAACAGCAGGGATGAATATTACTTATTAGCAGA
GAAAATCTACAAGATACAAAAGAAGCTAGAAGAAAACGGAGGTGCGGTGA

GST-P(C638)

ATGTCCCCTATACTAGGTTATTGGAAAATTAAGGGCCTTGTGCAACCCACTCGA
CTTCTTTTGAATATCTTGAAGAAAAATATGAAGAGCATTGTATGAGCGCGAT
GAAGGTGATAAATGGCGAAACAAAAAGTTTGAATTGGGTTTGGAGTTTCCCAAT
CTTCTTATTATATTGATGGTGTAAATTAACACAGTCTATGGCCATCATA
GTTATATAGCTGACAAGCACAACATGTTGGGTGGTGTCCAAAAGAGCGTGCA
GAGATTTCAATGCTTGAAGGAGCGGTTTTGGATATTAGATACGGTGTTCGAGA
ATTGCATATAGTAAAGACTTTGAAACTCTCAAAGTTGATTTTCTTAGCAAGCTAC
CTGAAATGCTGAAAATGTTGAAGATCGTTTATGTCATAAAACATATTTAAATGG
TGATCATGTAACCCATCCTGACTTCATGTTGTATGACGCTCTTGATGTTGTTTTA
TACATGGACCCAATGTGCCTGGATGCGTTCCTCAAATTAGTTTGTAAAAA
CGTATTGAAGCTATCCCACAAATTGATAAGTACTTGAAATCCAGCAAGTATATA
GCATGGCCTTTGCAGGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTGGTGGCGACCATCCTC
CAAAATCGGATCTGGTTCGCGTGGATCTGAAAACCTTTATTTTCAGIGGCGCC
ATGGGTGTAAGGAAAGGCTGGCACGAACATGTCACTCAGGACCTGCGGAGCC
ATCTAGTGCATAAACTCGTCCAAGCCATCTTCCCAACACCTGATCCCGCAGCTC
TAAAGGATCGCCGCATGGAAAACCTGGTAGCCTATGCTAAGAAAGTGGAAAGG
TGCATGTACGAGTCTGCCAACAGCAGGGATGAATATTACTTATTAGCAGAG
AAAATCTACAAGATACAAAAGAAGCTAGAAGAAAACGGAGGTGCGGTGA

GST-P(C642)

ATGTCCCCTATACTAGGTTATTGGAAAATTAAGGGCCTTGTGCAACCCACTCGA
CTTCTTTTGAATATCTTGAAGAAAAATATGAAGAGCATTGTATGAGCGCGAT
GAAGGTGATAAATGGCGAAACAAAAAGTTTGAATTGGGTTTGGAGTTTCCCAAT
CTTCTTATTATATTGATGGTGTAAATTAACACAGTCTATGGCCATCATA
GTTATATAGCTGACAAGCACAACATGTTGGGTGGTGTCCAAAAGAGCGTGCA
GAGATTTCAATGCTTGAAGGAGCGGTTTTGGATATTAGATACGGTGTTCGAGA
ATTGCATATAGTAAAGACTTTGAAACTCTCAAAGTTGATTTTCTTAGCAAGCTAC
CTGAAATGCTGAAAATGTTGAAGATCGTTTATGTCATAAAACATATTTAAATGG
TGATCATGTAACCCATCCTGACTTCATGTTGTATGACGCTCTTGATGTTGTTTTA
TACATGGACCCAATGTGCCTGGATGCGTTCCTCAAATTAGTTTGTAAAAA
CGTATTGAAGCTATCCCACAAATTGATAAGTACTTGAAATCCAGCAAGTATATA
GCATGGCCTTTGCAGGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTGGTGGCGACCATCCTC
CAAAATCGGATCTGGTTCGCGTGGATCTGAAAACCTTTATTTTCAGIGGCGCC

ATGGGTGTAAGGAAAGGCTGGCACGAACATGTCACTCAGGACCTGCGGAGCC
 ATCTAGTGCATAAACTCGTCCAAGCCATCTTCCAACACCTGATCCCGCAGCTC
 TAAAGGATCGCCGCATGGAAAACCTGGTAGCCTATGCTAAGAAAGTGAAGGG
 GACATGTACGAGTGCGCCAACAGCAGGGATGAATATTATCACTTATTAGCAGA
 GAAAATCTACAAGATACAAAAGAAGACTAGAAGAAAACGGAGGTCGCGTTGA

GST-P(C648)

ATGTCCCCTATACTAGGTTATTGGAAAATTAAGGGCCTTGTGCAACCCACTCGA
 CTTCTTTTGGAAATATCTTGAAGAAAAATATGAAGAGCATTGTATGAGCGCGAT
 GAAGGTGATAAATGGCGAAACAAAAAGTTTGAATTGGGTTTGGAGTTTCCCAAT
 CTTCTTATTATATTGATGGTGATGTTAAATTAACACAGTCTATGGCCATCATA
 GTTATATAGCTGACAAGCACAAACATGTTGGGTGGTTGTCCAAAAGAGCGTGCA
 GAGATTTCAATGCTTGAAGGAGCGGTTTTGGATATTAGATACGGTGTTTTCGAGA
 ATTGCATATAGTAAAGACTTTGAAACTCTCAAAGTTGATTTTCTTAGCAAGCTAC
 CTGAAATGCTGAAAATGTTTGAAGATCGTTTATGTCATAAAACATATTTAAATGG
 TGATCATGTAACCCATCCTGACTTCATGTTGTATGACGCTCTTGATGTTGTTTTA
 TACATGGACCCAATGTGCCTGGATGCGTTCCCAAATTAGTTTGTTTAAAAA
 CGTATTGAAGCTATCCACAAATTGATAAGTACTTGAATCCAGCAAGTATATA
 GCATGGCCTTTGCAGGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTGGTGGCGACCATCCTC
 CAAAATCGGATCTGGTTCCGCGTGGATCTGAAAACCTTTATTTTCAGGGCGCC
 ATGGGTGTAAGGAAAGGCTGGCACGAACATGTCACTCAGGACCTGCGGAGCC
 ATCTAGTGCATAAACTCGTCCAAGCCATCTTCCAACACCTGATCCCGCAGCTC
 TAAAGGATCGCCGCATGGAAAACCTGGTAGCCTATGCTAAGAAAGTGAAGGG
 GACATGTACGAGTCTGCCAACAGCAGGGATTGCATTATCACTTATTAGCAGAG
 AAAATCTACAAGATACAAAAGAAGACTAGAAGAAAACGGAGGTCGCGTTGA

GST-P(WT)-mCherry

ATGTCCCCTATACTAGGTTATTGGAAAATTAAGGGCCTTGTGCAACCCACTCGA
 CTTCTTTTGGAAATATCTTGAAGAAAAATATGAAGAGCATTGTATGAGCGCGAT
 GAAGGTGATAAATGGCGAAACAAAAAGTTTGAATTGGGTTTGGAGTTTCCCAAT
 CTTCTTATTATATTGATGGTGATGTTAAATTAACACAGTCTATGGCCATCATA
 GTTATATAGCTGACAAGCACAAACATGTTGGGTGGTTGTCCAAAAGAGCGTGCA
 GAGATTTCAATGCTTGAAGGAGCGGTTTTGGATATTAGATACGGTGTTTTCGAGA
 ATTGCATATAGTAAAGACTTTGAAACTCTCAAAGTTGATTTTCTTAGCAAGCTAC
 CTGAAATGCTGAAAATGTTTGAAGATCGTTTATGTCATAAAACATATTTAAATGG
 TGATCATGTAACCCATCCTGACTTCATGTTGTATGACGCTCTTGATGTTGTTTTA
 TACATGGACCCAATGTGCCTGGATGCGTTCCCAAATTAGTTTGTTTAAAAA
 CGTATTGAAGCTATCCACAAATTGATAAGTACTTGAATCCAGCAAGTATATA
 GCATGGCCTTTGCAGGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTGGTGGCGACCATCCTC
 CAAAATCGGATCTGGTTCCGCGTGGATCTGAAAACCTTTATTTTCAGGGCGGAT
 CCGGTGTAAGGAAAGGCTGGCACGAACATGTCACTCAGGACCTGCGGAGCCA
 TCTAGTGCATAAACTCGTCCAAGCCATCTTCCAACACCTGATCCCGCAGCTCT
 AAAGGATCGCCGCATGGAAAACCTGGTAGCCTATGCTAAGAAAGTGAAGGG
 GACATGTACGAGTCTGCCAACAGCAGGGATGAATATTATCACTTATTAGCAGAG
 AAAATCTACAAGATACAAAAGAAGACTAGAAGAAAACGGAGGTCGCGTACCAT
 GGTGAGCAAGGGCGAGGAGGATAACATGGCCATCATCAAGGAGTTCATGCGC
 TTCAAGGTGCACATGGAGGGCTCCGTGAACGGCCACGAGTTCGAGATCGAGG
 GCGAGGGCGAGGGCCGCCCTACGAGGGCACCCAGACCGCCAAGCTGAAGG

TGACCAAGGGTGGCCCCCTGCCCTTCGCCTGGGACATCCTGTCCCCTCAGTT
CATGTACGGCTCCAAGGCCTACGTGAAGCACCCCGCCGACATCCCCGACTAC
TTGAAGCTGTCCTTCCCCGAGGGCTTCAAGTGGGAGCGCGTGATGAACTTCGA
GGACGGCGGCGTGGTGACCGTGACCCAGGACTCCTCCCTGCAGGACGGCGA
GTTTCATCTACAAGGTGAAGCTGCGCGGCACCAACTTCCCCTCCGACGGCCCC
GTAATGCAGAAGAAGACCATGGGCTGGGAGGCCTCCTCCGAGCGGATGTACC
CCGAGGACGGCGCCCTGAAGGGCGAGATCAAGCAGAGGCTGAAGCTGAAGG
ACGGCGGCCACTACGACGCTGAGGTCAAGACCACCTACAAGGCCAAGAAGCC
CGTGACGCTGCCCGGCGCCTACAACGTCAACATCAAGTTGGACATCACCTCCC
ACAACGAGGACTACACCATCGTGGAACAGTACGAACGCGCCGAGGGCCGCCA
CTCCACCGGCGGCATGGACGAGCTGTACAAGGAATTCCCAGGGTCGACTCGAG
CGGCCGCATCGTGACTGA

GST-P(C638)-mCherry

ATGTCCCCTATACTAGGTTATTGGAAAATTAAGGGCCTTGTGCAACCCACTCGA
CTTCTTTTGAATATCTTGAAGAAAAATATGAAGAGCATTGTATGAGCGCGAT
GAAGGTGATAAATGGCGAAACAAAAAGTTTGAATTGGGTTTGGAGTTTCCCAAT
CTTCTTATTATATTGATGGTGATGTTAAATTAACACAGTCTATGGCCATCATAC
GTTATATAGCTGACAAGCACAACATGTTGGGTGGTTGTCCAAAAGAGCGTGCA
GAGATTTCAATGCTTGAAGGAGCGGTTTTGGATATTAGATACGGTGTTCGAGA
ATTGCATATAGTAAAGACTTTGAAACTCTCAAAGTTGATTTTCTTAGCAAGCTAC
CTGAAATGCTGAAAATGTTGGAAGATCGTTTATGTCATAAAACATATTTAAATGG
TGATCATGTAACCCATCCTGACTTCATGTTGTATGACGCTCTTGATGTTGTTTA
TACATGGACCCAATGTGCCTGGATGCGTTCCCAAAATTAGTTTGTTTTAAAAA
CGTATTGAAGCTATCCCACAAATTGATAAGTACTTGAAATCCAGCAAGTATATA
GCATGGCCTTTGCAGGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTGGTGGCGACCATCCTC
CAAATCGGATCTGGTTCGCGTGATCTGAAAACCTTTATTTTCAGGGCGGAT
CCGGTGTAAAGGAAAGGCTGGCACGAACATGTCACTCAGGACCTGCGGAGCCA
TCTAGTGATAAACTCGTCCAAGCCATCTTCCCAACACCTGATCCCGCAGCTCT
AAAGGATCGCCGCATGGAAAACCTGGTAGCCTATGCTAAGAAAGTGGAAGGGT
GCATGTACGAGTCTGCCAACAGCAGGGATGAATATTATCACTTATTAGCAGAGA
AAATCTACAAGATACAAAAGAAGTGAAGAAAACGGAGGTCGCGTACCATG
GTGAGCAAGGGCGAGGAGGATAACATGGCCATCATCAAGGAGTTCATGCGCT
TCAAGGTGCACATGGAGGGCTCCGTGAACGGCCACGAGTTCGAGATCGAGGG
CGAGGGCGAGGGCCGCCCTACGAGGGCACCCAGACCGCCAAGCTGAAGGT
GACCAAGGGTGGCCCCCTGCCCTTCGCCTGGGACATCCTGTCCCCTCAGTTC
ATGTACGGCTCCAAGGCCTACGTGAAGCACCCCGCCGACATCCCCGACTACTT
GAAGCTGTCCTTCCCCGAGGGCTTCAAGTGGGAGCGCGTGATGAACTTCGAG
GACGGCGGCGTGGTGACCGTGACCCAGGACTCCTCCCTGCAGGACGGCGAG
TTCATCTACAAGGTGAAGCTGCGCGGCACCAACTTCCCCTCCGACGGCCCCGT
AATGCAGAAGAAGACCATGGGCTGGGAGGCCTCCTCCGAGCGGATGTACCCC
GAGGACGGCGCCCTGAAGGGCGAGATCAAGCAGAGGCTGAAGCTGAAGGAC
GGCGGCCACTACGACGCTGAGGTCAAGACCACCTACAAGGCCAAGAAGCCCG
TGCAGCTGCCCGGCGCCTACAACGTCAACATCAAGTTGGACATCACCTCCCAC
AACGAGGACTACACCATCGTGGAACAGTACGAACGCGCCGAGGGCCGCCACT
CCACCGGCGGCATGGACGAGCTGTACAAGGAATTCCCAGGGTCGACTCGAGCG
GCCGCATCGTGACTGA

P(WT)-mCherry

ATGGGTGTAAGGAAAGGCTGGCACGAACATGTCACTCAGGACCTGCGGAGCC
 ATCTAGTGCATAAACTCGTCCAAGCCATCTTCCCAACACCTGATCCCGCAGCTC
 TAAAGGATCGCCGCATGGAAAACCTGGTAGCCTATGCTAAGAAAGTGAAGGG
 GACATGTACGAGTCTGCCAACAGCAGGGATGAATATTATCACTTATTAGCAGAG
 AAAATCTACAAGATACAAAAGAAGCTAGAAGAAAACGGAGGTGCGCGTGGGGA
 TCCACCGGTCGCCACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGGATAACATGGCCATC
 ATCAAGGAGTTCATGCGCTTCAAGGTGCACATGGAGGGCTCCGTGAACGGCC
 ACGAGTTCGAGATCGAGGGCGAGGGCGAGGGCCGCCCTACGAGGGGCACCC
 AGACCGCCAAGCTGAAGGTGACCAAGGGTGGCCCCCTGCCCTTCGCCTGGGA
 CATCCTGTCCCCTCAGTTCATGTACGGCTCCAAGGCCTACGTGAAGCACCCCG
 CCGACATCCCCGACTACTTGAAGCTGTCCTTCCCCGAGGGCTTCAAGTGGGAG
 CGCGTGATGAACTTCGAGGACGGCGGCGTGGTGACCGTGACCCAGGACTCCT
 CCCTGCAGGACGGCGAGTTCATCTACAAGGTGAAGCTGCGCGGCACCAACTT
 CCCCTCCGACGGCCCCGTAATGCAGAAGAAGACCATGGGCTGGGAGGCCTCC
 TCCGAGCGGATGTACCCCGAGGACGGCGCCCTGAAGGGCGAGATCAAGCAG
 AGGCTGAAGCTGAAGGACGGCGGCCACTACGACGCTGAGGTCAAGACCACCT
 ACAAGGCCAAGAAGCCCGTGCAGCTGCCCGGCGCCTACAACGTCAACATCAA
 GTTGGACATCACCTCCCACAACGAGGACTACACCATCGTGAACAGTACGAAC
 GCGCCGAGGGCCGCCACTCCACCGGCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAG

P(C638)-mCherry

ATGGGTGTAAGGAAAGGCTGGCACGAACATGTCACTCAGGACCTGCGGAGCC
 ATCTAGTGCATAAACTCGTCCAAGCCATCTTCCCAACACCTGATCCCGCAGCTC
 TAAAGGATCGCCGCATGGAAAACCTGGTAGCCTATGCTAAGAAAGTGAAGGG
 TGCATGTACGAGTCTGCCAACAGCAGGGATGAATATTATCACTTATTAGCAGAG
 AAAATCTACAAGATACAAAAGAAGCTAGAAGAAAACGGAGGTGCGCGTGGGGA
 TCCACCGGTCGCCACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGGATAACATGGCCATC
 ATCAAGGAGTTCATGCGCTTCAAGGTGCACATGGAGGGCTCCGTGAACGGCC
 ACGAGTTCGAGATCGAGGGCGAGGGCGAGGGCCGCCCTACGAGGGGCACCC
 AGACCGCCAAGCTGAAGGTGACCAAGGGTGGCCCCCTGCCCTTCGCCTGGGA
 CATCCTGTCCCCTCAGTTCATGTACGGCTCCAAGGCCTACGTGAAGCACCCCG
 CCGACATCCCCGACTACTTGAAGCTGTCCTTCCCCGAGGGCTTCAAGTGGGAG
 CGCGTGATGAACTTCGAGGACGGCGGCGTGGTGACCGTGACCCAGGACTCCT
 CCCTGCAGGACGGCGAGTTCATCTACAAGGTGAAGCTGCGCGGCACCAACTT
 CCCCTCCGACGGCCCCGTAATGCAGAAGAAGACCATGGGCTGGGAGGCCTCC
 TCCGAGCGGATGTACCCCGAGGACGGCGCCCTGAAGGGCGAGATCAAGCAG
 AGGCTGAAGCTGAAGGACGGCGGCCACTACGACGCTGAGGTCAAGACCACCT
 ACAAGGCCAAGAAGCCCGTGCAGCTGCCCGGCGCCTACAACGTCAACATCAA
 GTTGGACATCACCTCCCACAACGAGGACTACACCATCGTGAACAGTACGAAC
 GCGCCGAGGGCCGCCACTCCACCGGCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAG

mCherry-P(WT)

CGCCACCATGGGTGAGCAAGGGCGAGGAGGATAACATGGCCATCATCAAGGA
 GTTCATGCGCTTCAAGGTGCACATGGAGGGCTCCGTGAACGGCCACGAGTTC
 GAGATCGAGGGCGAGGGCGAGGGCCGCCCTACGAGGGCACCCAGACCGCC

AAGCTGAAGGTGACCAAGGGTGGCCCCCTGCCCTTCGCCTGGGACATCCTGT
CCCCTCAGTTCATGTACGGCTCCAAGGCCTACGTGAAGCACCCCGCCGACATC
CCCGACTACTTGAAGCTGTCCTTCCCCGAGGGCTTCAAGTGGGAGCGCGTGA
TGAACTTCGAGGACGGCGGCGTGGTGACCGTGACCCAGGACTCCTCCCTGCA
GGACGGCGAGTTCATCTACAAGGTGAAGCTGCGCGGCACCAACTTCCCCTCC
GACGGCCCCGTAATGCAGAAGAAGACCATGGGCTGGGAGGCCTCCTCCGAGC
GGATGTACCCCGAGGACGGCGCCCTGAAGGGCGAGATCAAGCAGAGGCTGA
AGCTGAAGGACGGCGGCCACTACGACGCTGAGGTCAAGACCACCTACAAGGC
CAAGAAGCCCGTGACGCTGCCCGGCGCCTACAACGTCAACATCAAGTTGGAC
ATCACCTCCACAACGAGGACTACACCATCGTGGAACAGTACGAACGCGCCGA
GGCCCGCCACTCCACCGGCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTCCGGACTCAGA
TCTCGAGGGGGGTGTAAGGAAAGGCTGGCACGAACATGTCACTCAGGACCTGC
GGAGCCATCTAGTGCATAAACTCGTCCAAGCCATCTTCCAACACCTGATCCC
GCAGCTCTAAAGGATCGCCGCATGGAAAACCTGGTAGCCTATGCTAAGAAAGT
GGAAGGGGACATGTACGAGTCTGCCAACAGCAGGGATGAATATTATCACTTAT
TAGCAGAGAAAATCTACAAGATACAAAAGAAGTGAAGAAAACGGAGGTCCG
CGTTGA

mCherry-P(C638)

CGCCACCATGGGTGAGCAAGGGCGAGGAGGATAACATGGCCATCATCAAGGA
GTTTCATGCGCTTCAAGGTGCACATGGAGGGCTCCGTGAACGGCCACGAGTTC
GAGATCGAGGGCGAGGGCGAGGGCCGCCCTACGAGGGCACCCAGACCGCC
AAGCTGAAGGTGACCAAGGGTGGCCCCCTGCCCTTCGCCTGGGACATCCTGT
CCCCTCAGTTCATGTACGGCTCCAAGGCCTACGTGAAGCACCCCGCCGACATC
CCCGACTACTTGAAGCTGTCCTTCCCCGAGGGCTTCAAGTGGGAGCGCGTGA
TGAACTTCGAGGACGGCGGCGTGGTGACCGTGACCCAGGACTCCTCCCTGCA
GGACGGCGAGTTCATCTACAAGGTGAAGCTGCGCGGCACCAACTTCCCCTCC
GACGGCCCCGTAATGCAGAAGAAGACCATGGGCTGGGAGGCCTCCTCCGAGC
GGATGTACCCCGAGGACGGCGCCCTGAAGGGCGAGATCAAGCAGAGGCTGA
AGCTGAAGGACGGCGGCCACTACGACGCTGAGGTCAAGACCACCTACAAGGC
CAAGAAGCCCGTGACGCTGCCCGGCGCCTACAACGTCAACATCAAGTTGGAC
ATCACCTCCACAACGAGGACTACACCATCGTGGAACAGTACGAACGCGCCGA
GGCCCGCCACTCCACCGGCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTCCGGACTCAGA
TCTCGAGGGGGGTGTAAGGAAAGGCTGGCACGAACATGTCACTCAGGACCTGC
GGAGCCATCTAGTGCATAAACTCGTCCAAGCCATCTTCCAACACCTGATCCC
GCAGCTCTAAAGGATCGCCGCATGGAAAACCTGGTAGCCTATGCTAAGAAAGT
GGAAGGGTGCATGTACGAGTCTGCCAACAGCAGGGATGAATATTATCACTTAT
TAGCAGAGAAAATCTACAAGATACAAAAGAAGTGAAGAAAACGGAGGTCCG
CGTTGA

mCherry

CGCCACCATGGGTGAGCAAGGGCGAGGAGGATAACATGGCCATCATCAAGGAG
TTCATGCGCTTCAAGGTGCACATGGAGGGCTCCGTGAACGGCCACGAGTTCG
AGATCGAGGGCGAGGGCGAGGGCCGCCCTACGAGGGCACCCAGACCGCCA
AGCTGAAGGTGACCAAGGGTGGCCCCCTGCCCTTCGCCTGGGACATCCTGTC
CCCTCAGTTCATGTACGGCTCCAAGGCCTACGTGAAGCACCCCGCCGACATCC
CCGACTACTTGAAGCTGTCCTTCCCCGAGGGCTTCAAGTGGGAGCGCGTGTAT
GAACTTCGAGGACGGCGGCGTGGTGACCGTGACCCAGGACTCCTCCCTGCAG

GACGGCGAGTTCATCTACAAGGTGAAGCTGCGCGGCACCAACTTCCCCTCCG
ACGGCCCCGTAATGCAGAAGAAGACCATGGGCTGGGAGGCCTCCTCCGAGCG
GATGTACCCCGAGGACGGCGCCCTGAAGGGCGAGATCAAGCAGAGGCTGAA
GCTGAAGGACGGCGGCCACTACGACGCTGAGGTCAAGACCACCTACAAGGCC
AAGAAGCCCGTGCAGCTGCCCGGCGCCTACAACGTCAACATCAAGTTGGACAT
CACCTCCCACAACGAGGACTACACCATCGTGGAACAGTACGAACGCGCCGAG
GGCCGCGACTCCACCGGCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTCCGGACTCAGAT
CTCGAGCTCAAGCTTCGAATTCTGCAGTCGACGGTACCGCGGGCCCGGGATC
CACCGGATCTAGATAA

mTurquoise2

ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCCG
AGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCG
AGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGG
CAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCACCCCTCGTGACCACCCTGTCCTGGGGCGTG
CAGTGCTTCGCCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTC
CGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGAC
GGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGA
ACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGG
GCACAAGCTGGAGTACAACACTTTAGCGACAACGTCTATATCACCGCCGACA
AGCAGAAGAACGGCATCAAGGCCAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGAC
GGCGGCGTGCGAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCATCGGCGAC
GGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCAAGCTGA
GCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGAC
CGCCGCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTCTCCGGACTC
AGATCTCgagCTCAAGCTTCGAATTCTGCAGTCGACGGTACCGCGGGCCCGGG
ATCCACCGGATCTAGATAA

8.2 Daten zur Proteinexpression und -charakterisierung

Tabelle A2: Liste aller aus *E. coli* BL21 gold (DE3)-Zellen isolierter Proteine mit ihrem Molekulargewicht M nach dem Verdau mittels TEV-Protease, ihrem isoelektrischen Punkt pI , ihrem Extinktionskoeffizienten ϵ_{280} , dem durchschnittlichen Abstand d zwischen dem Schwefelatom des jeweils eingeführten Cysteins und dem N -Terminus des Liganden, wie er aus der NMR-Struktur (PDB-Datei: 2LXS¹⁴⁴) des Protein-Ligand-Komplexes mit Hilfe des Programmes *Pymol* bestimmt werden kann, sowie die Ausbeute der Proteine aus einer Expressionskultur mit einem Volumen von 1 L.

Protein	M / Da	pI	$\epsilon_{280} / \text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$	$d / \text{Å}$	Ausbeute / mg
P(WT)	10477,9	9,22	12950	-	5,9
P(C626)	10452,0	9,30	12950	22	11,2
P(C630)	10510,0	9,07	12950	17	9,6
P(C634)	10452,9	8,75	12950	13	14,0
P(C638)	10466,0	9,30	12950	12	6,6
P(C642)	10494,0	9,07	12950	15	11,2
P(C648)	10452,0	9,30	12950	17	0,6
P(C638)-mCherry	37679,7	6,44	47330	12	16,8

Tabelle A3: Liste aller in humanen Zellen exprimierter Proteine mit ihrem Molekulargewicht M , ihrem isoelektrischen Punkt pI , ihrem Extinktionskoeffizienten ϵ_{280} und dem durchschnittlichen Abstand d zwischen dem Schwefelatom des jeweils eingeführten Cysteins und dem N -Terminus des Liganden, wie er aus der NMR-Struktur (PDB-Datei: 2LXS¹⁴⁴) des Protein-Ligand-Komplexes mit Hilfe des Programmes *Pymol* bestimmt werden kann.

Protein	M / Da	pI	$\epsilon_{280} / \text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$	$d / \text{Å}$
eGFP	29371,0	5,85	22015	-
mCherry	29151,7	5,94	34380	-
mCherry-P(WT)	37636,6	6,86	47330	-
mCherry-P(C638)	37624,6	7,19	47330	12
mTurquoise2	29431,0	5,77	26025	-
P(C638)-mCherry	37679,7	6,44	47330	12

8.2.1 Aminosäuresequenzen exprimierter Proteine

Tabelle A4: Aminosäuresequenzen exprimierter Proteine. Sofern enthalten wurde die Sequenz für die Erkennungssequenz der TEV-Protease unterstrichen und ihre Schnittstelle mit einem senkrechten Strich markiert. Das Zielprotein ist schwarz hinterlegt. Cysteine sind gelb hinterlegt. Die fluoreszierenden Proteine eGFP, mCherry und mTurquoise2 sind hellgrau hinterlegt. Weiß hinterlegt sind die Aminosäuren der GST sowie Aminosäuren, die als Klonierungsartefakt exprimiert werden. Fett markierte Bereiche entsprechen den Proteinsequenzen, die nach dem finalen Aufreinigungsschritt oder in den humanen Zellen verwendet wurden.

eGFP

**MVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTCLKFICTTGKLP
VPWPTLVTTLTYGVCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKT
RAEVKFEGLTLVNRIELKIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYIMADKQKNGIKVN
FKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHVLTQSALS KDPNEKRDHNV
LLEFVTAAGITLGMDELKSGLSRAQASNSAVDGTAGPGSTGSR**

GST-P(WT)

MSPILGYWKIKGLVQPTRLLEYLEEKYEEHLYERDEGDKWRNKKFELGLEFPNLP
YYIDGDVKLTQSMARIYIADKHNMLGGCPKERAIEISMLEGAVLDIRYGVSRIAYSKD
FETLKVDFLSKLPEMLKMFEDRLCHKTYLNGDHVTHPDFMLYDALDVVLYMDPMC
LDAFPKLVCFKKRIEAIPQIDKYLKSSKYIAWPLQGWQATFGGGDHPPKSDLVPRG
**SENLYFQIGAMGVRKGWHEHVTQDLRSHLVHKLVAIFPTDPAALKDRRMENL
VAYAKKVEGDMYESANSRDEYYHLLAEKIYKIQKELEEKRRSR**

GST-P(C626)

MSPILGYWKIKGLVQPTRLLEYLEEKYEEHLYERDEGDKWRNKKFELGLEFPNLP
YYIDGDVKLTQSMARIYIADKHNMLGGCPKERAIEISMLEGAVLDIRYGVSRIAYSKD
FETLKVDFLSKLPEMLKMFEDRLCHKTYLNGDHVTHPDFMLYDALDVVLYMDPMC
LDAFPKLVCFKKRIEAIPQIDKYLKSSKYIAWPLQGWQATFGGGDHPPKSDLVPRG
**SENLYFQIGAMGVRKGWHEHVTQDLRSHLVHKLVAIFPTDPAALKDRRM CNL
VAYAKKVEGDMYESANSRDEYYHLLAEKIYKIQKELEEKRRSR**

GST-P(C630)

MSPILGYWKIKGLVQPTRLLEYLEEKYEEHLYERDEGDKWRNKKFELGLEFPNLP
YYIDGDVKLTQSMARIYIADKHNMLGGCPKERAIEISMLEGAVLDIRYGVSRIAYSKD
FETLKVDFLSKLPEMLKMFEDRLCHKTYLNGDHVTHPDFMLYDALDVVLYMDPMC
LDAFPKLVCFKKRIEAIPQIDKYLKSSKYIAWPLQGWQATFGGGDHPPKSDLVPRG
**SENLYFQIGAMGVRKGWHEHVTQDLRSHLVHKLVAIFPTDPAALKDRRMENL
VCYAKKVEGDMYESANSRDEYYHLLAEKIYKIQKELEEKRRSR**

GST-P(C634)

MSPILGYWKIKGLVQPTRLLEYLEEKYEEHLYERDEGDKWRNKKFELGLEFPNLP
YYIDGDVKLTQSMARIYIADKHNMLGGCPKERAIEISMLEGAVLDIRYGVSRIAYSKD
FETLKVDFLSKLPEMLKMFEDRLCHKTYLNGDHVTHPDFMLYDALDVVLYMDPMC

LDAFPKLVCFKKRIEAIQIDKYLKSSKYIAWPLQGWQATFGGGDHPPKSDLVPRG
 SENLYFQI**GAMGVRKGWHEHVTQDLRSHLVHKL**VQAIPTDP**AALKDRRMENL**
VAYAKKVEGCMYESANSRDEYYHLLAEKIYKIQKELEEKRRSR

GST-P(C638)

MSPILGYWKIKGLVQPTRLLEYLEEKYEEHLYERDEGDKWRNKKFELGLEFPNLP
 YYIDGDVKLTQSMARIYIADKHNMLGGCPKERAEISMLEGAVLDIRYGVSRIAYSKD
 FETLKVDFLSKLPEMLKMFEDRLCHKTYLNGDHVTHPDFMLYDALDVVLYMDPMC
 LDAFPKLVCFKKRIEAIQIDKYLKSSKYIAWPLQGWQATFGGGDHPPKSDLVPRG
 SENLYFQI**GAMGVRKGWHEHVTQDLRSHLVHKL**VQAIPTDP**AALKDRRMENL**
VAYAKKVEGCMYESANSRDEYYHLLAEKIYKIQKELEEKRRSR

GST-P(C642)

MSPILGYWKIKGLVQPTRLLEYLEEKYEEHLYERDEGDKWRNKKFELGLEFPNLP
 YYIDGDVKLTQSMARIYIADKHNMLGGCPKERAEISMLEGAVLDIRYGVSRIAYSKD
 FETLKVDFLSKLPEMLKMFEDRLCHKTYLNGDHVTHPDFMLYDALDVVLYMDPMC
 LDAFPKLVCFKKRIEAIQIDKYLKSSKYIAWPLQGWQATFGGGDHPPKSDLVPRG
 SENLYFQI**GAMGVRKGWHEHVTQDLRSHLVHKL**VQAIPTDP**AALKDRRMENL**
VAYAKKVEGCMYESANSRDEYYHLLAEKIYKIQKELEEKRRSR

GST-P(C648)

MSPILGYWKIKGLVQPTRLLEYLEEKYEEHLYERDEGDKWRNKKFELGLEFPNLP
 YYIDGDVKLTQSMARIYIADKHNMLGGCPKERAEISMLEGAVLDIRYGVSRIAYSKD
 FETLKVDFLSKLPEMLKMFEDRLCHKTYLNGDHVTHPDFMLYDALDVVLYMDPMC
 LDAFPKLVCFKKRIEAIQIDKYLKSSKYIAWPLQGWQATFGGGDHPPKSDLVPRG
 SENLYFQI**GAMGVRKGWHEHVTQDLRSHLVHKL**VQAIPTDP**AALKDRRMENL**
VAYAKKVEGCMYESANSRDEYYHLLAEKIYKIQKELEEKRRSR

GST-P(C638)-mCherry

MSPILGYWKIKGLVQPTRLLEYLEEKYEEHLYERDEGDKWRNKKFELGLEFPNLP
 YYIDGDVKLTQSMARIYIADKHNMLGGCPKERAEISMLEGAVLDIRYGVSRIAYSKD
 FETLKVDFLSKLPEMLKMFEDRLCHKTYLNGDHVTHPDFMLYDALDVVLYMDPMC
 LDAFPKLVCFKKRIEAIQIDKYLKSSKYIAWPLQGWQATFGGGDHPPKSDLVPRG
 SENLYFQI**GGSGVRKGWHEHVTQDLRSHLVHKL**VQAIPTDP**AALKDRRMENL**
VAYAKKVEGCMYESANSRDEYYHLLAEKIYKIQKELEEKRRSR**TMVSKGEEDNM**
AIKEFMRFKVHMEGSVNGHEFEIEGEGEGRPYEGTQTAKLKVTKGGPLPFAWDI
LSPQFMYGSKAYVKHPADIPDYLKLSFPEGFKWERVMNFEDGGVVTVTQDSSLQ
DGEFIYKVKLRGTNFPSPDGPVMQKKTMGWEASSERMYPEDGALKGEIKQRLKL
KDGGHYDAEVKTTYKAKKPVQLPGAYNVNIKLDITSHNEDYTIVEQYERAEGRHS
TGGMDELYKEFPGRLERPHRD

P(WT)-mCherry

MGVRKGWHEHVTQDLRSHLVHKLVQAIPTDP**AALKDRRMENL****VAYAKKVEG**
CMYESANSRDEYYHLLAEKIYKIQKELEEKRRSR**GDPPVATMVSKGEEDNMAI**
IKEFMRFKVHMEGSVNGHEFEIEGEGEGRPYEGTQTAKLKVTKGGPLPFAWDILSP

QFMYGSKAYVKHPADIPDYLKLSFPEGFKWERVMNFEDGGVVTVTQDSSLQDG
 EFIYKVKLRGTFNPSDGPVMQKKTMGWEASSERMYPEDGALKGEIKQRLKLD
 GGHYDAEVKTTYKAKKPVQLPGAYNVNIKLDITSHNEDYTIVEQYERAEGRHSTG
 GMDELYK

P(C638)-mCherry

MGVRKGWHEHVTQDLRSHLVHKLVAIFPTDPAALKDRRMENLVAYAKKVEG
 DMYESANSRDEYYHLLAEKIYKIQKELEEKRRSRGDPVATMVSKEEDNMAIK
 EFMRFKVMHEGVSNGHEFEIEGEGEGRPYEGTQTAKLKVTKGGPLPFAWDILSP
 QFMYGSKAYVKHPADIPDYLKLSFPEGFKWERVMNFEDGGVVTVTQDSSLQDG
 EFIYKVKLRGTFNPSDGPVMQKKTMGWEASSERMYPEDGALKGEIKQRLKLD
 GGHYDAEVKTTYKAKKPVQLPGAYNVNIKLDITSHNEDYTIVEQYERAEGRHSTG
 GMDELYK

mCherry-P(WT)

MVSKGEEDNMAIIEFMRFKVMHEGVSNGHEFEIEGEGEGRPYEGTQTAKLKVT
 KGGPLPFAWDILSPQFMYGSKAYVKHPADIPDYLKLSFPEGFKWERVMNFEDGG
 VVTVTQDSSLQDGEFIYKVKLRGTFNPSDGPVMQKKTMGWEASSERMYPEDGA
 LKGEIKQRLKLDGGHYDAEVKTTYKAKKPVQLPGAYNVNIKLDITSHNEDYTIVE
 QYERAEGRHSTGGMDELYKSGLRSRGGVRKGWHEHVTQDLRSHLVHKLVAIF
 PTPDPAALKDRRMENLVAYAKKVEGDMYESANSRDEYYHLLAEKIYKIQKELEE
 KRRSR

mCherry-P(C638)

MVSKGEEDNMAIIEFMRFKVMHEGVSNGHEFEIEGEGEGRPYEGTQTAKLKVT
 KGGPLPFAWDILSPQFMYGSKAYVKHPADIPDYLKLSFPEGFKWERVMNFEDGG
 VVTVTQDSSLQDGEFIYKVKLRGTFNPSDGPVMQKKTMGWEASSERMYPEDGA
 LKGEIKQRLKLDGGHYDAEVKTTYKAKKPVQLPGAYNVNIKLDITSHNEDYTIVE
 QYERAEGRHSTGGMDELYKSGLRSRGGVRKGWHEHVTQDLRSHLVHKLVAIF
 PTPDPAALKDRRMENLVAYAKKVEGD MYESANSRDEYYHLLAEKIYKIQKELEE
 KRRSR

mCherry

MVSKGEEDNMAIIEFMRFKVMHEGVSNGHEFEIEGEGEGRPYEGTQTAKLKVT
 KGGPLPFAWDILSPQFMYGSKAYVKHPADIPDYLKLSFPEGFKWERVMNFEDGG
 VVTVTQDSSLQDGEFIYKVKLRGTFNPSDGPVMQKKTMGWEASSERMYPEDGA
 LKGEIKQRLKLDGGHYDAEVKTTYKAKKPVQLPGAYNVNIKLDITSHNEDYTIVE
 QYERAEGRHSTGGMDELYKSGLRSAQASNSAVDGTAGPGSTGSR

mTurquoise2

MVSKGEELFTGVVPIVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTCLKFICTTGKLP
 VPWPTLVTTLSWGVQCFARYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYK
 TRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNFYSDNVYITADKQKNGIKA
 NFKIRHNIEDGGVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSKLSKDPNEKRDH
 MVLLEFVTAAGITLGMDELYKSSGLRSRAQASNSAVDGTAGPGSTGSR

8.2.2 Exemplarische SDS-Polyacrylamidgele der Proteinaufreinigungen

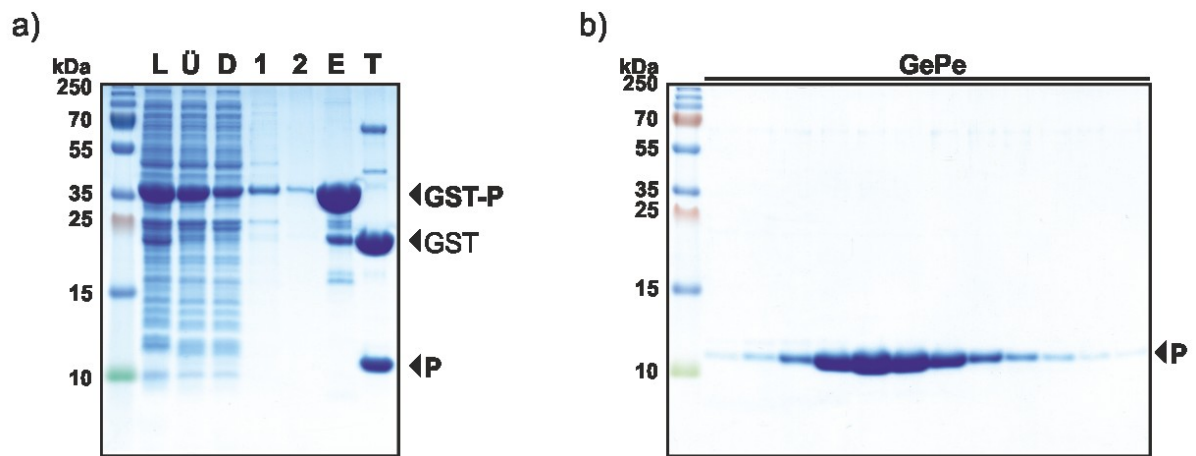


Abbildung A19: Exemplarische 17%–ige SDS-Polyacrylamidgele zur Kontrolle der Aufreinigung des Proteins **P(WT)**. a) Gel zur Affinitätschromatographie mittels GSH-Säule. b) Gel zur Aufreinigung mittels Gelpermeationschromatographie (GePe). L: Lysat; Ü: löslicher Überstand des Lysats; D: Durchfluss; 1: erster Waschschrift; 2: zweiter Waschschrift; E: Eluat der GSH-Säule; T: Probe nach dem TEV-Protease Verdau.

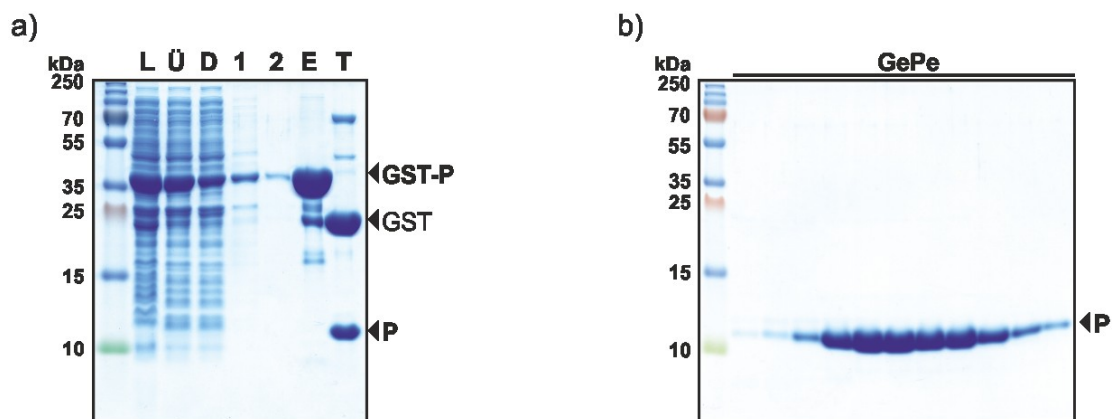


Abbildung A20: Exemplarische 17%–ige SDS-Polyacrylamidgele zur Kontrolle der Aufreinigung des Proteins **P(C626)**. a) Gel zur Affinitätschromatographie mittels GSH-Säule. b) Gel zur Aufreinigung mittels Gelpermeationschromatographie (GePe). L: Lysat; Ü: löslicher Überstand des Lysats; D: Durchfluss; 1: erster Waschschrift; 2: zweiter Waschschrift; E: Eluat der GSH-Säule; T: Probe nach dem TEV-Protease Verdau.

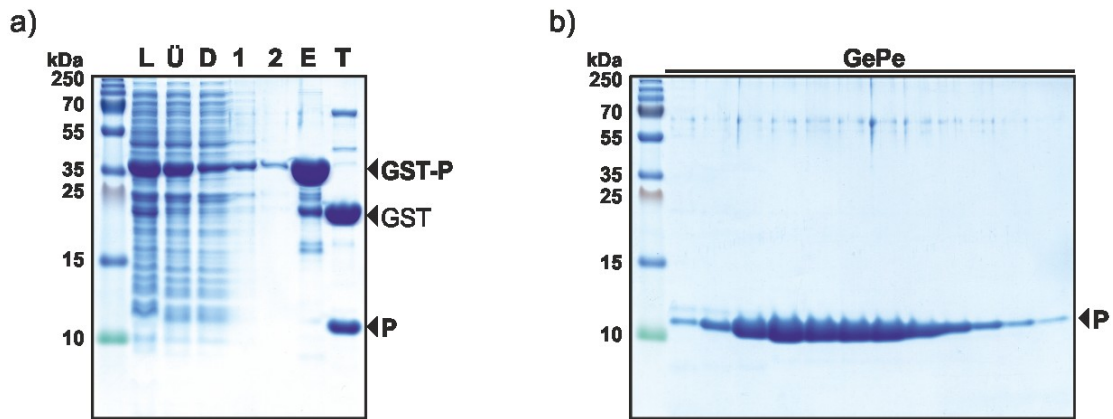


Abbildung A21: Exemplarische 17%–ige SDS-Polyacrylamidgele zur Kontrolle der Aufreinigung des Proteins **P(C630)**. a) Gel zur Affinitätschromatographie mittels GSH-Säule. b) Gel zur Aufreinigung mittels Gelpermeationschromatographie (GePe). L: Lysat; Ü: löslicher Überstand des Lysats; D: Durchfluss; 1: erster Waschschrift; 2: zweiter Waschschrift; E: Eluat der GSH-Säule; T: Probe nach dem TEV-Protease Verdau.

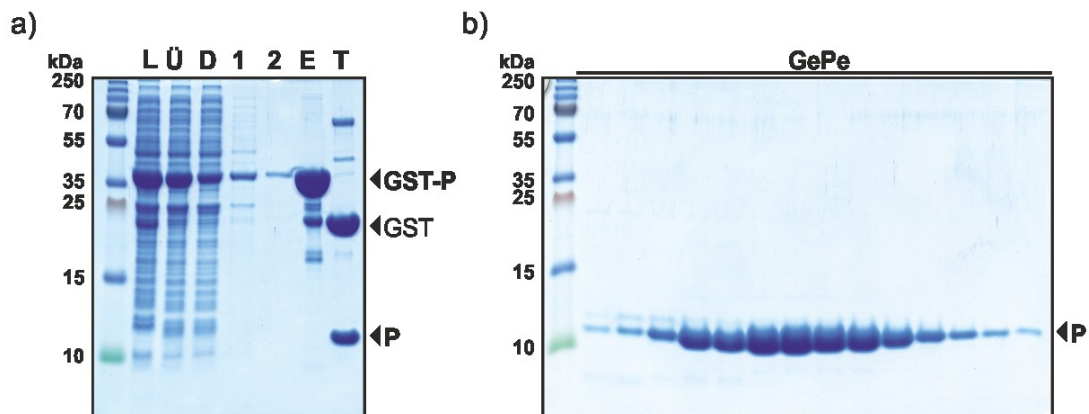


Abbildung A22: Exemplarische 17%–ige SDS-Polyacrylamidgele zur Kontrolle der Aufreinigung des Proteins **P(C634)**. a) Gel zur Affinitätschromatographie mittels GSH-Säule. b) Gel zur Aufreinigung mittels Gelpermeationschromatographie (GePe). L: Lysat; Ü: löslicher Überstand des Lysats; D: Durchfluss; 1: erster Waschschrift; 2: zweiter Waschschrift; E: Eluat der GSH-Säule; T: Probe nach dem TEV-Protease Verdau.

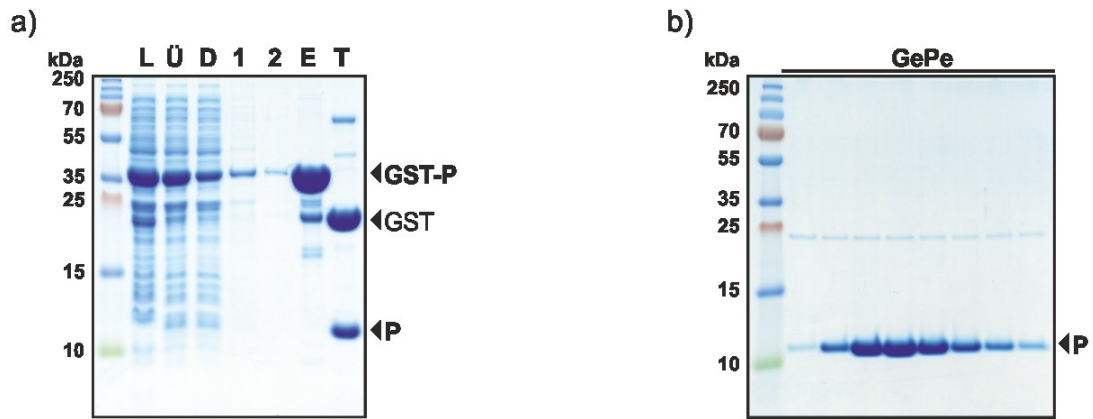


Abbildung A23: Exemplarische 17%-ige SDS-Polyacrylamidgele zur Kontrolle der Aufreinigung des Proteins **P(C638)**. a) Gel zur Affinitätschromatographie mittels GSH-Säule. b) Gel zur Aufreinigung mittels Gelpermeationschromatographie (GePe). L: Lysat; Ü: löslicher Überstand des Lysats; D: Durchfluss; 1: erster Waschschrift; 2: zweiter Waschschrift; E: Eluat der GSH-Säule; T: Probe nach dem TEV-Protease Verdau.

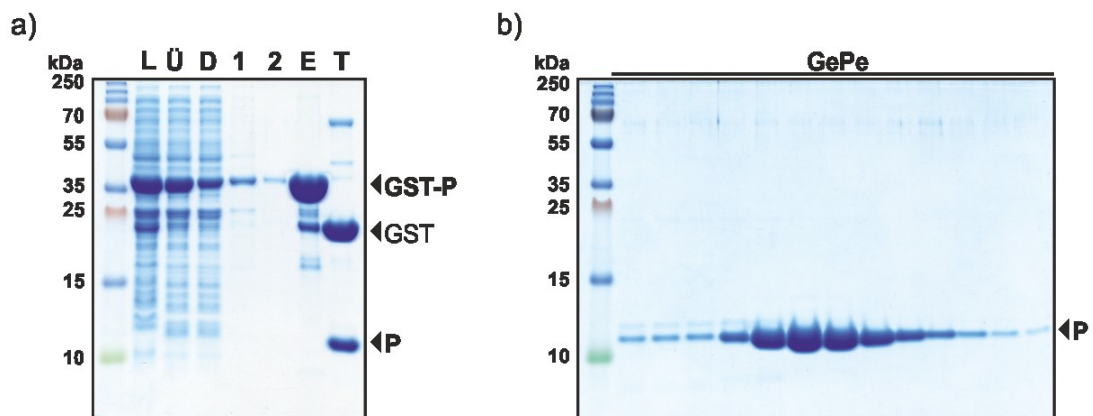


Abbildung A24: Exemplarische 17%-ige SDS-Polyacrylamidgele zur Kontrolle der Aufreinigung des Proteins **P(C642)**. a) Gel zur Affinitätschromatographie mittels GSH-Säule. b) Gel zur Aufreinigung mittels Gelpermeationschromatographie (GePe). L: Lysat; Ü: löslicher Überstand des Lysats; D: Durchfluss; 1: erster Waschschrift; 2: zweiter Waschschrift; E: Eluat der GSH-Säule; T: Probe nach dem TEV-Protease Verdau.

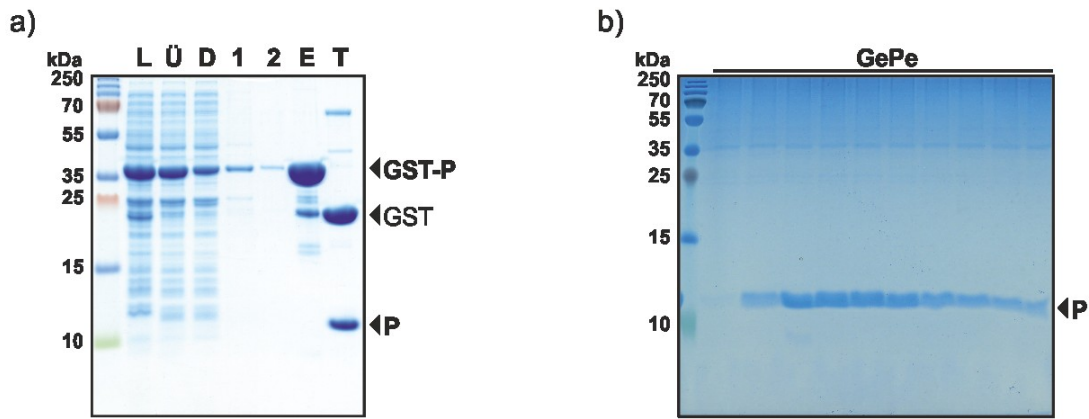


Abbildung A25: Exemplarische 17%–ige SDS-Polyacrylamidgels zur Kontrolle der Aufreinigung des Proteins P(C648). a) Gel zur Affinitätschromatographie mittels GSH-Säule. b) Gel zur Aufreinigung mittels Gelpermeationschromatographie (GePe). L: Lysat; Ü: löslicher Überstand des Lysats; D: Durchfluss; 1: erster Waschschrift; 2: zweiter Waschschrift; E: Eluat der GSH-Säule; T: Probe nach dem TEV-Protease Verdau.

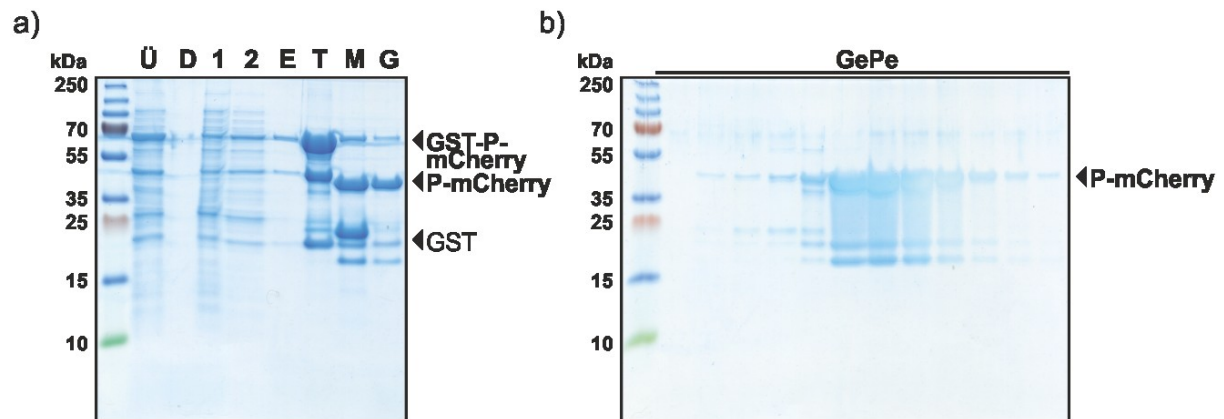


Abbildung A26: 12%–ige SDS-Polyacrylamidgels zur Kontrolle der Aufreinigung des Proteins P(C638)-mCherry. a) Gel zur Affinitätschromatographie mittels GSH-Säule. b) Gel zur Aufreinigung mittels Gelpermeationschromatographie (GePe). L: Lysat; Ü: löslicher Überstand des Lysats; D: Durchfluss; 1: erster Waschschrift; 2: zweiter Waschschrift; E: Eluat der GSH-Säule; T: Probe nach dem TEV-Protease Verdau; M: Durchfluss der reversen Maltose-Säule; G: Durchfluss der 1. reversen GSH-Säule.

8.2.3 Daten zur massenspektrometrischen Untersuchung der Proteinvarianten

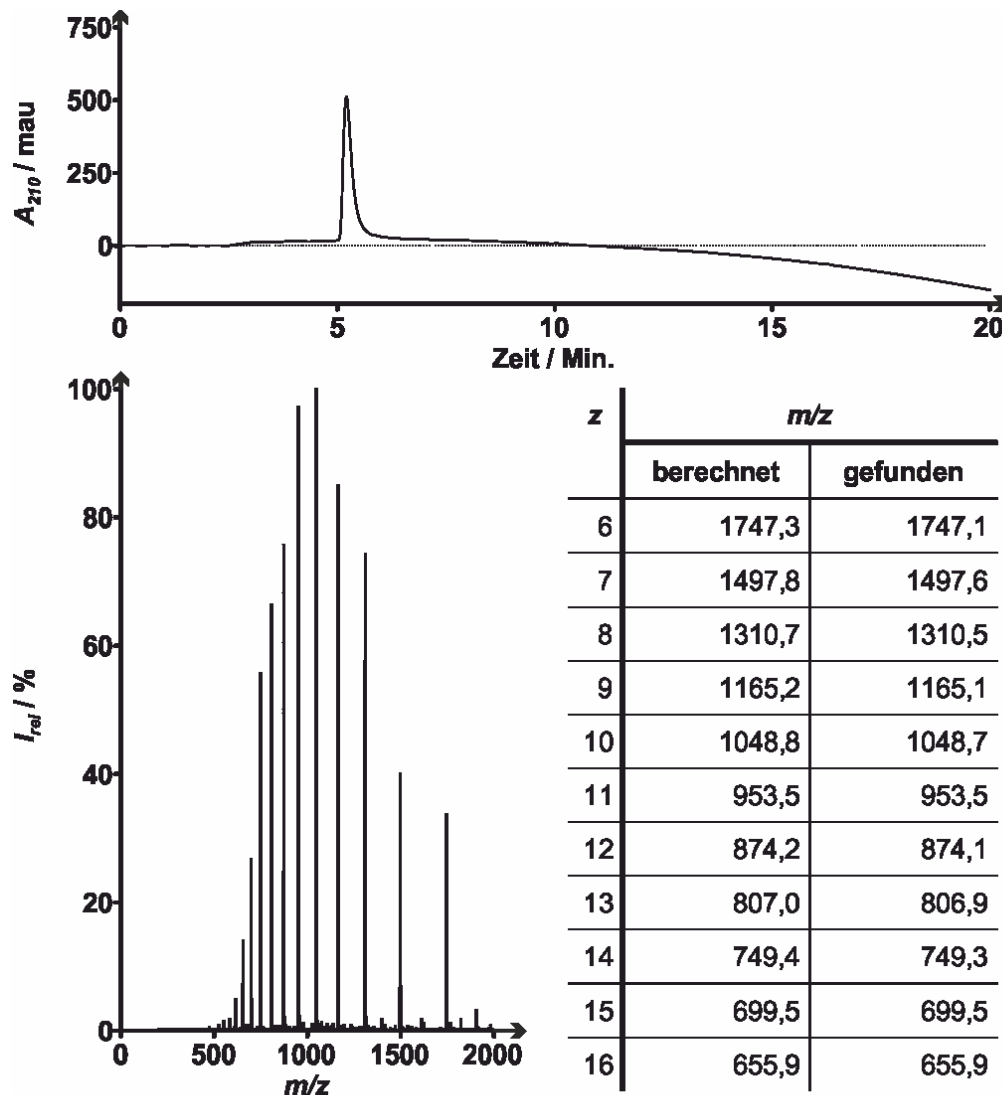


Abbildung A27: Analytische HPLC-MS Messung mit UV/Vis-Detektion der Proteinvariante **P(WT)**. Oben: Chromatogramm der HPLC bei 210 nm (Gradient: 30–95% des HPLC-Lösungsmittels B gegen das HPLC-Lösungsmittel A in 20 Min.). Unten: Massenspektrum des höchsten Signalausgangs aus dem HPLC-Chromatogramm mit berechneten und gefundenen m/z -Werten. Die Software der HPLC-MS berechnet daraus ein Molekulargewicht von 10476,87 Da, was in guter Übereinstimmung mit dem mittels des Programms *ProtParam* bestimmten Molekulargewicht der untersuchten Proteinvariante ist (10477,90 Da).

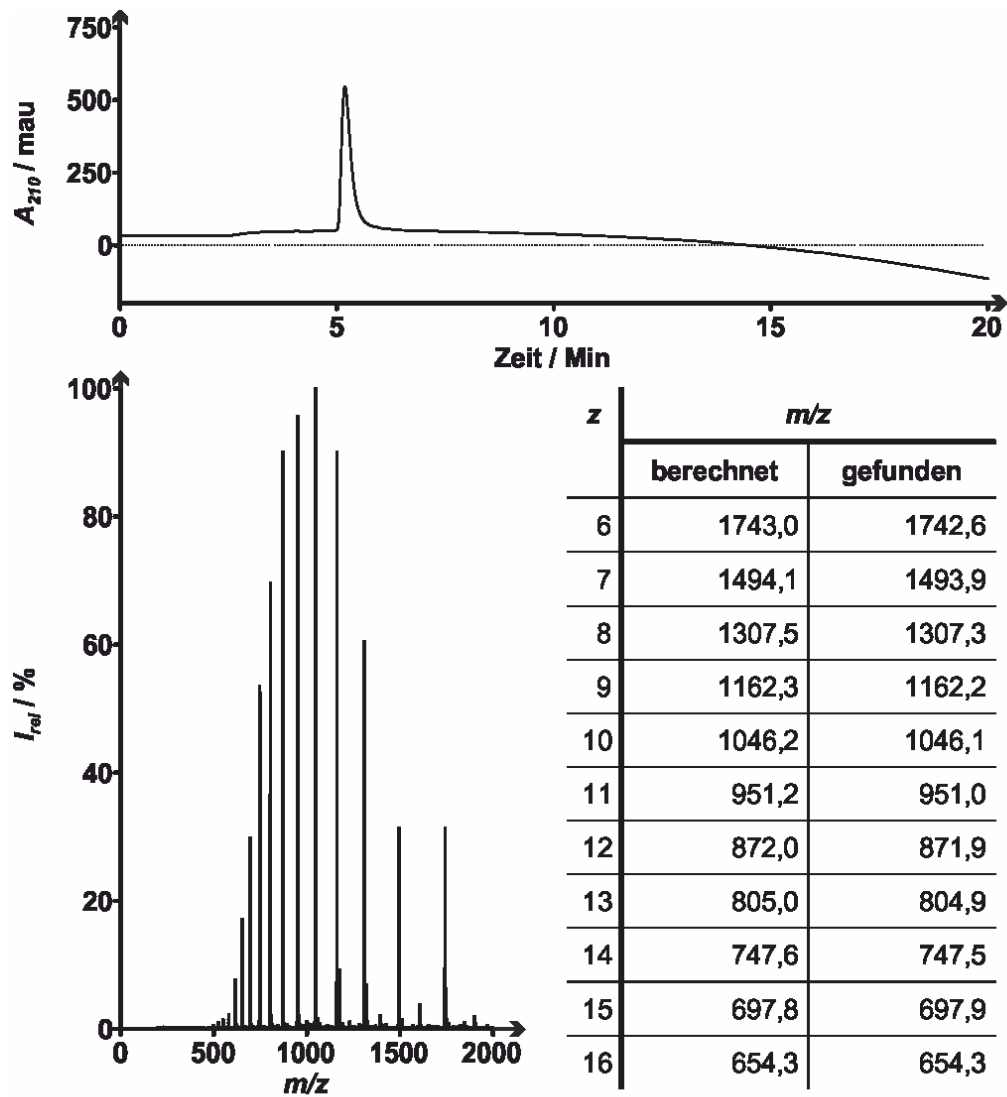


Abbildung A28: Analytische HPLC-MS Messung mit UV/Vis-Detektion der Proteinvariante **P(C626)**. Oben: Chromatogramm der HPLC bei 210 nm (Gradient: 30–95% des HPLC-Lösungsmittels B gegen das HPLC-Lösungsmittel A in 20 Min.). Unten: Massenspektrum des höchsten Signalausgangs aus dem HPLC-Chromatogramm mit berechneten und gefundenen m/z -Werten. Die Software der HPLC-MS berechnet daraus ein Molekulargewicht von 10450,50 Da, was in guter Übereinstimmung mit dem mittels des Programms *ProtParam* bestimmten Molekulargewicht der untersuchten Proteinvariante ist (10452,00 Da).

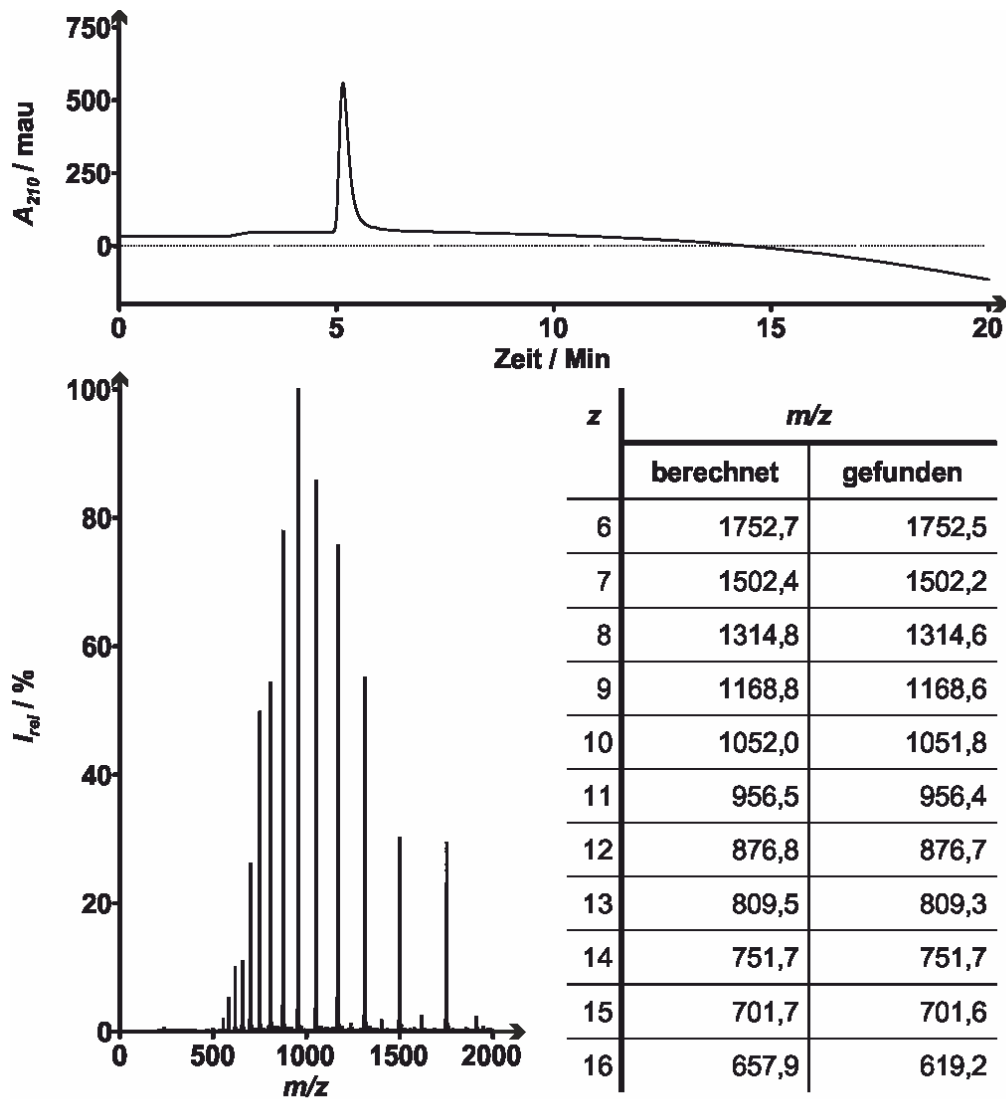


Abbildung A29: Analytische HPLC-MS Messung mit UV/Vis-Detektion der Proteinvariante **P(C630)**. Oben: Chromatogramm der HPLC bei 210 nm (Gradient: 30–95% des HPLC-Lösungsmittels B gegen das HPLC-Lösungsmittel A in 20 Min.). Unten: Massenspektrum des höchsten Signalausgangs aus dem HPLC-Chromatogramm mit berechneten und gefundenen m/z -Werten. Die Software der HPLC-MS berechnet daraus ein Molekulargewicht von 10508,71 Da, was in guter Übereinstimmung mit dem mittels des Programms *ProtParam* bestimmten Molekulargewicht der untersuchten Proteinvariante ist (10510,00 Da).

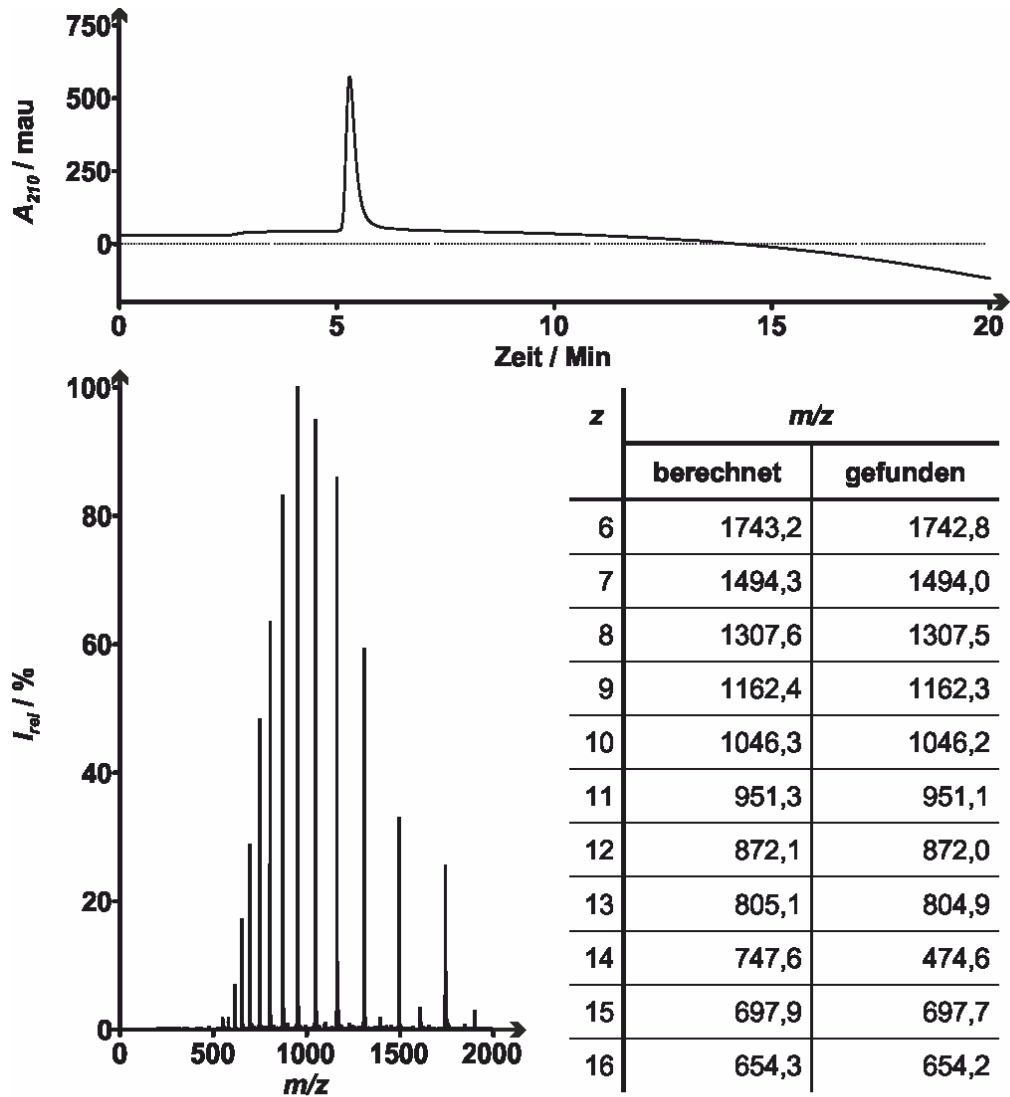


Abbildung A30: Analytische HPLC-MS Messung mit UV/Vis-Detektion der Proteinvariante P(C634). Oben: Chromatogramm der HPLC bei 210 nm (Gradient: 30–95% des HPLC-Lösungsmittels B gegen das HPLC-Lösungsmittel A in 20 Min.). Unten: Massenspektrum des höchsten Signalausgangs aus dem HPLC-Chromatogramm mit berechneten und gefundenen m/z -Werten. Die Software der HPLC-MS berechnet daraus ein Molekulargewicht von 10451,87 Da, was in guter Übereinstimmung mit dem mittels des Programms *ProtParam* bestimmten Molekulargewicht der untersuchten Proteinvariante ist (10452,90 Da).

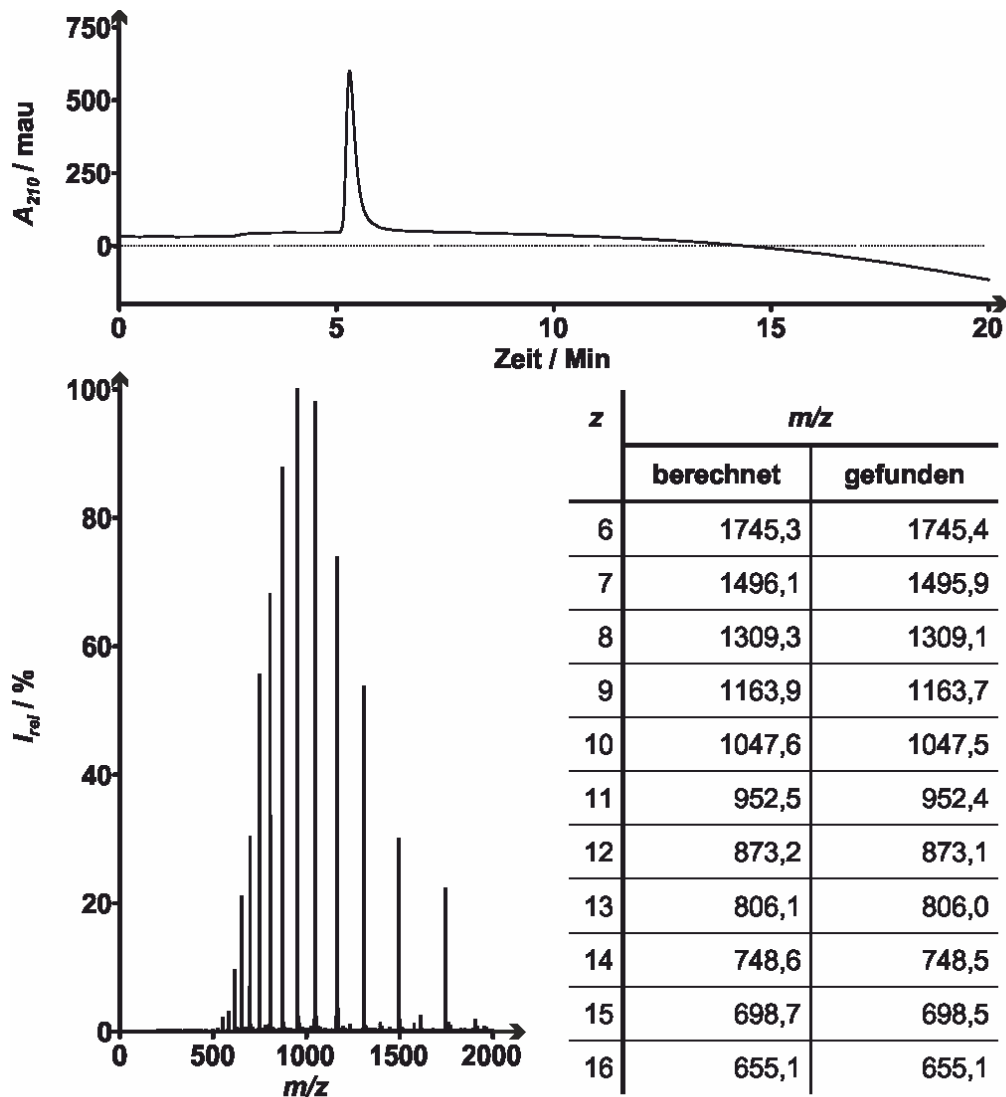


Abbildung A31: Analytische HPLC-MS Messung mit UV/Vis-Detektion der Proteinvariante **P(C638)**. Oben: Chromatogramm der HPLC bei 210 nm (Gradient: 30–95% des HPLC-Lösungsmittels B gegen das HPLC-Lösungsmittel A in 20 Min.). Unten: Massenspektrum des höchsten Signalausfalls aus dem HPLC-Chromatogramm mit berechneten und gefundenen m/z -Werten. Die Software der HPLC-MS berechnet daraus ein Molekulargewicht von 10464,67 Da, was in guter Übereinstimmung mit dem mittels des Programms *ProtParam* bestimmten Molekulargewicht der untersuchten Proteinvariante ist (10466,00 Da).

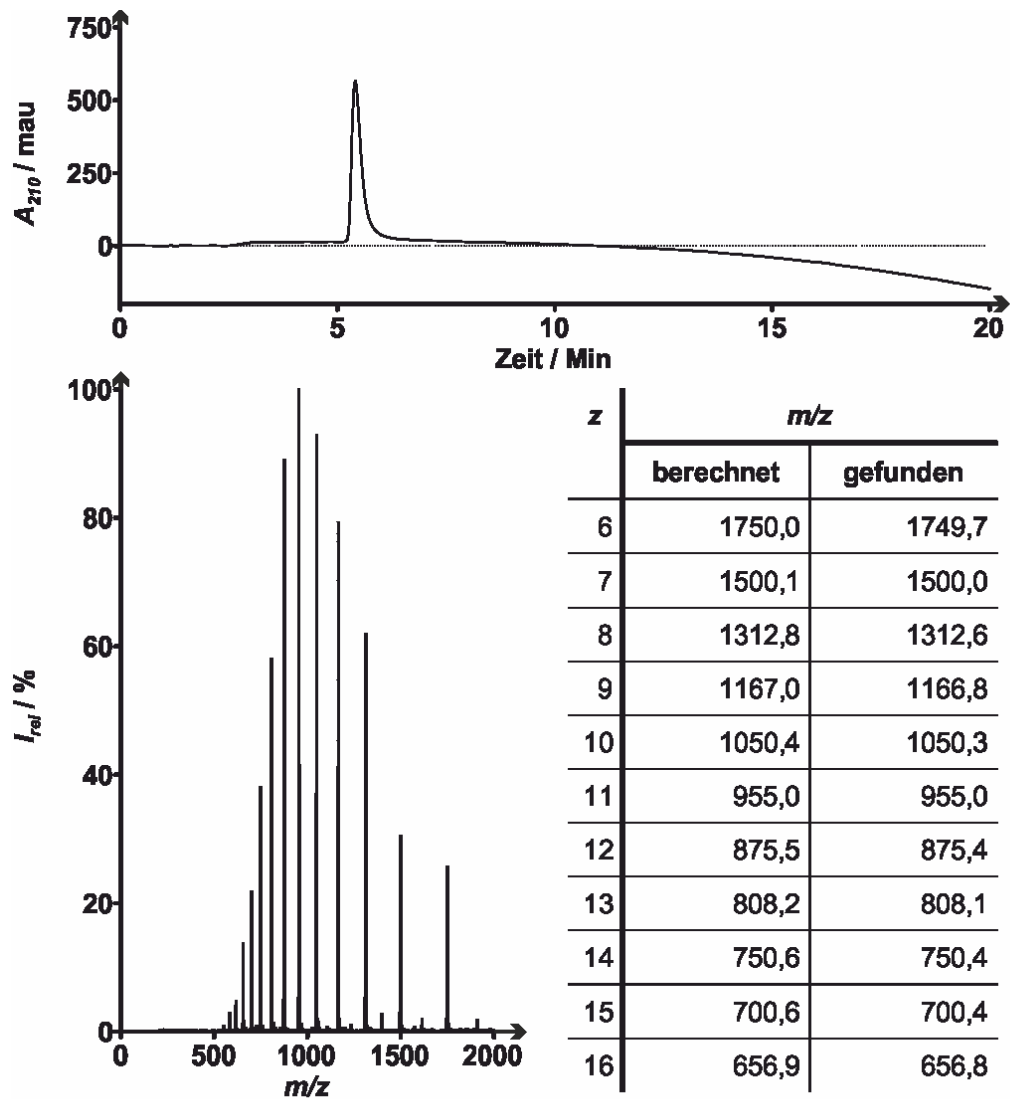


Abbildung A32: Analytische HPLC-MS Messung mit UV/Vis-Detektion der Proteinvariante P(C642). Oben: Chromatogramm der HPLC bei 210 nm (Gradient: 30–95% des HPLC-Lösungsmittels B gegen das HPLC-Lösungsmittel A in 20 Min.). Unten: Massenspektrum des höchsten Signalausgangs aus dem HPLC-Chromatogramm mit berechneten und gefundenen m/z -Werten. Die Software der HPLC-MS berechnet daraus ein Molekulargewicht von 10492,43 Da, was in guter Übereinstimmung mit dem mittels des Programms *ProtParam* bestimmten Molekulargewicht der untersuchten Proteinvariante ist (10494,00 Da).

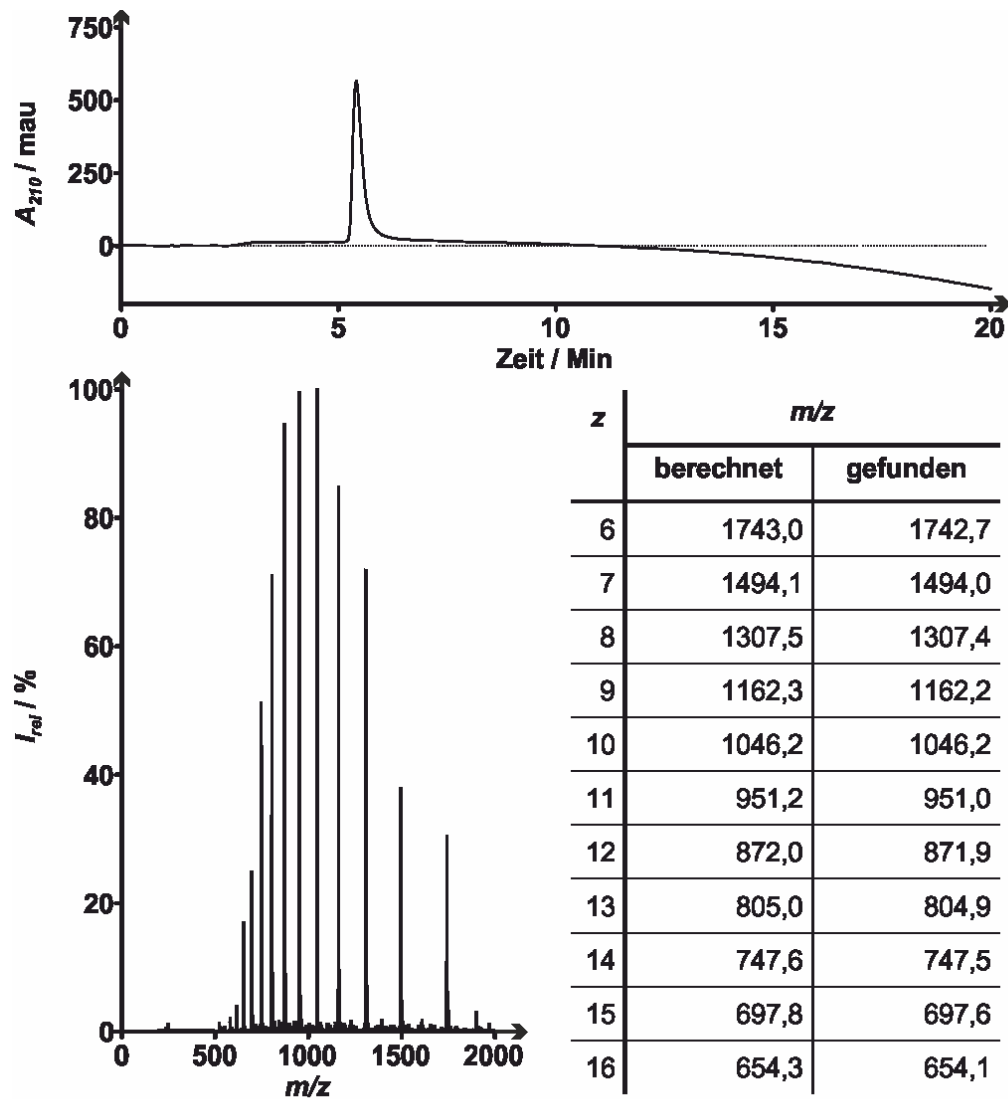


Abbildung A33: Analytische HPLC-MS Messung mit UV/Vis-Detektion der Proteinvariante **P(C648)**. Oben: Chromatogramm der HPLC bei 210 nm (Gradient: 30–95% des HPLC-Lösungsmittels B gegen das HPLC-Lösungsmittel A in 20 Min.). Unten: Massenspektrum des höchsten Signalausfalls aus dem HPLC-Chromatogramm mit berechneten und gefundenen m/z -Werten. Die Software der HPLC-MS berechnet daraus ein Molekulargewicht von 10492,43 Da, was in guter Übereinstimmung mit dem mittels des Programms *ProtParam* bestimmten Molekulargewicht der untersuchten Proteinvariante ist (10494,00 Da).

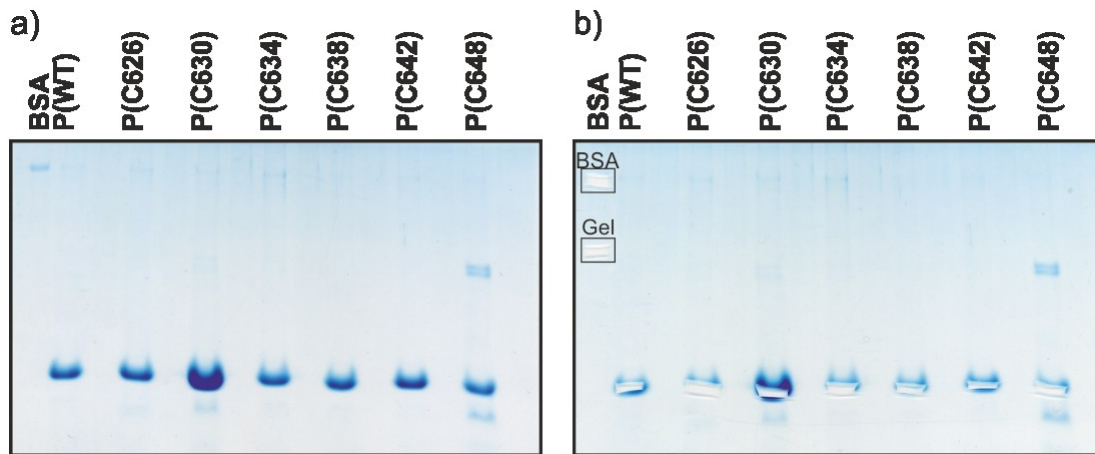


Abbildung A34: Für den *In-Gel*-Verdau verwendetes 17%-iges SDS-Polyacrylamidgel aller Proteinvarianten a) vor und b) nach dem Ausschneiden der Proteinbanden. Die Positionen, an der die zur Kontrolle verwendeten BSA- und Gelproben genommen wurden, wurden durch Kästen markiert.

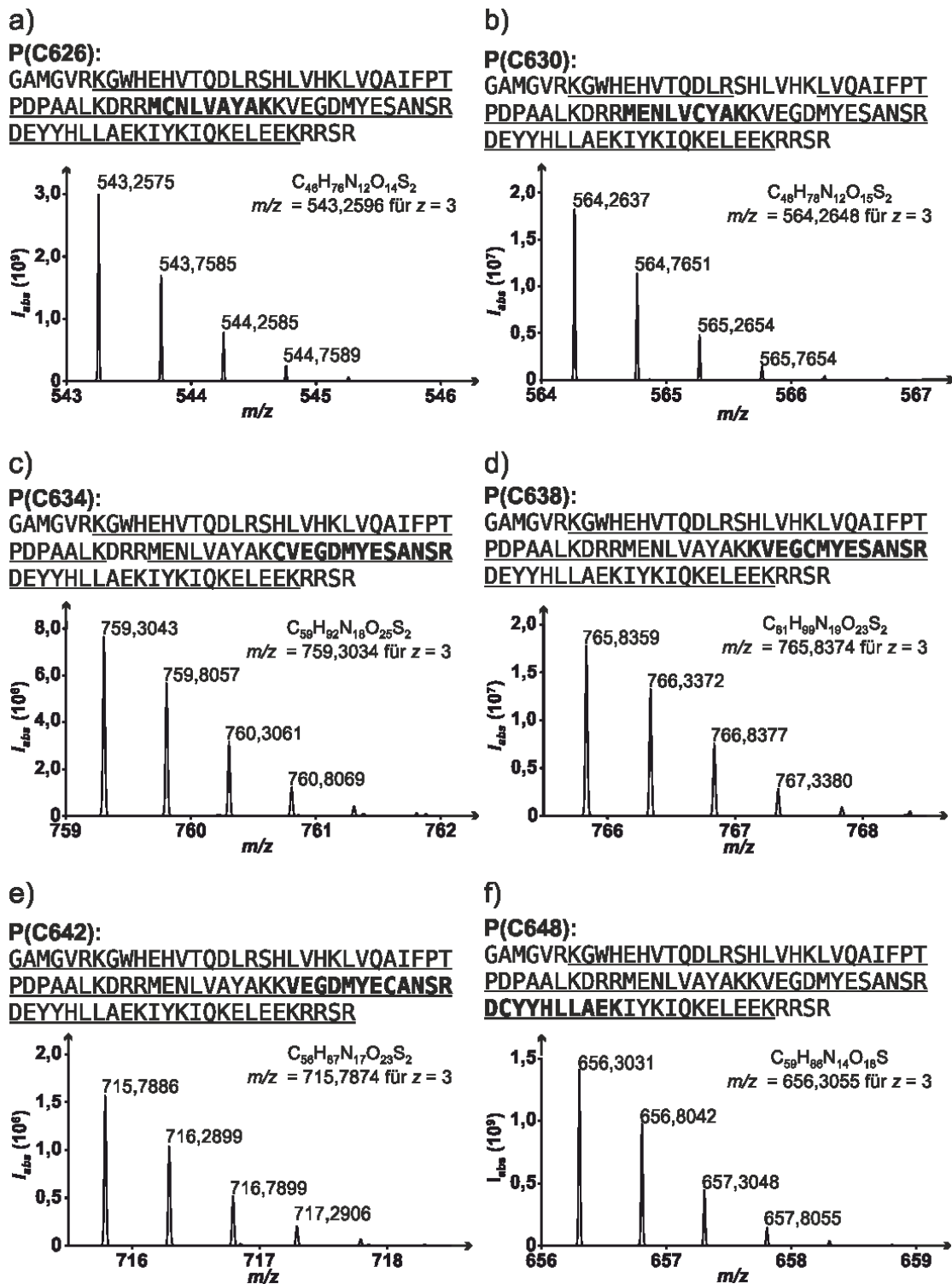


Abbildung A35: HPLC-MS²-Analyse nach tryptischem Verdau der Cystein-enthaltenden Proteinvarianten. Für jedes Protein ist seine vollständige Sequenz dargestellt. Die in der MS²-Messung eindeutig nachgewiesenen Sequenzabschnitte sind unterstrichen, das Cystein-enthaltene tryptische Fragment ist fett markiert. Unter der jeweiligen Sequenz ist ein hochaufgelöstes Massen- (HRMS)-Spektrum des markierten Peptids dargestellt.

8.2.4 Daten zur thermischen Proteinestabilität

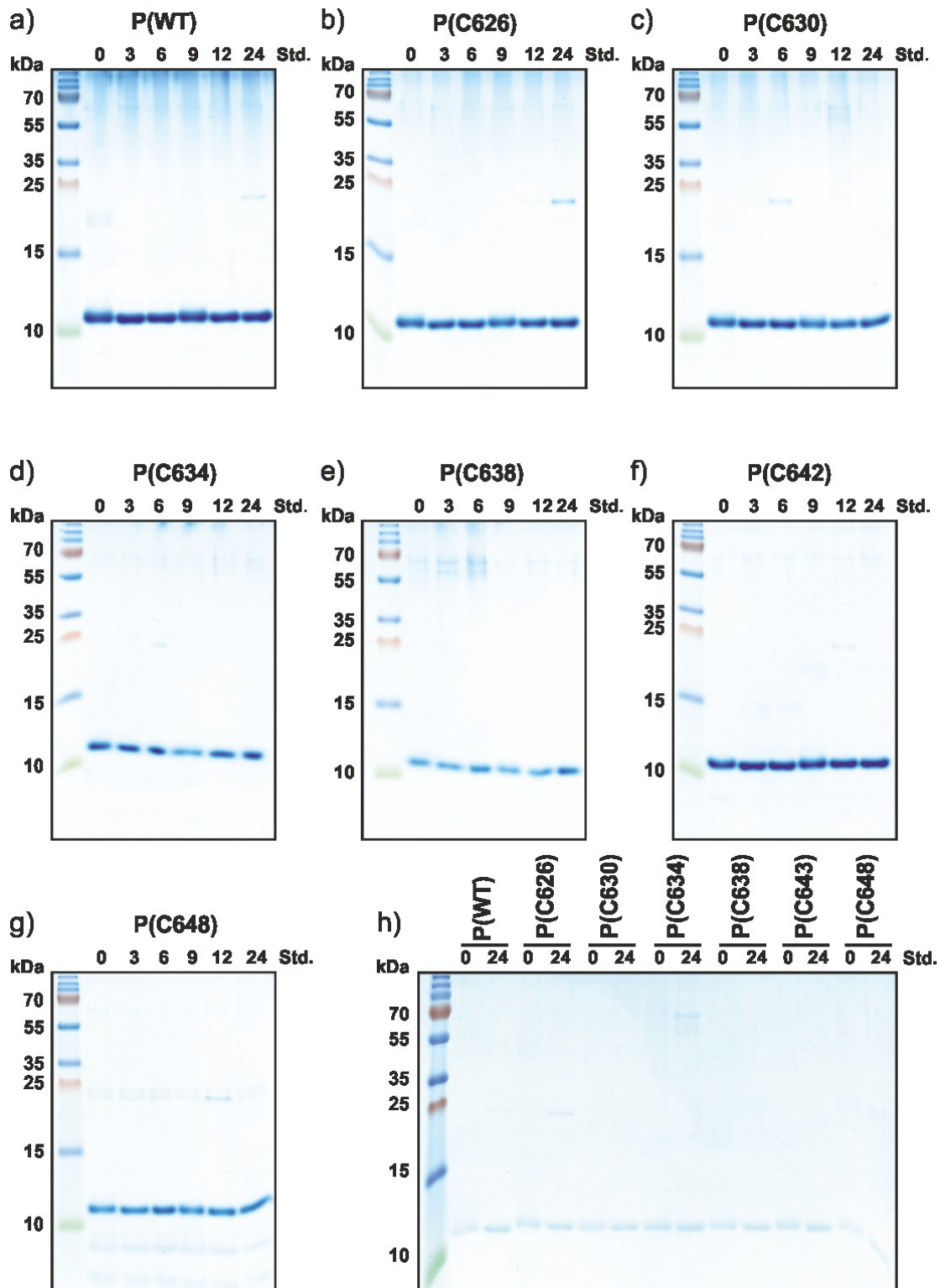


Abbildung A36: a)-g) 17%–ige SDS-Polyacrylamidgels zur Bestimmung der thermischen Stabilität für jede der sieben Proteinvarianten mit Proben vor sowie 3, 6, 9, 12 und 24 Stunden nach der Inkubation bei 37°C. h) Vergleichendes Gel aller sieben Proteinvarianten vor und 24 Stunden nach der Inkubation.

8.3 Daten zur massenspektrometrischen Untersuchung der Liganden und Lokalisationssignale

8.3.1 Analytische Hochleistungsflüssigkeitschromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie

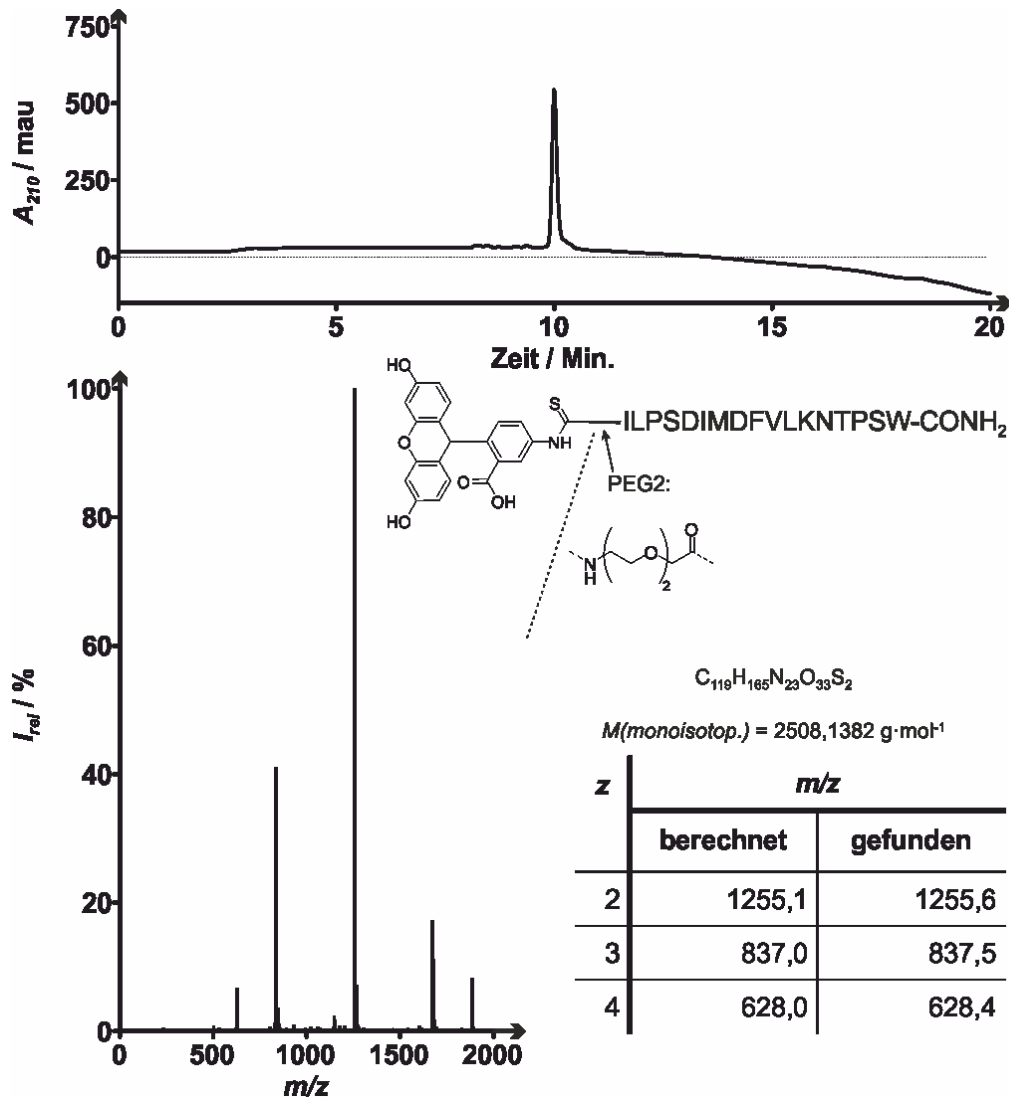


Abbildung A37: Analytische HPLC-MS Messung mit UV/Vis-Detektion des Liganden **f-9L(M)-W**. Oben: Chromatogramm der HPLC bei 210 nm (Gradient: 30–95% des HPLC-Lösungsmittels B gegen das HPLC-Lösungsmittel A in 20 Min.). Unten: Massenspektrum des höchsten Signalausfalls aus dem HPLC-Chromatogramm mit berechneten und gefundenen m/z -Werten.

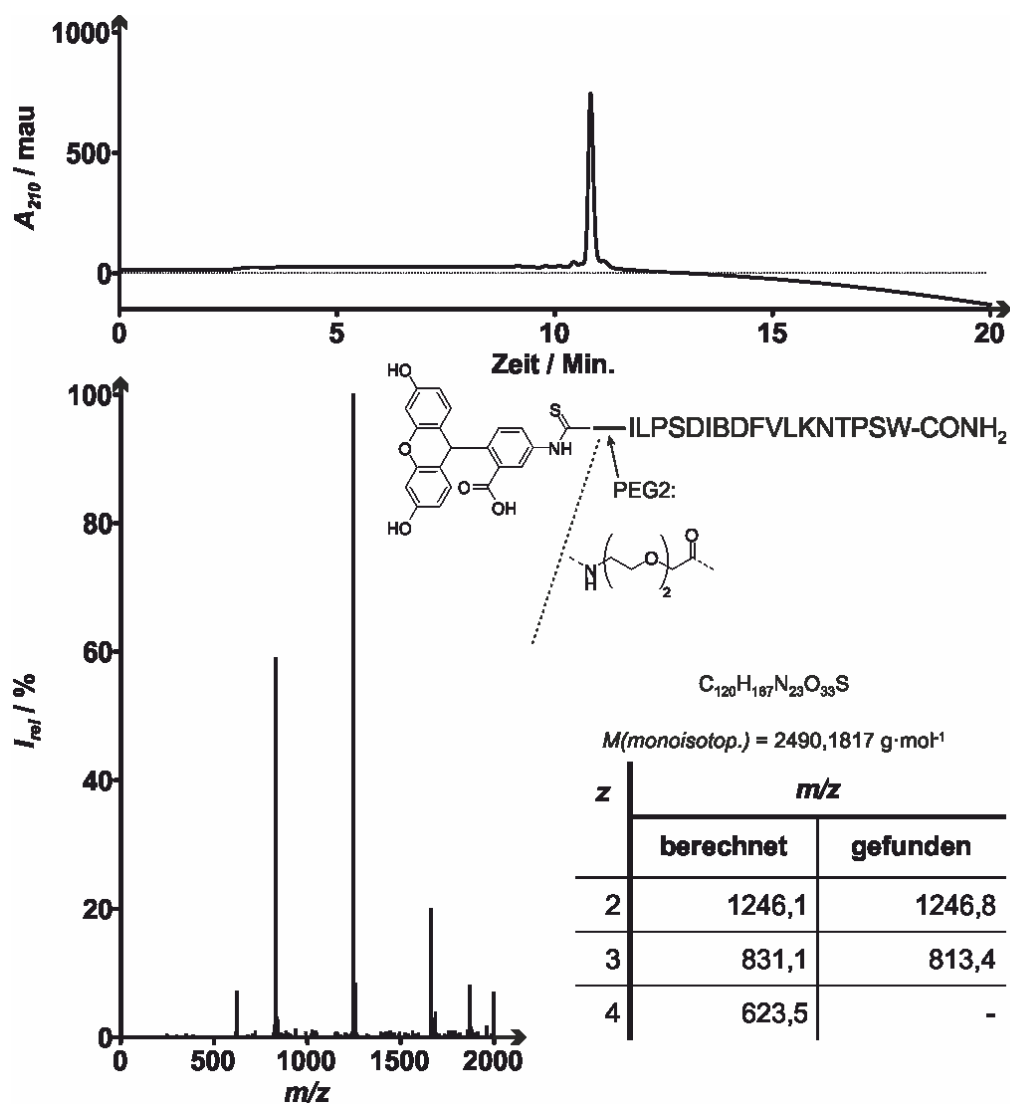


Abbildung A38: Analytische HPLC-MS Messung mit UV/Vis-Detektion des Liganden **f-9L(B)-W**. Oben: Chromatogramm der HPLC bei 210 nm (Gradient: 30–95% des HPLC-Lösungsmittels B gegen das HPLC-Lösungsmittel A in 20 Min.). Unten: Massenspektrum des höchsten Signalausgangs aus dem HPLC-Chromatogramm mit berechneten und gefundenen m/z -Werten.

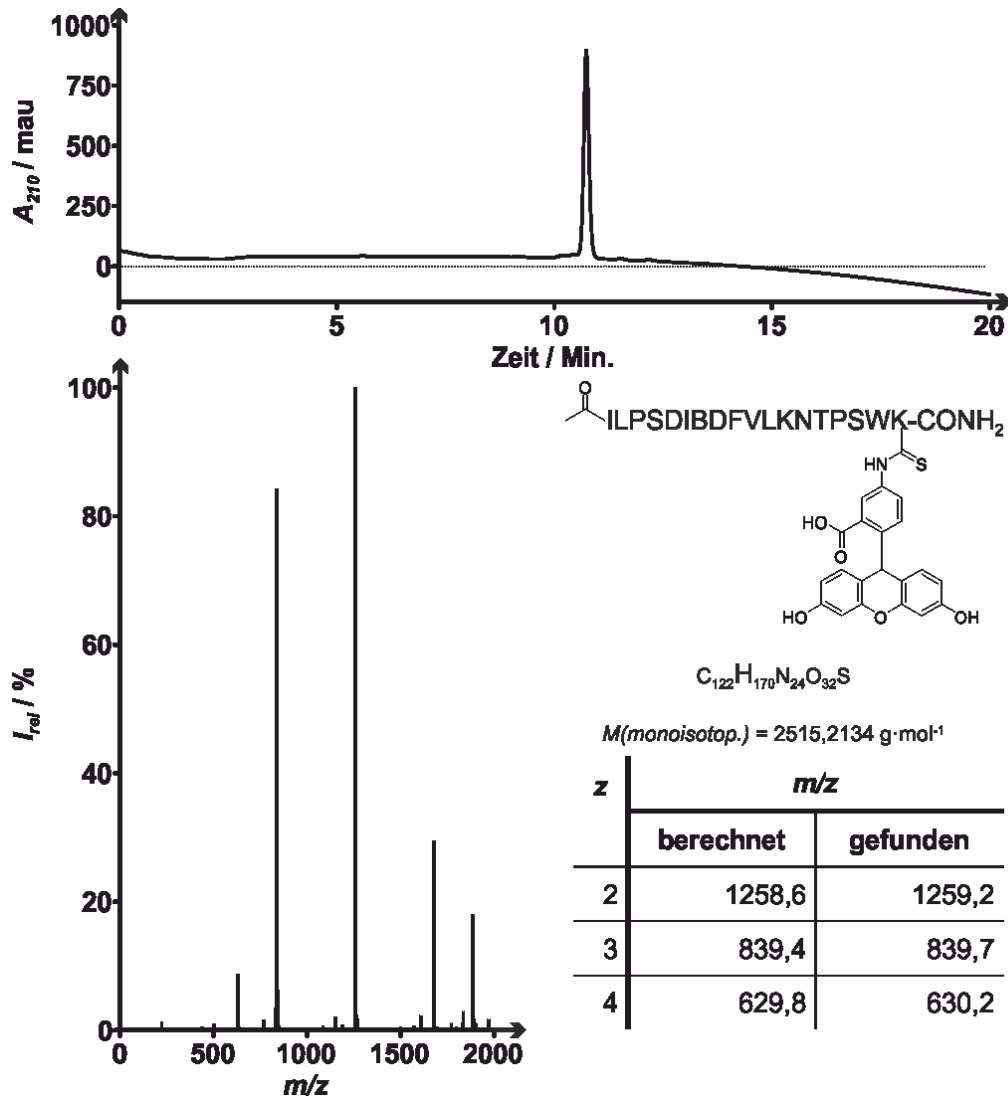


Abbildung A39: Analytische HPLC-MS Messung mit UV/Vis-Detektion des Liganden **H-L-f**. Oben: Chromatogramm der HPLC bei 210 nm (Gradient: 30–95% des HPLC-Lösungsmittels B gegen das HPLC-Lösungsmittel A in 20 Min.). Unten: Massenspektrum des höchsten Signalausfalls aus dem HPLC-Chromatogramm mit berechneten und gefundenen m/z -Werten.

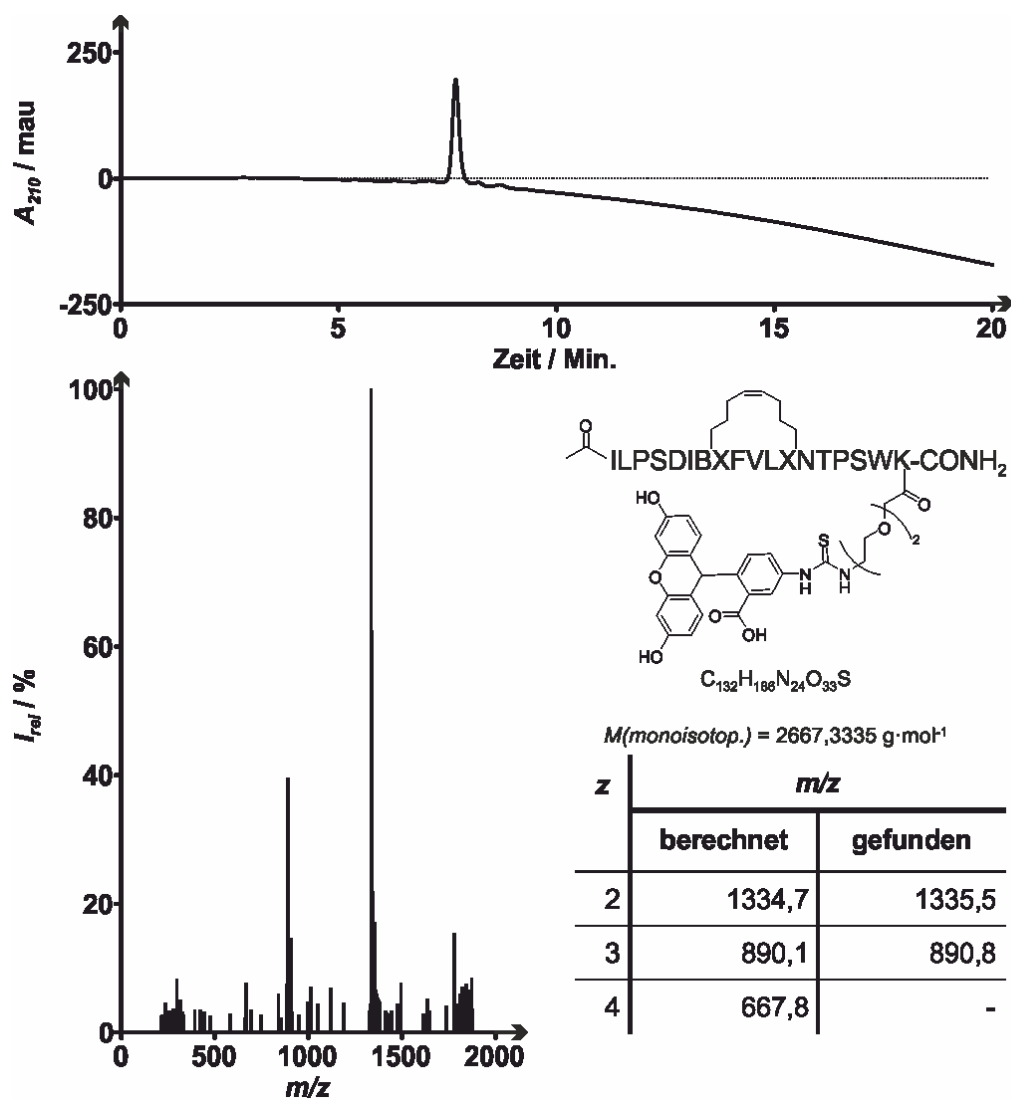


Abbildung A40: Analytische HPLC-MS Messung mit UV/Vis-Detektion des Liganden **H-L(s1)-f**. Oben: Chromatogramm der HPLC bei 210 nm (Gradient: 50–95% des HPLC-Lösungsmittels B gegen das HPLC-Lösungsmittel A in 20 Min.). Unten: Massenspektrum des höchsten Signalausgangs aus dem HPLC-Chromatogramm mit berechneten und gefundenen m/z -Werten.

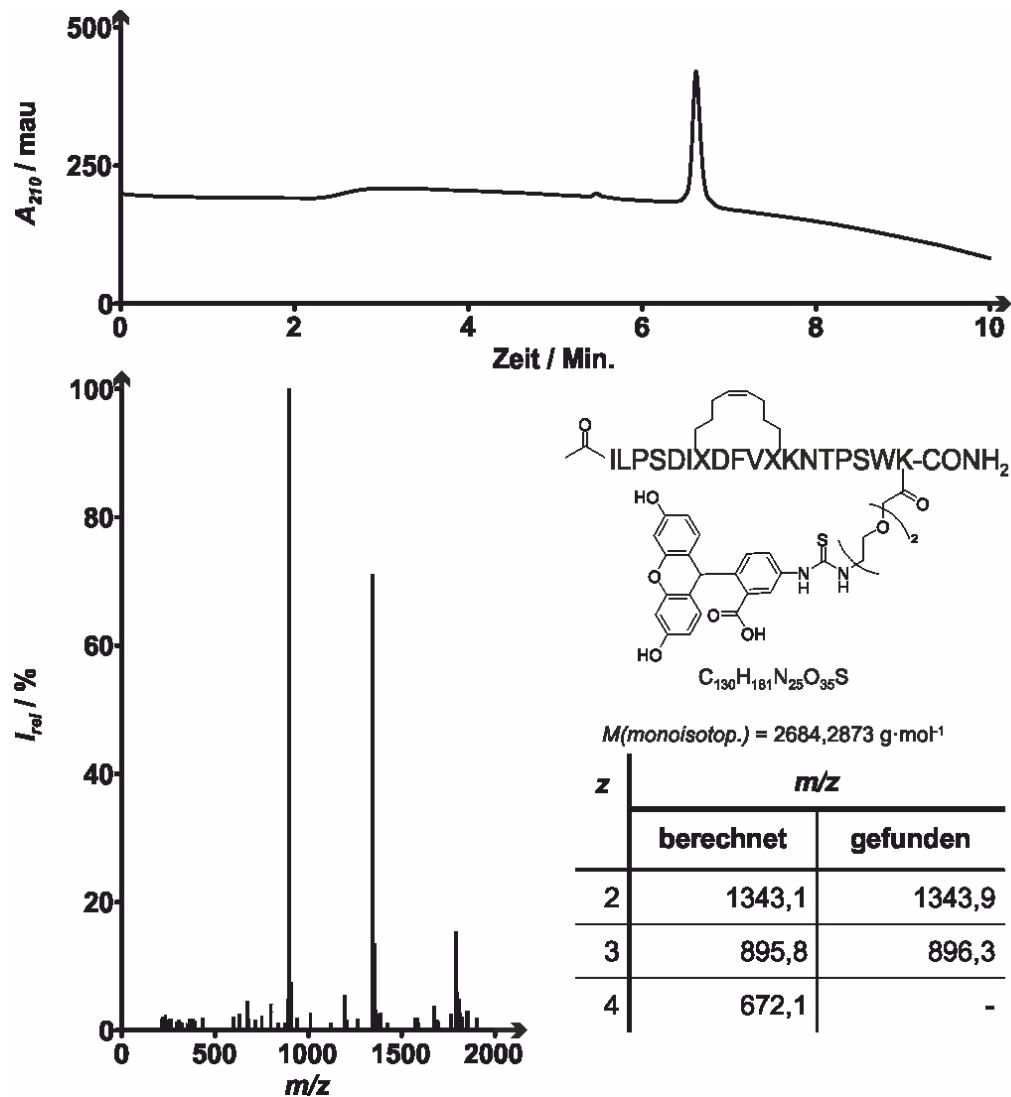


Abbildung A41: Analytische HPLC-MS Messung mit UV/Vis-Detektion des Liganden **H-L(s2)-f**. Oben: Chromatogramm der HPLC bei 210 nm (Gradient: 30–95% des HPLC-Lösungsmittels B gegen das HPLC-Lösungsmittel A in 10 Min.). Unten: Massenspektrum des höchsten Signalausfalls aus dem HPLC-Chromatogramm mit berechneten und gefundenen m/z -Werten.

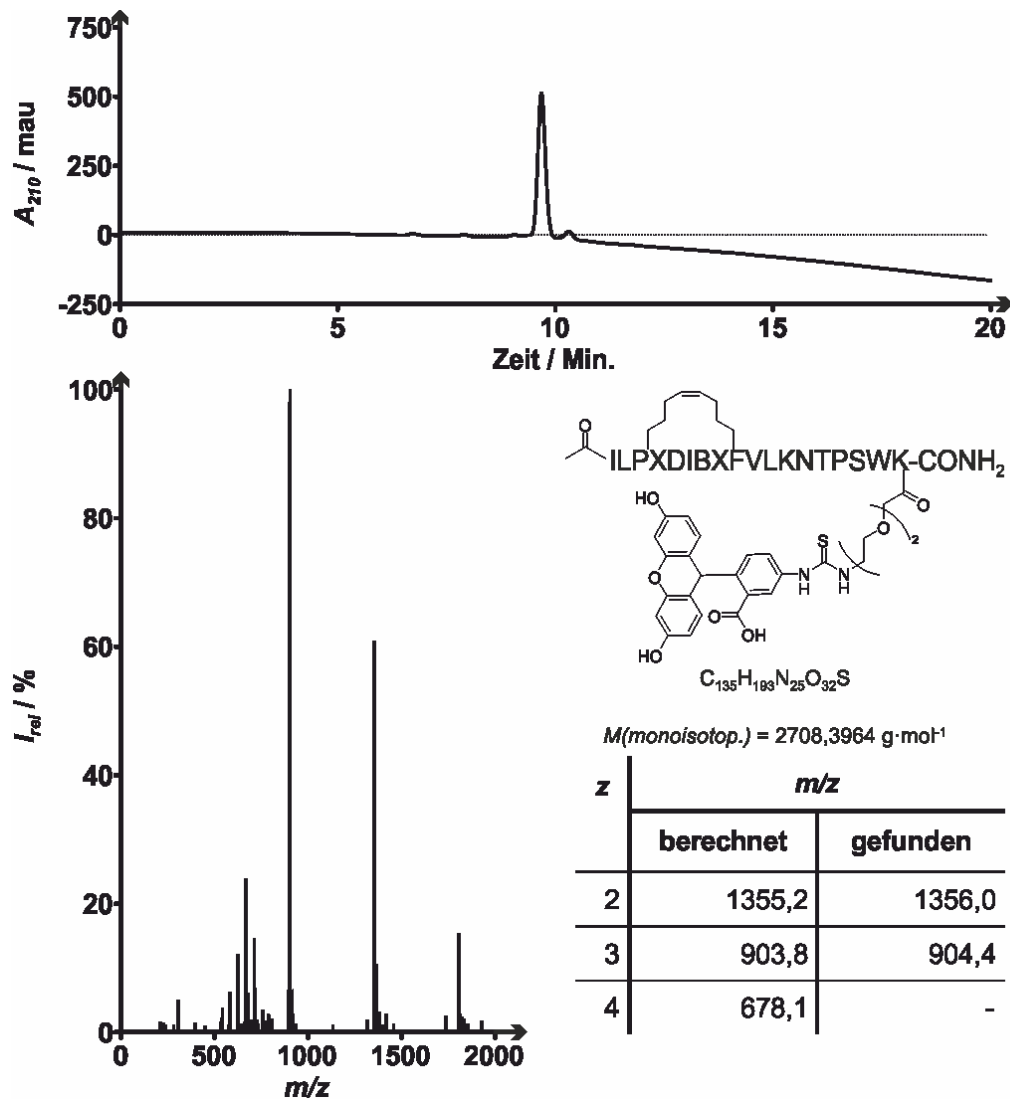


Abbildung A42: Analytische HPLC-MS Messung mit UV/Vis-Detektion des Liganden **H-L(s3)-f**. Oben: Chromatogramm der HPLC bei 210 nm (Gradient: 50–95% des HPLC-Lösungsmittels B gegen das HPLC-Lösungsmittel A in 20 Min.). Unten: Massenspektrum des höchsten Signalausgangs aus dem HPLC-Chromatogramm mit berechneten und gefundenen m/z -Werten.

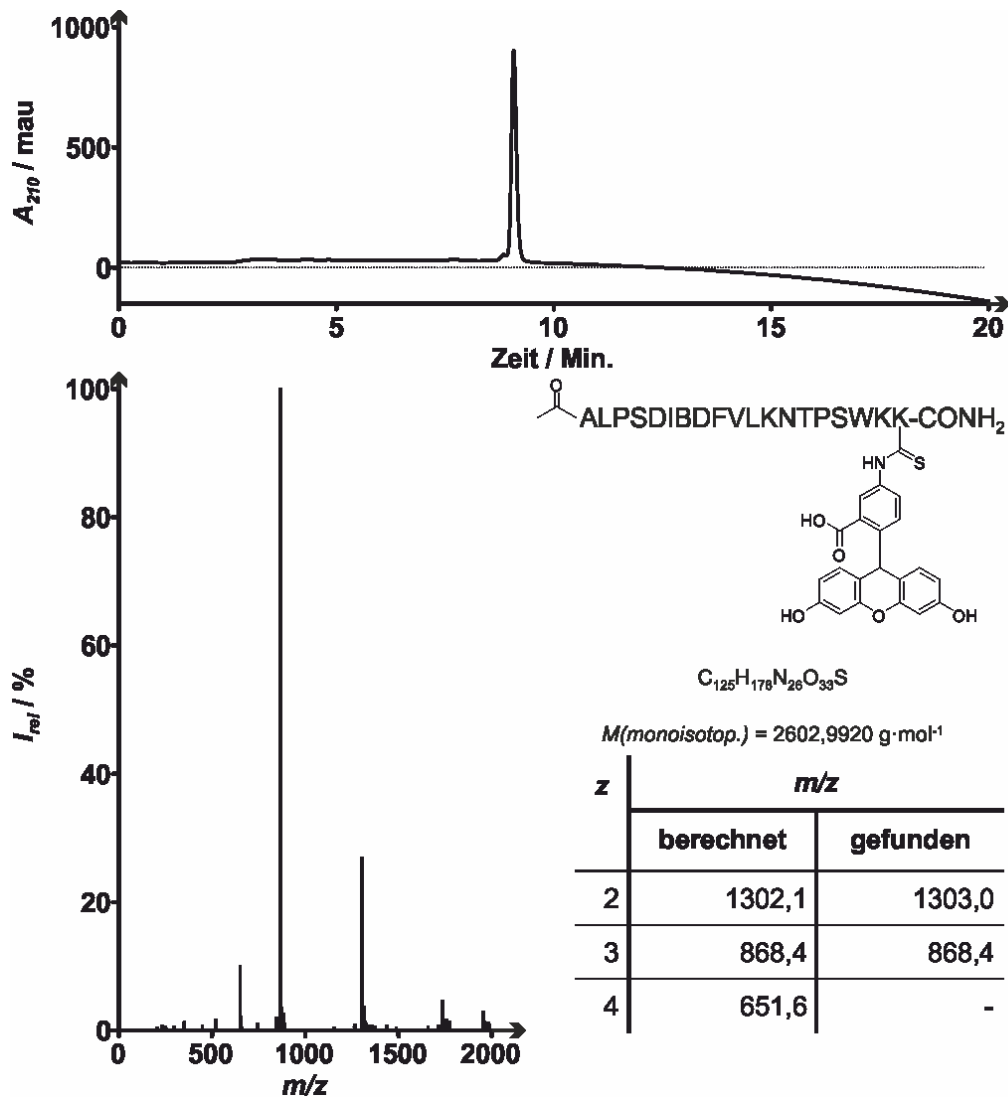


Abbildung A43: Analytische HPLC-MS Messung mit UV/Vis-Detektion des Liganden **H-L(A2844)-f**. Oben: Chromatogramm der HPLC bei 210 nm (Gradient: 30–95% des HPLC-Lösungsmittels B gegen das HPLC-Lösungsmittel A in 20 Min.). Unten: Massenspektrum des höchsten Signalaussschlags aus dem HPLC-Chromatogramm mit berechneten und gefundenen m/z -Werten.

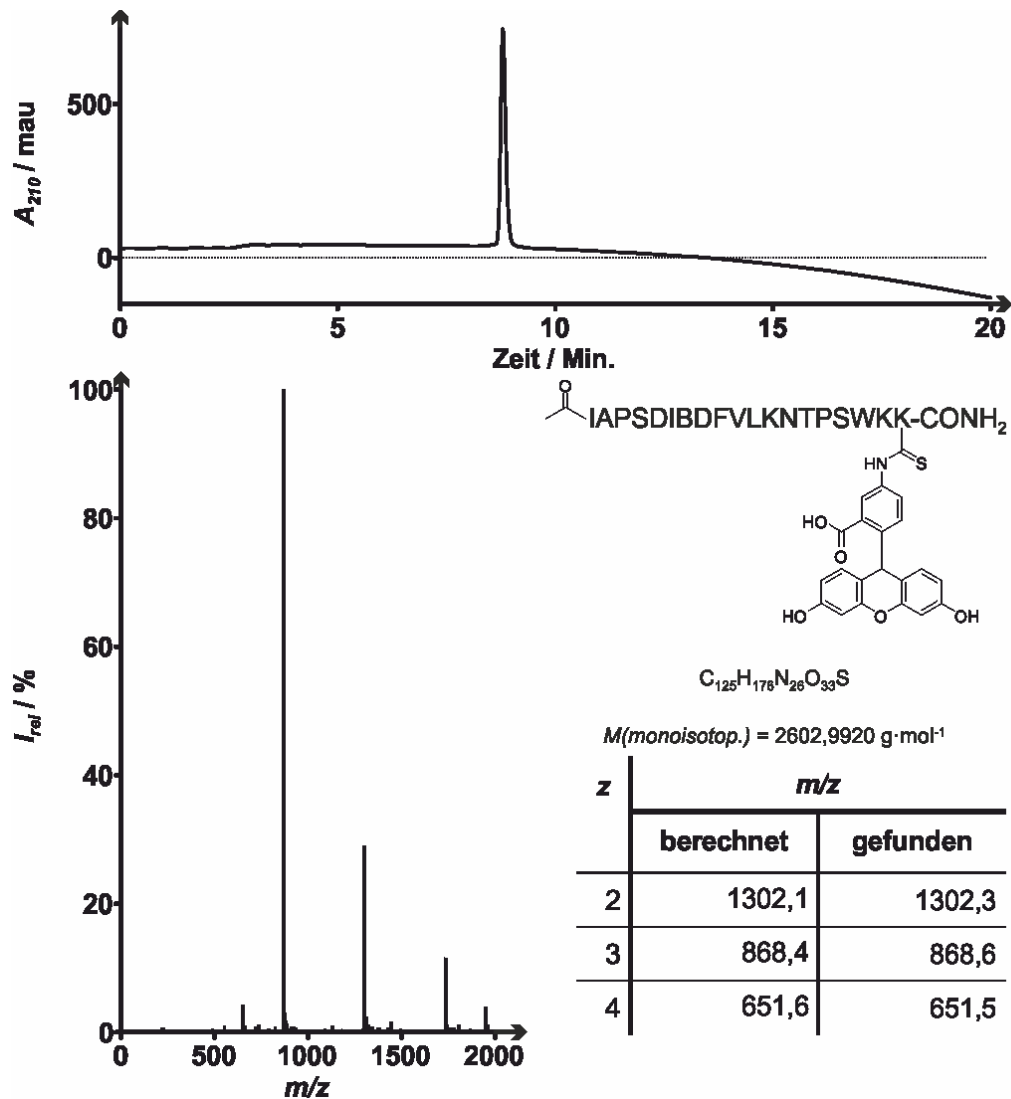


Abbildung A44: Analytische HPLC-MS Messung mit UV/Vis-Detektion des Liganden **H-L(A2845)-f**. Oben: Chromatogramm der HPLC bei 210 nm (Gradient: 30–95% des HPLC-Lösungsmittels B gegen das HPLC-Lösungsmittel A in 20 Min.). Unten: Massenspektrum des höchsten Signalausgangs aus dem HPLC-Chromatogramm mit berechneten und gefundenen m/z -Werten.

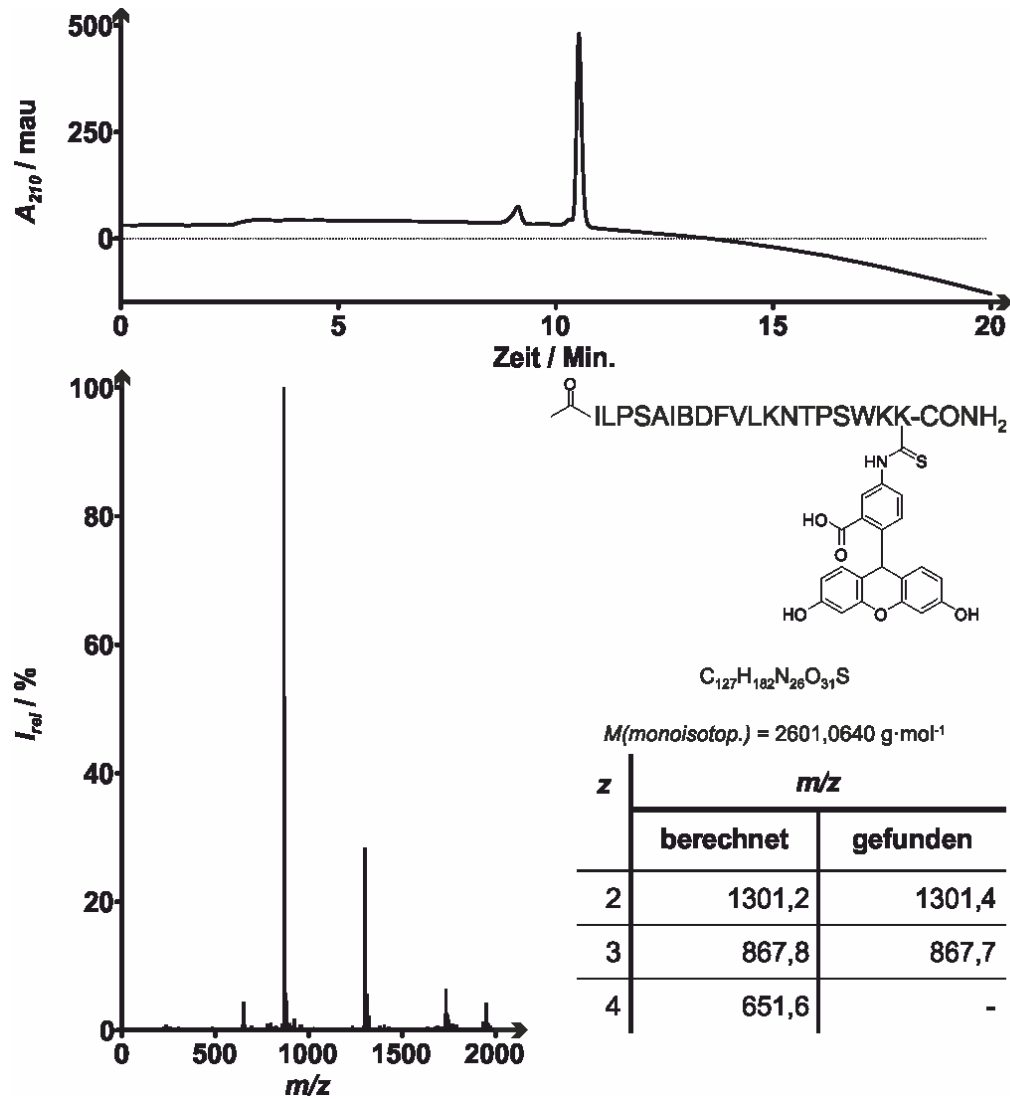


Abbildung A45: Analytische HPLC-MS Messung mit UV/Vis-Detektion des Liganden **H-L(A2848)-f**. Oben: Chromatogramm der HPLC bei 210 nm (Gradient: 30–95% des HPLC-Lösungsmittels B gegen das HPLC-Lösungsmittel A in 20 Min.). Unten: Massenspektrum des höchsten Signalausfalls aus dem HPLC-Chromatogramm mit berechneten und gefundenen m/z -Werten.

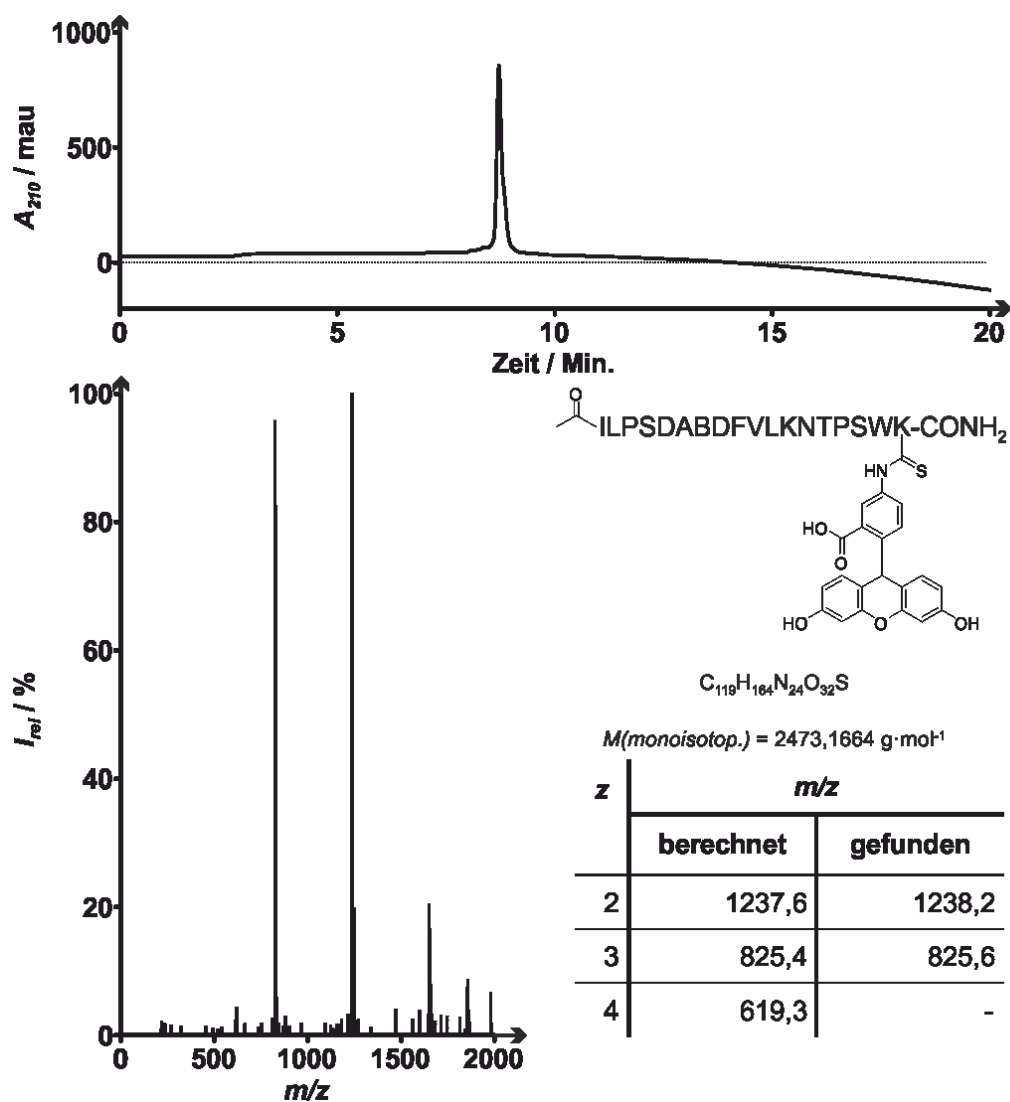


Abbildung A46: Analytische HPLC-MS Messung mit UV/Vis-Detektion des Liganden **H-L(A2849)-f**. Oben: Chromatogramm der HPLC bei 210 nm (Gradient: 30–95% des HPLC-Lösungsmittels B gegen das HPLC-Lösungsmittel A in 20 Min.). Unten: Massenspektrum des höchsten Signalausgangs aus dem HPLC-Chromatogramm mit berechneten und gefundenen m/z -Werten.

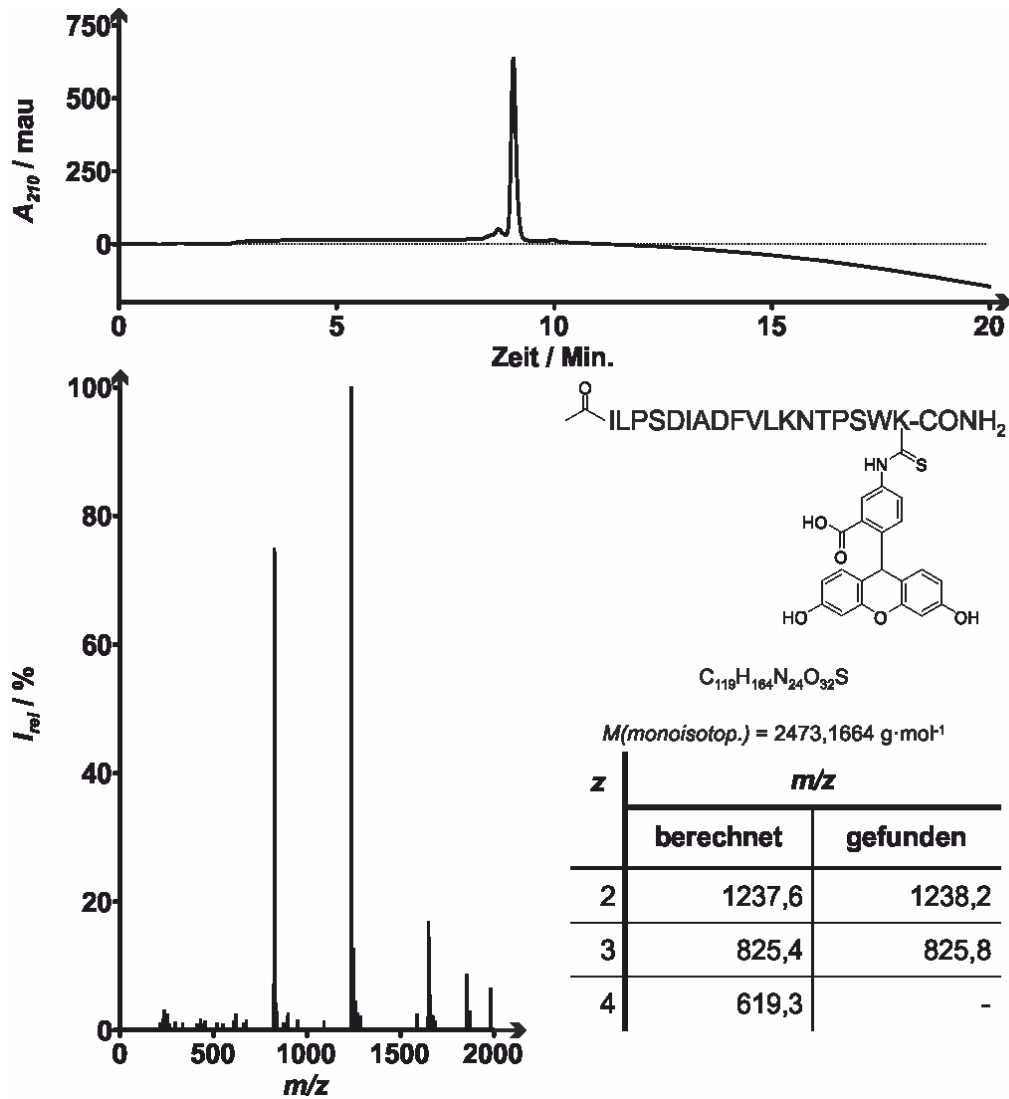


Abbildung A47: Analytische HPLC-MS Messung mit UV/Vis-Detektion des Liganden **H-L(A2850)-f**. Oben: Chromatogramm der HPLC bei 210 nm (Gradient: 30–95% des HPLC-Lösungsmittels B gegen das HPLC-Lösungsmittel A in 20 Min.). Unten: Massenspektrum des höchsten Signalausfalls aus dem HPLC-Chromatogramm mit berechneten und gefundenen m/z -Werten.

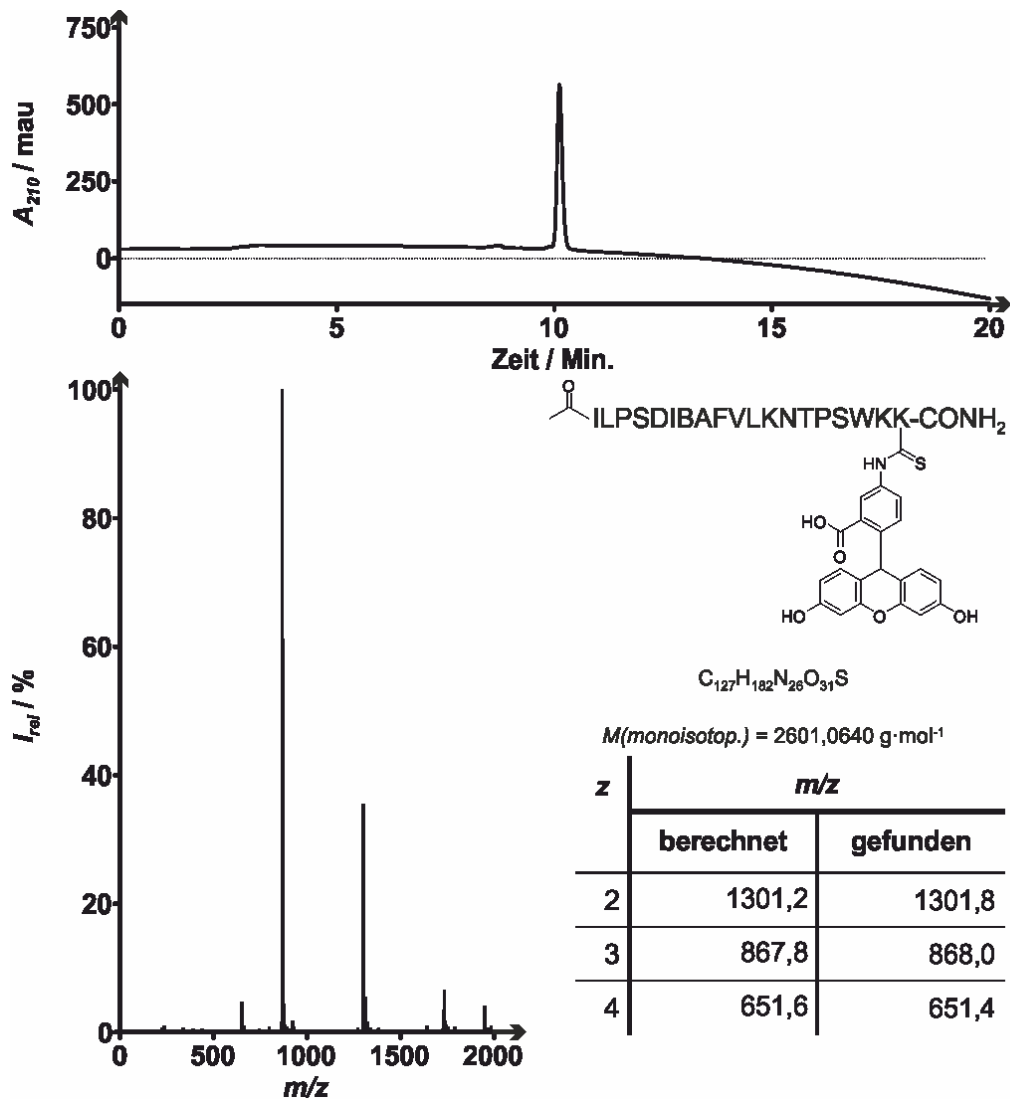


Abbildung A48: Analytische HPLC-MS Messung mit UV/Vis-Detektion des Liganden **H-L(A2851)-f**. Oben: Chromatogramm der HPLC bei 210 nm (Gradient: 30–95% des HPLC-Lösungsmittels B gegen das HPLC-Lösungsmittel A in 20 Min.). Unten: Massenspektrum des höchsten Signalausgangs aus dem HPLC-Chromatogramm mit berechneten und gefundenen m/z -Werten.

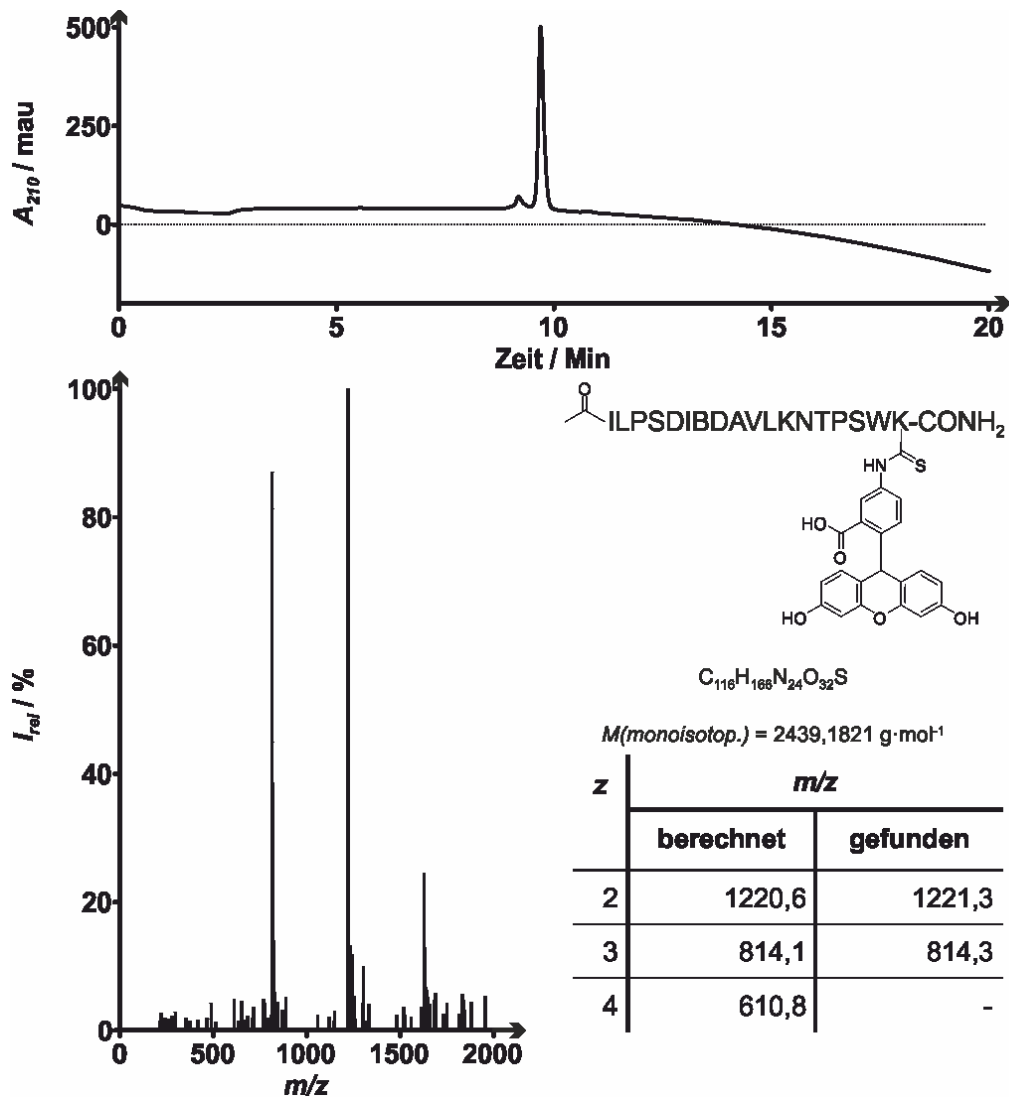


Abbildung A49: Analytische HPLC-MS Messung mit UV/Vis-Detektion des Liganden **H-L(A2852)-f**. Oben: Chromatogramm der HPLC bei 210 nm (Gradient: 30–95% des HPLC-Lösungsmittels B gegen das HPLC-Lösungsmittel A in 20 Min.). Unten: Massenspektrum des höchsten Signalaussschlags aus dem HPLC-Chromatogramm mit berechneten und gefundenen m/z -Werten.

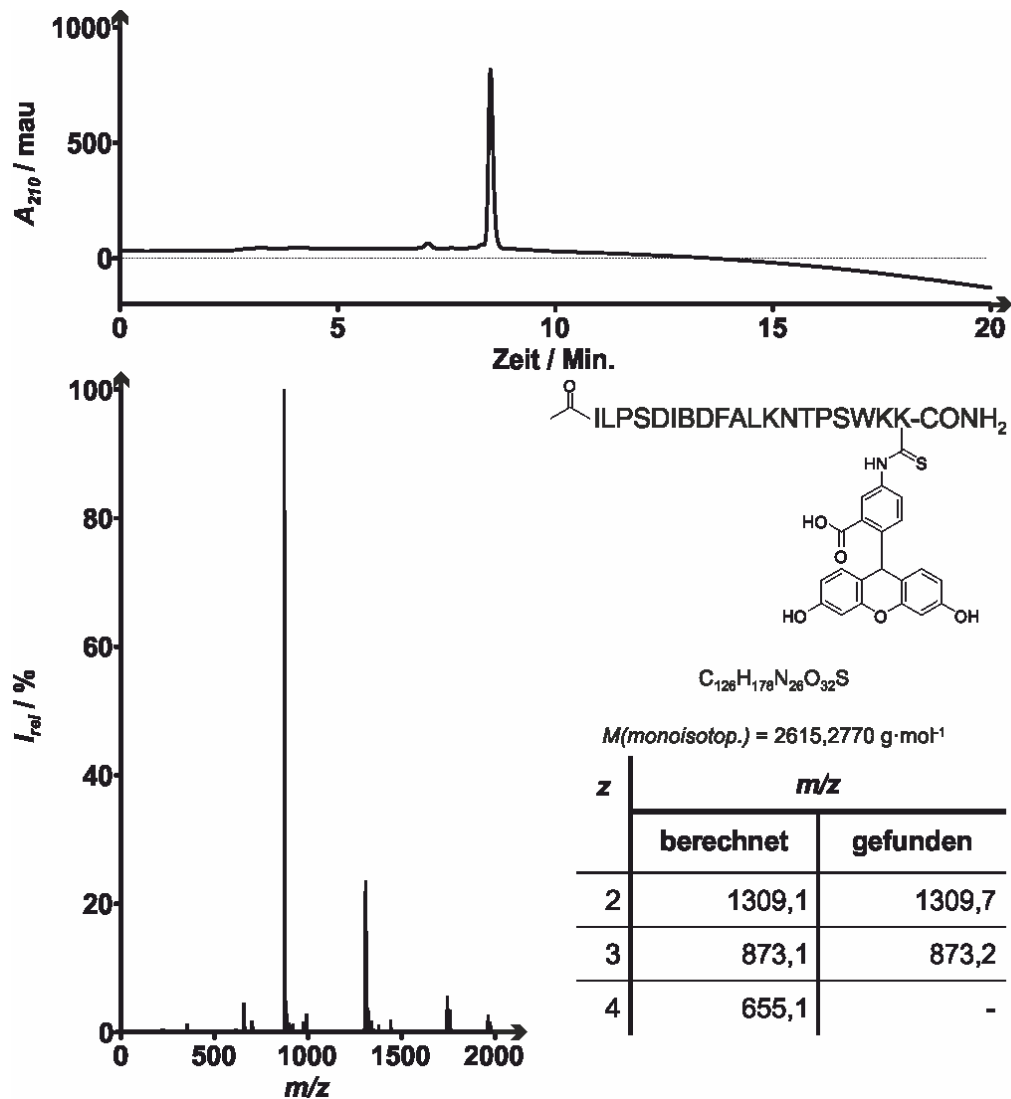


Abbildung A50: Analytische HPLC-MS Messung mit UV/Vis-Detektion des Liganden **H-L(A2853)-f**. Oben: Chromatogramm der HPLC bei 210 nm (Gradient: 30–95% des HPLC-Lösungsmittels B gegen das HPLC-Lösungsmittel A in 20 Min.). Unten: Massenspektrum des höchsten Signalausgangs aus dem HPLC-Chromatogramm mit berechneten und gefundenen m/z -Werten.

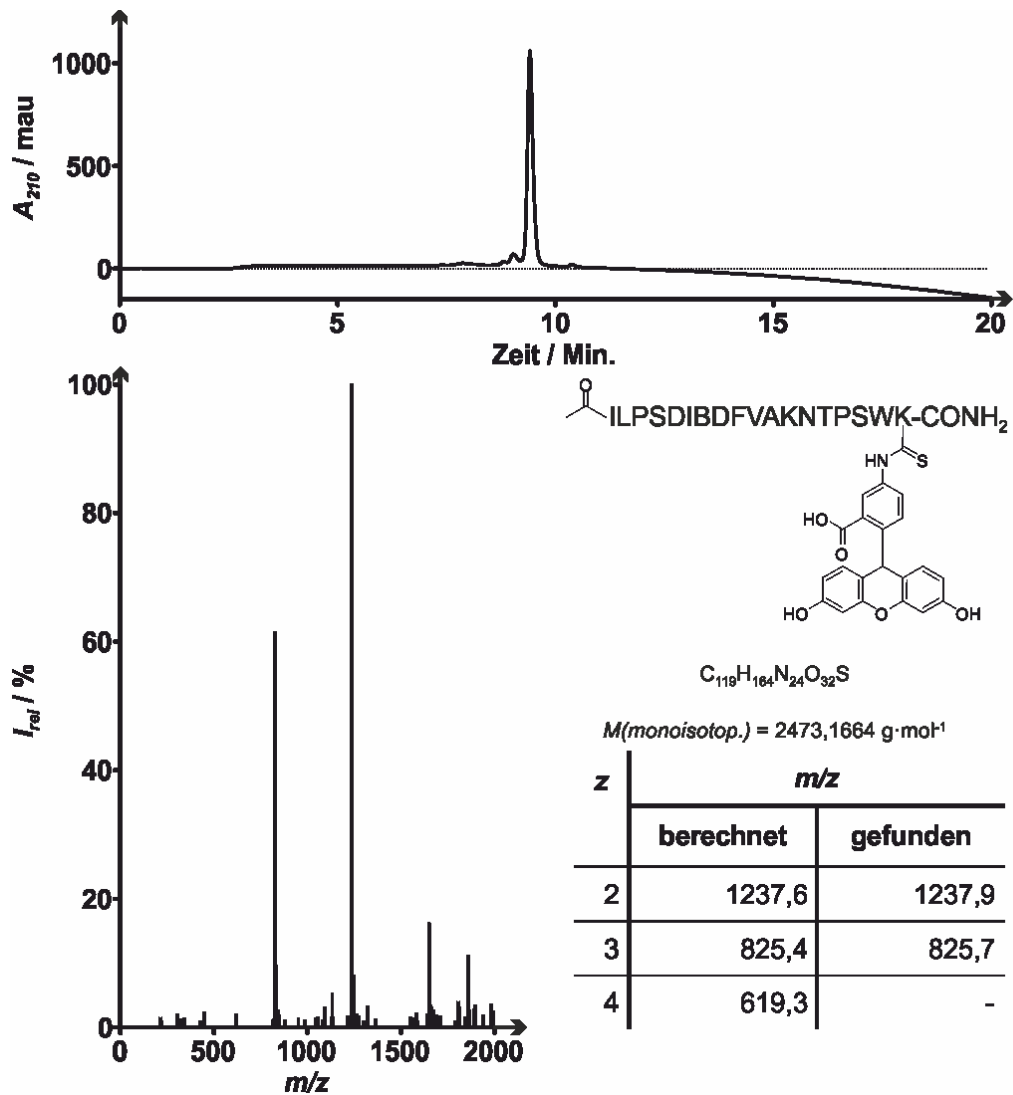


Abbildung A51: Analytische HPLC-MS Messung mit UV/Vis-Detektion des Liganden **H-L(A2854)-f**. Oben: Chromatogramm der HPLC bei 210 nm (Gradient: 30–95% des HPLC-Lösungsmittels B gegen das HPLC-Lösungsmittel A in 20 Min.). Unten: Massenspektrum des höchsten Signalausfalls aus dem HPLC-Chromatogramm mit berechneten und gefundenen m/z -Werten.

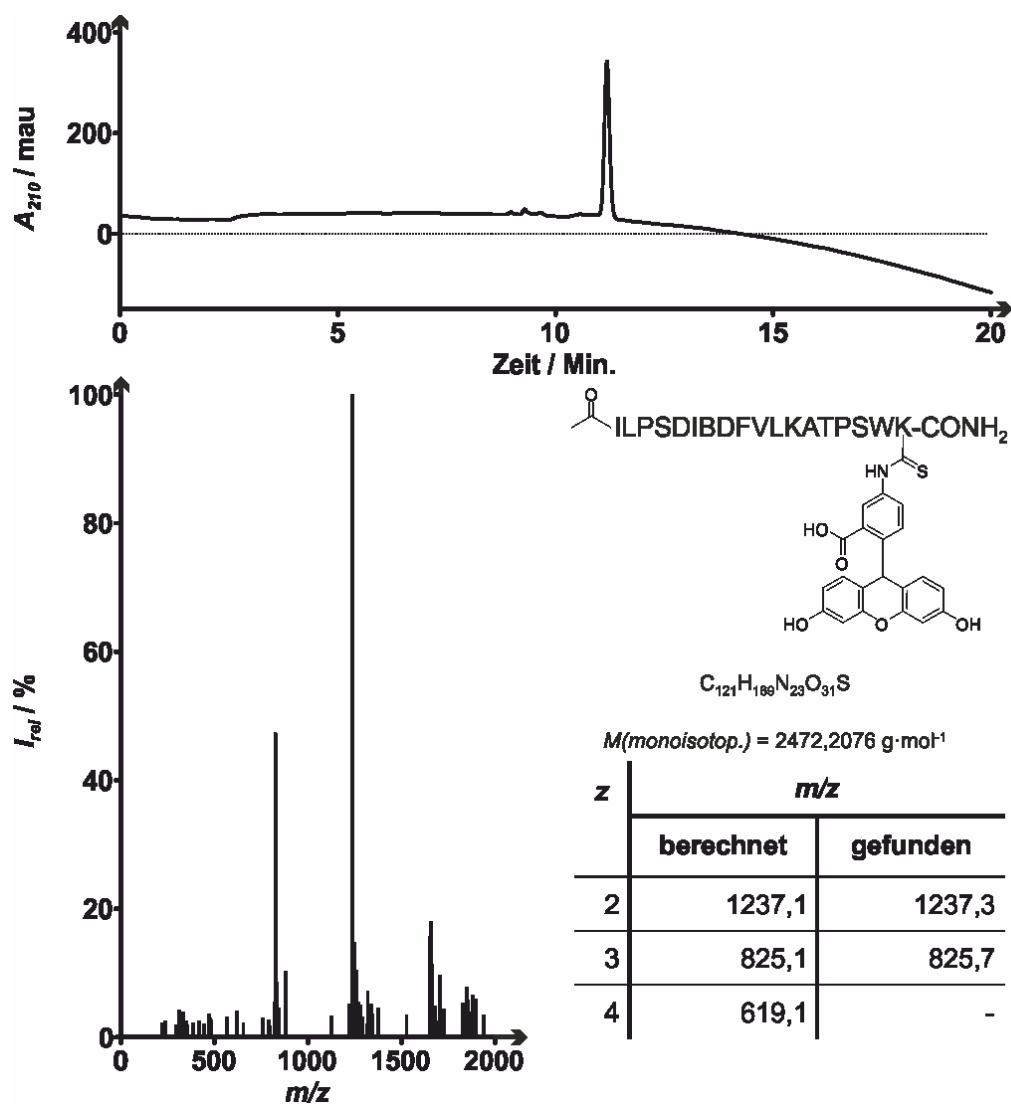


Abbildung A52: Analytische HPLC-MS Messung mit UV/Vis-Detektion des Liganden **H-L(A2856)-f**. Oben: Chromatogramm der HPLC bei 210 nm (Gradient: 30–95% des HPLC-Lösungsmittels B gegen das HPLC-Lösungsmittel A in 20 Min.). Unten: Massenspektrum des höchsten Signalausgangs aus dem HPLC-Chromatogramm mit berechneten und gefundenen m/z -Werten.

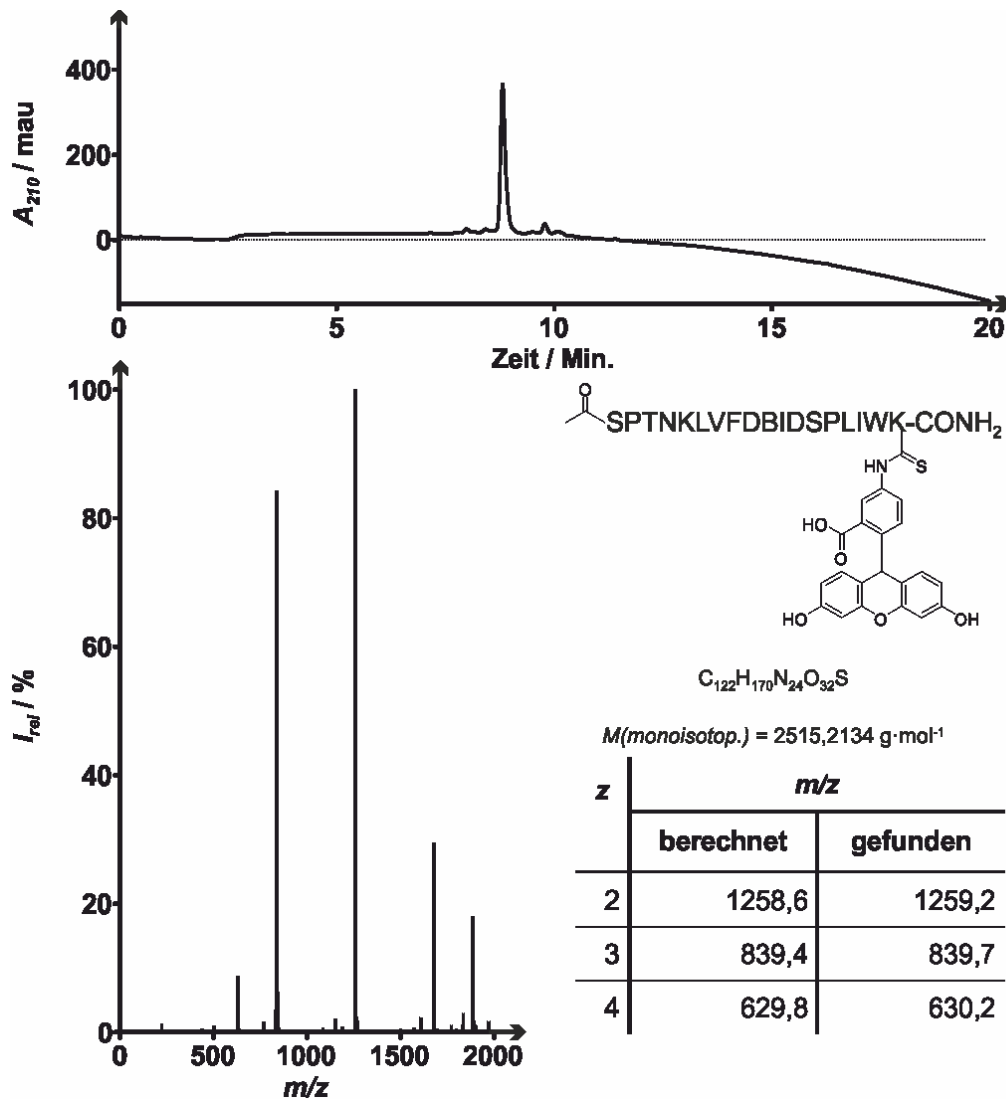


Abbildung A53: Analytische HPLC-MS Messung mit UV/Vis-Detektion des Liganden **H-iL-f**. Oben: Chromatogramm der HPLC bei 210 nm (Gradient: 30–95% des HPLC-Lösungsmittels B gegen das HPLC-Lösungsmittel A in 20 Min.). Unten: Massenspektrum des höchsten Signalausfalls aus dem HPLC-Chromatogramm mit berechneten und gefundenen m/z -Werten.

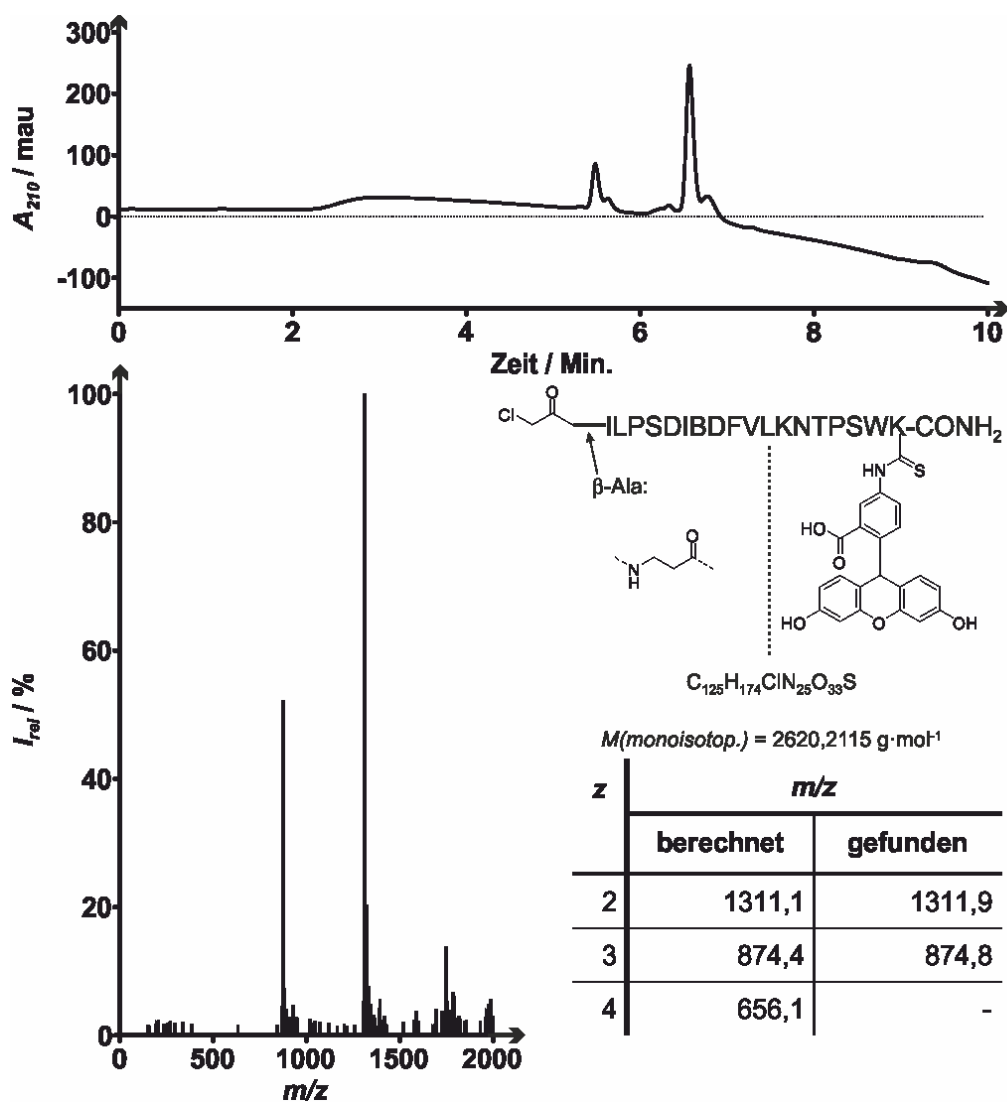


Abbildung A54: Analytische HPLC-MS Messung mit UV/Vis-Detektion des Liganden CI-4L-f. Oben: Chromatogramm der HPLC bei 210 nm (Gradient: 30–95% des HPLC-Lösungsmittels B gegen das HPLC-Lösungsmittel A in 10 Min.). Unten: Massenspektrum des höchsten Signalausgangs aus dem HPLC-Chromatogramm mit berechneten und gefundenen m/z -Werten.

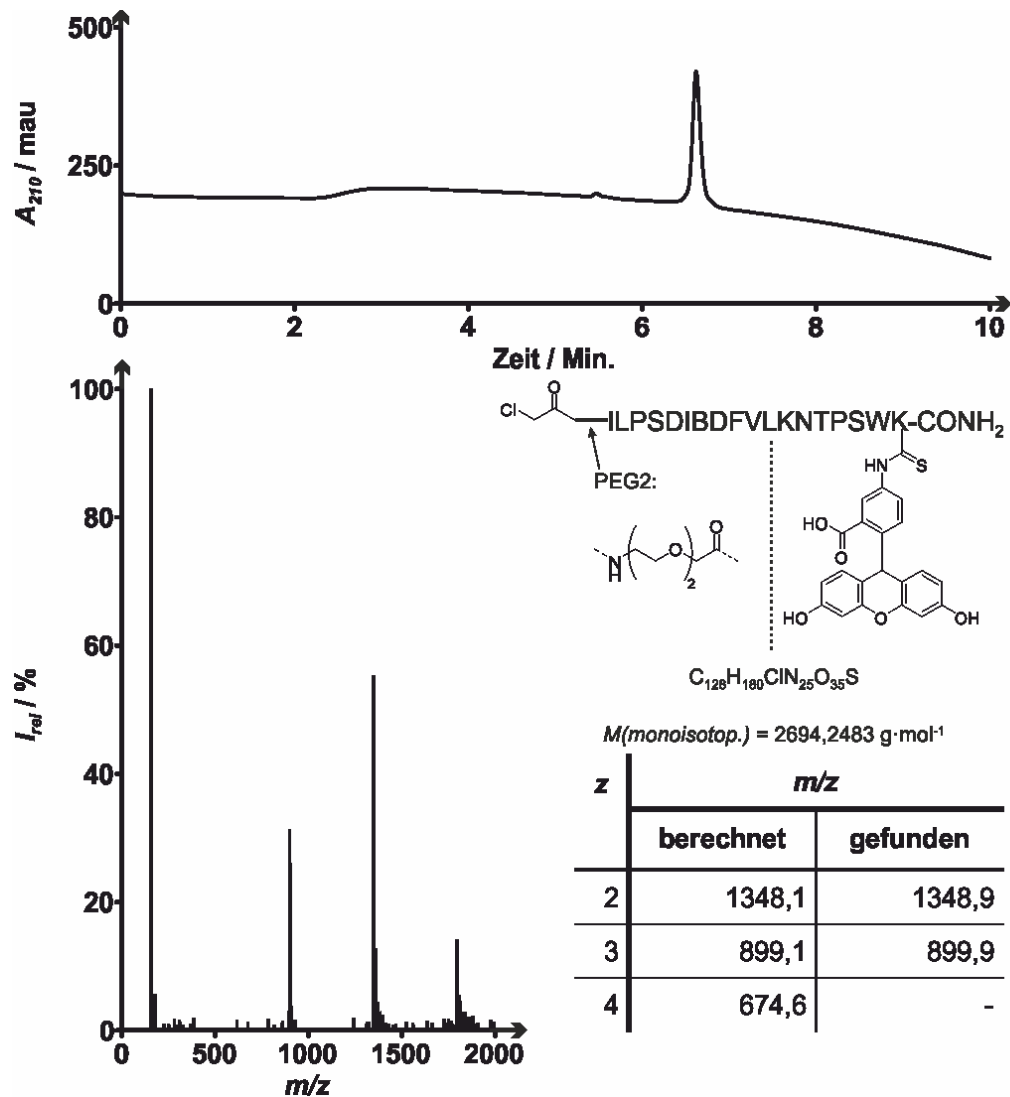


Abbildung A55: Analytische HPLC-MS Messung mit UV/Vis-Detektion des Liganden CI-9L-f. Oben: Chromatogramm der HPLC bei 210 nm (Gradient: 30–95% des HPLC-Lösungsmittels B gegen das HPLC-Lösungsmittel A in 10 Min.). Unten: Massenspektrum des höchsten Signalausfalls aus dem HPLC-Chromatogramm mit berechneten und gefundenen m/z -Werten.

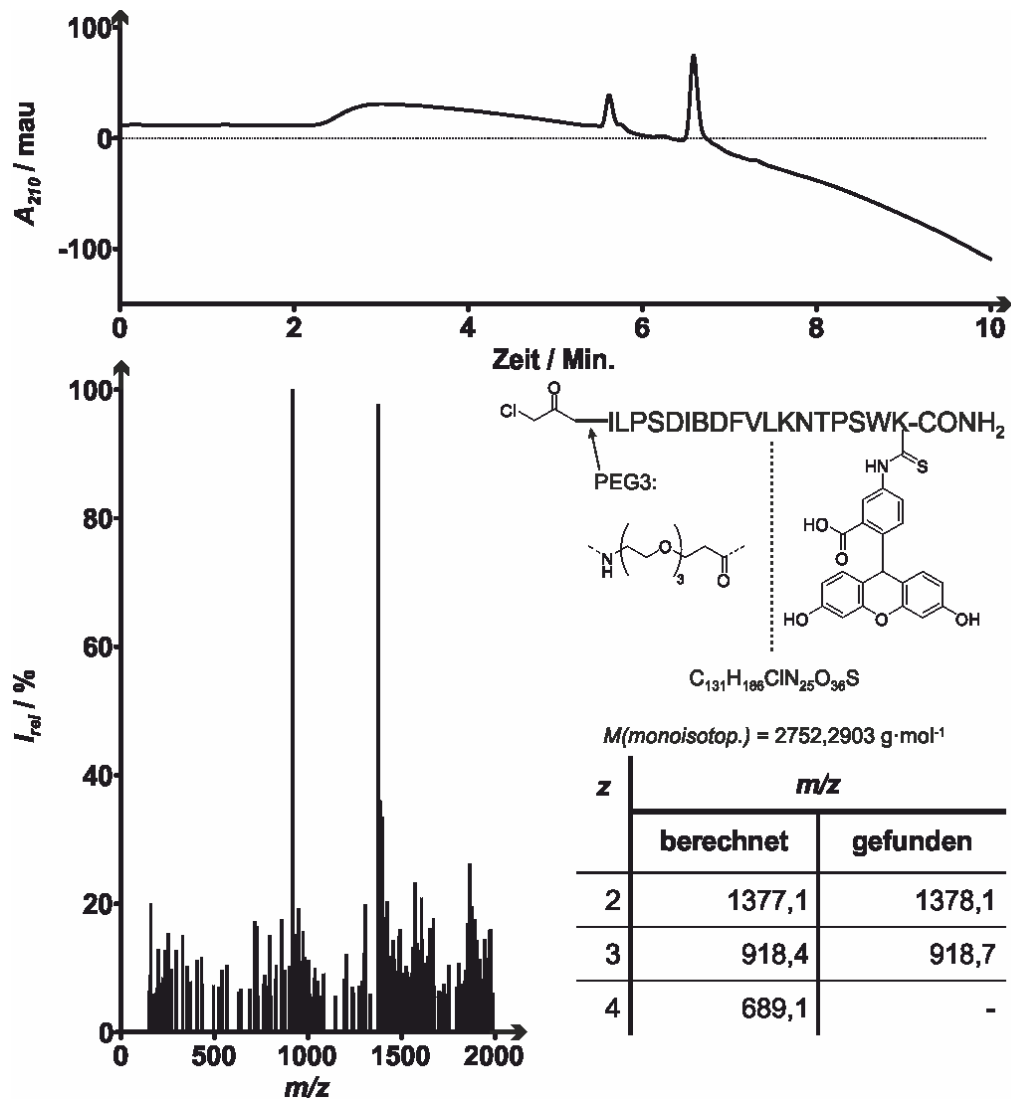


Abbildung A56: Analytische HPLC-MS Messung mit UV/Vis-Detektion des Liganden **Cl-13L-f**. Oben: Chromatogramm der HPLC bei 210 nm (Gradient: 30–95% des HPLC-Lösungsmittels B gegen das HPLC-Lösungsmittel A in 10 Min.). Unten: Massenspektrum des höchsten Signalausgangs aus dem HPLC-Chromatogramm mit berechneten und gefundenen m/z -Werten.

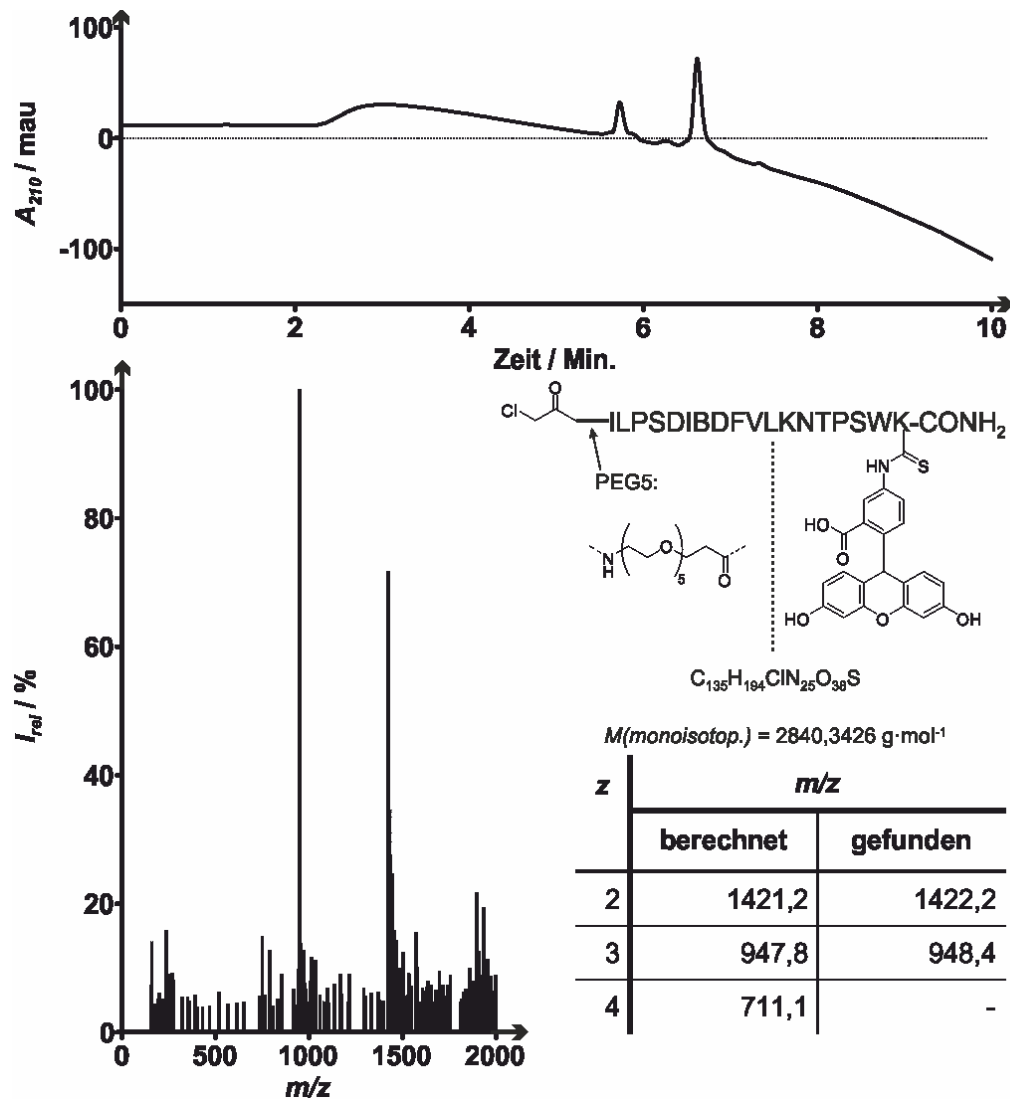


Abbildung A57: Analytische HPLC-MS Messung mit UV/Vis-Detektion des Liganden **CI-19L-f**. Oben: Chromatogramm der HPLC bei 210 nm (Gradient: 30–95% des HPLC-Lösungsmittels B gegen das HPLC-Lösungsmittel A in 10 Min.). Unten: Massenspektrum des höchsten Signalausfalls aus dem HPLC-Chromatogramm mit berechneten und gefundenen m/z -Werten.

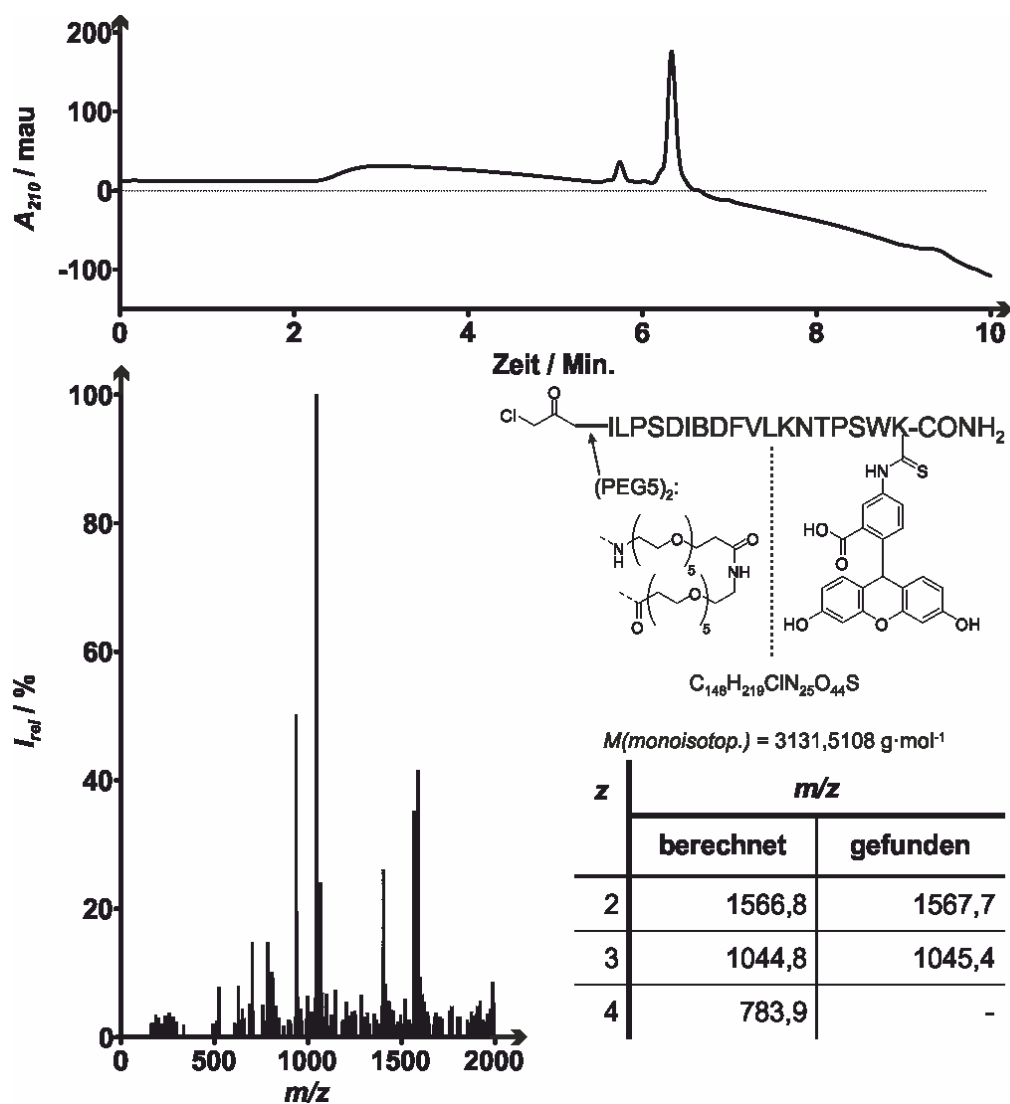


Abbildung A58: Analytische HPLC-MS Messung mit UV/Vis-Detektion des Liganden **CI-38L-f**. Oben: Chromatogramm der HPLC bei 210 nm (Gradient: 30–95% des HPLC-Lösungsmittels B gegen das HPLC-Lösungsmittel A in 10 Min.). Unten: Massenspektrum des höchsten Signalausgangs aus dem HPLC-Chromatogramm mit berechneten und gefundenen m/z -Werten.

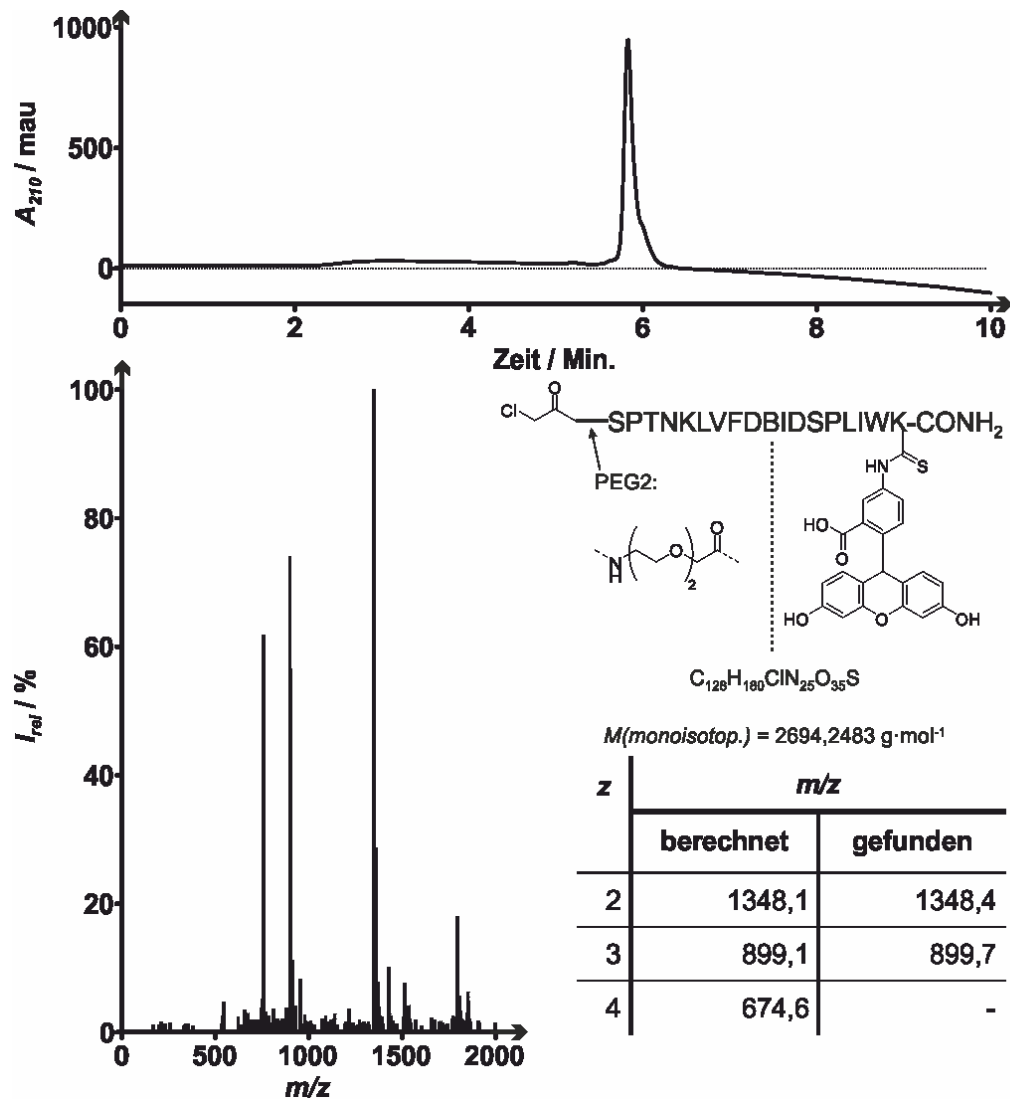


Abbildung A59: Analytische HPLC-MS Messung mit UV/Vis-Detektion des Liganden **Cl-9iL-f**. Oben: Chromatogramm der HPLC bei 210 nm (Gradient: 30–95% des HPLC-Lösungsmittels B gegen das HPLC-Lösungsmittel A in 10 Min.). Unten: Massenspektrum des höchsten Signalausfalls aus dem HPLC-Chromatogramm mit berechneten und gefundenen m/z -Werten.

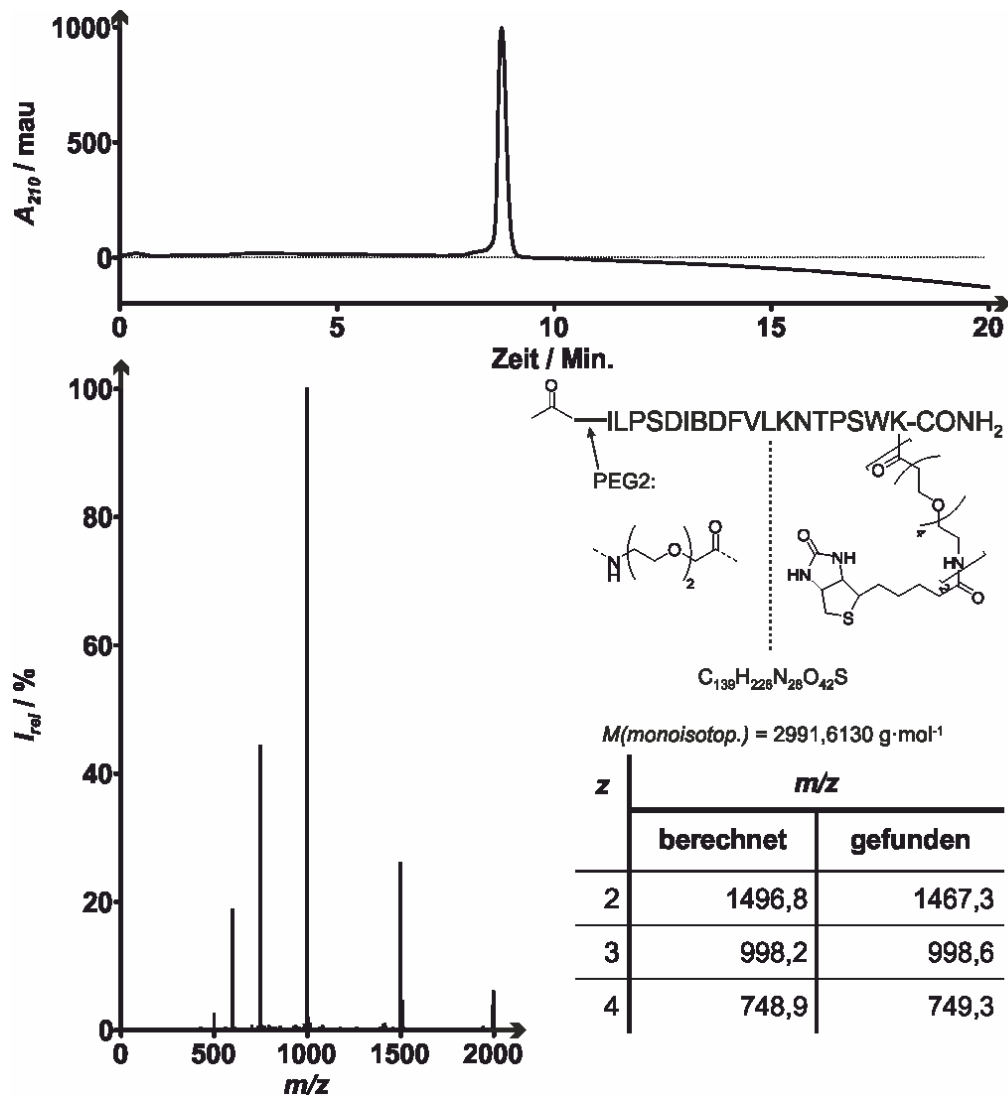


Abbildung A60: Analytische HPLC-MS Messung mit UV/Vis-Detektion des Liganden **H-9L-b**. Oben: Chromatogramm der HPLC bei 210 nm (Gradient: 30–90% des HPLC-Lösungsmittels B gegen das HPLC-Lösungsmittel A in 20 Min.). Unten: Massenspektrum des höchsten Signalausgangs aus dem HPLC-Chromatogramm mit berechneten und gefundenen m/z -Werten.

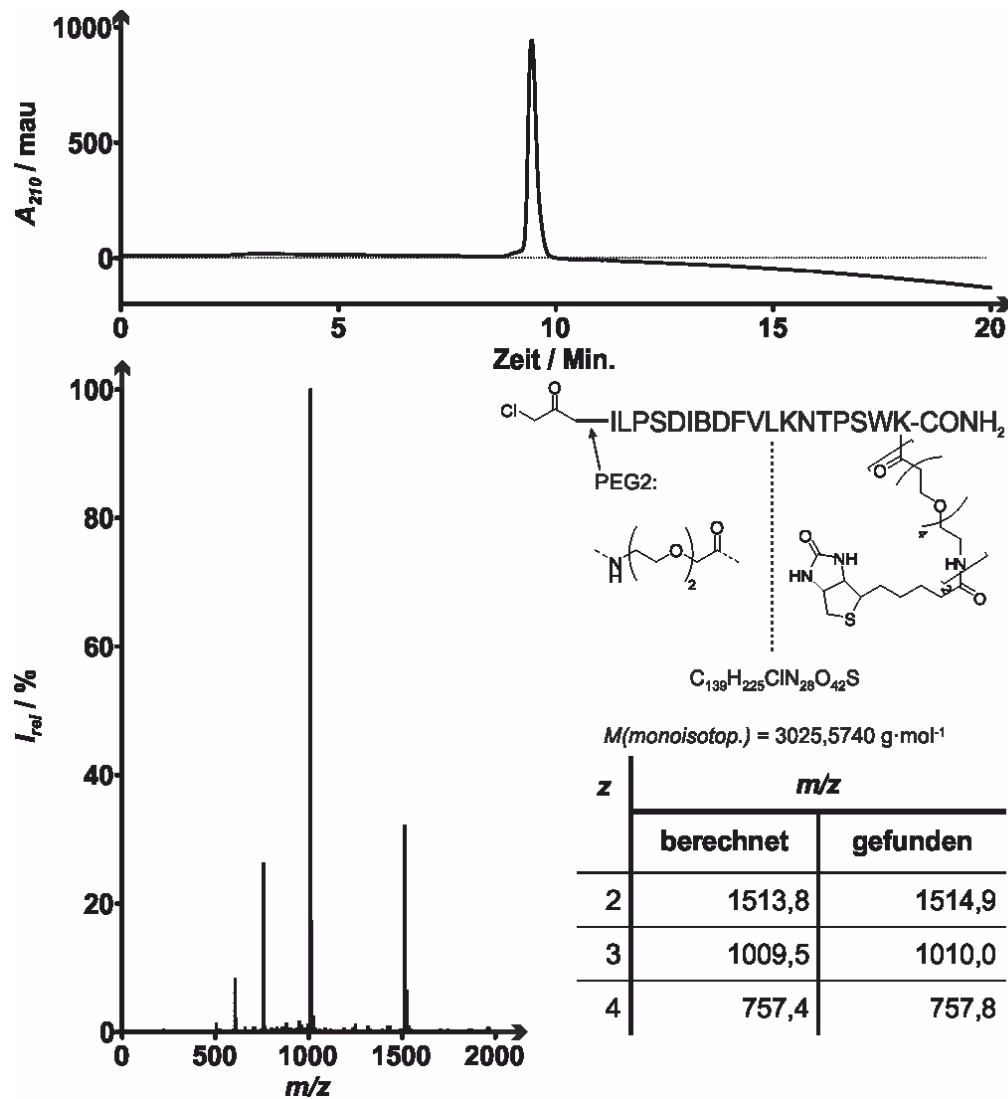


Abbildung A61: Analytische HPLC-MS Messung mit UV/Vis-Detektion des Liganden **Cl-9L-b**. Oben: Chromatogramm der HPLC bei 210 nm (Gradient: 30–90% des HPLC-Lösungsmittels B gegen das HPLC-Lösungsmittel A in 20 Min.). Unten: Massenspektrum des höchsten Signalausfalls aus dem HPLC-Chromatogramm mit berechneten und gefundenen m/z -Werten.

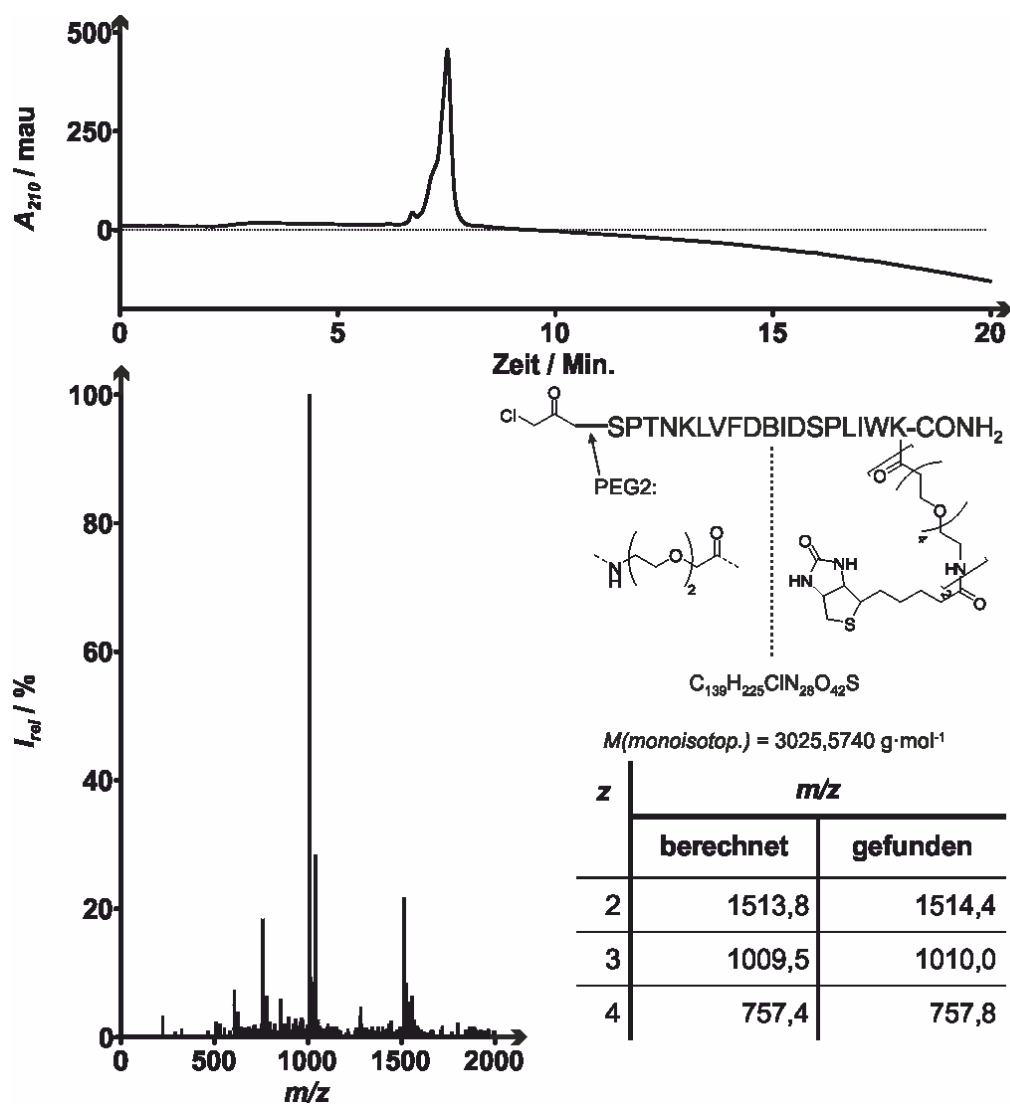


Abbildung A62: Analytische HPLC-MS Messung mit UV/Vis-Detektion des Liganden **Cl-9iL-b**. Oben: Chromatogramm der HPLC bei 210 nm (Gradient: 30–90% des HPLC-Lösungsmittels B gegen das HPLC-Lösungsmittel A in 20 Min.). Unten: Massenspektrum des höchsten Signalausgangs aus dem HPLC-Chromatogramm mit berechneten und gefundenen m/z -Werten.

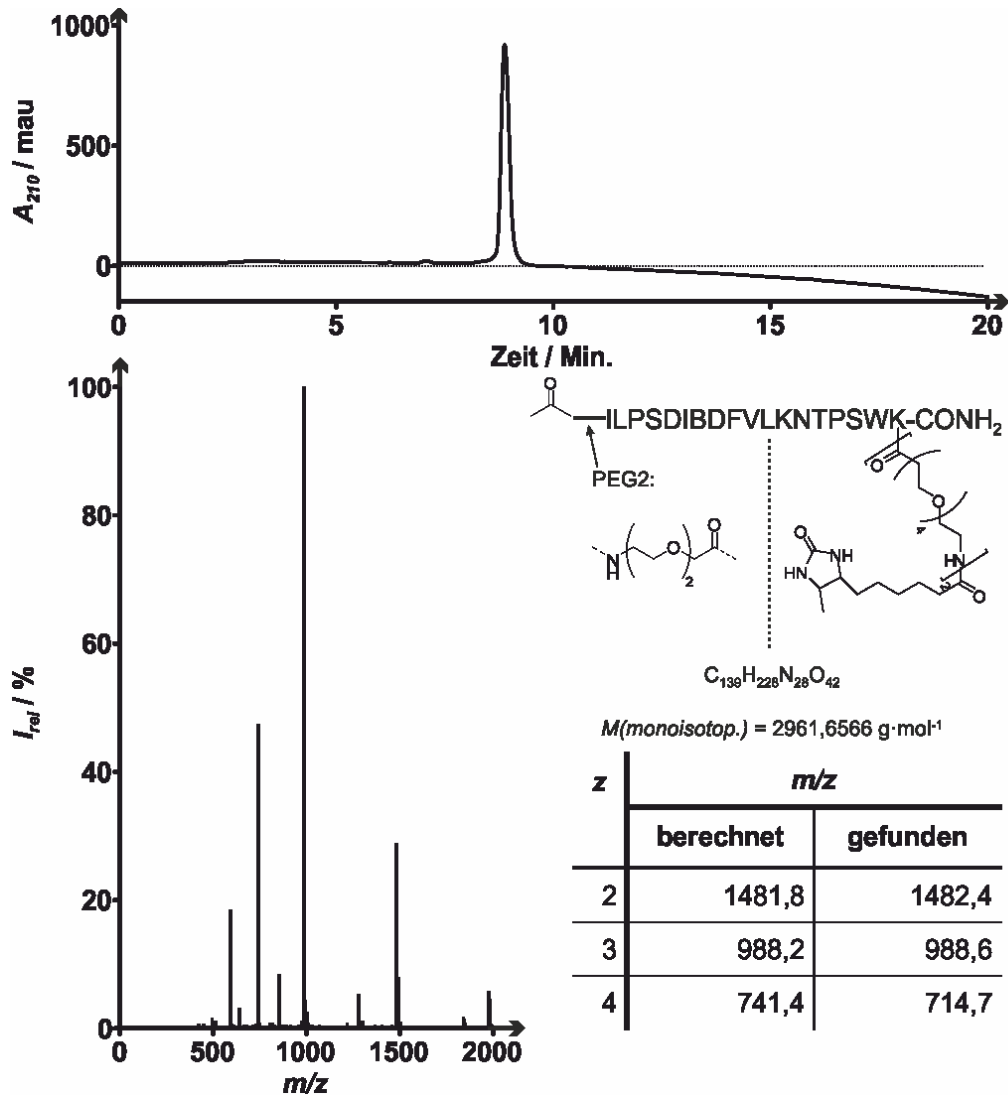


Abbildung A63: Analytische HPLC-MS Messung mit UV/Vis-Detektion des Liganden **H-9L-dtb**. Oben: Chromatogramm der HPLC bei 210 nm (Gradient: 30–90% des HPLC-Lösungsmittels B gegen das HPLC-Lösungsmittel A in 20 Min.). Unten: Massenspektrum des höchsten Signalausfalls aus dem HPLC-Chromatogramm mit berechneten und gefundenen m/z -Werten.

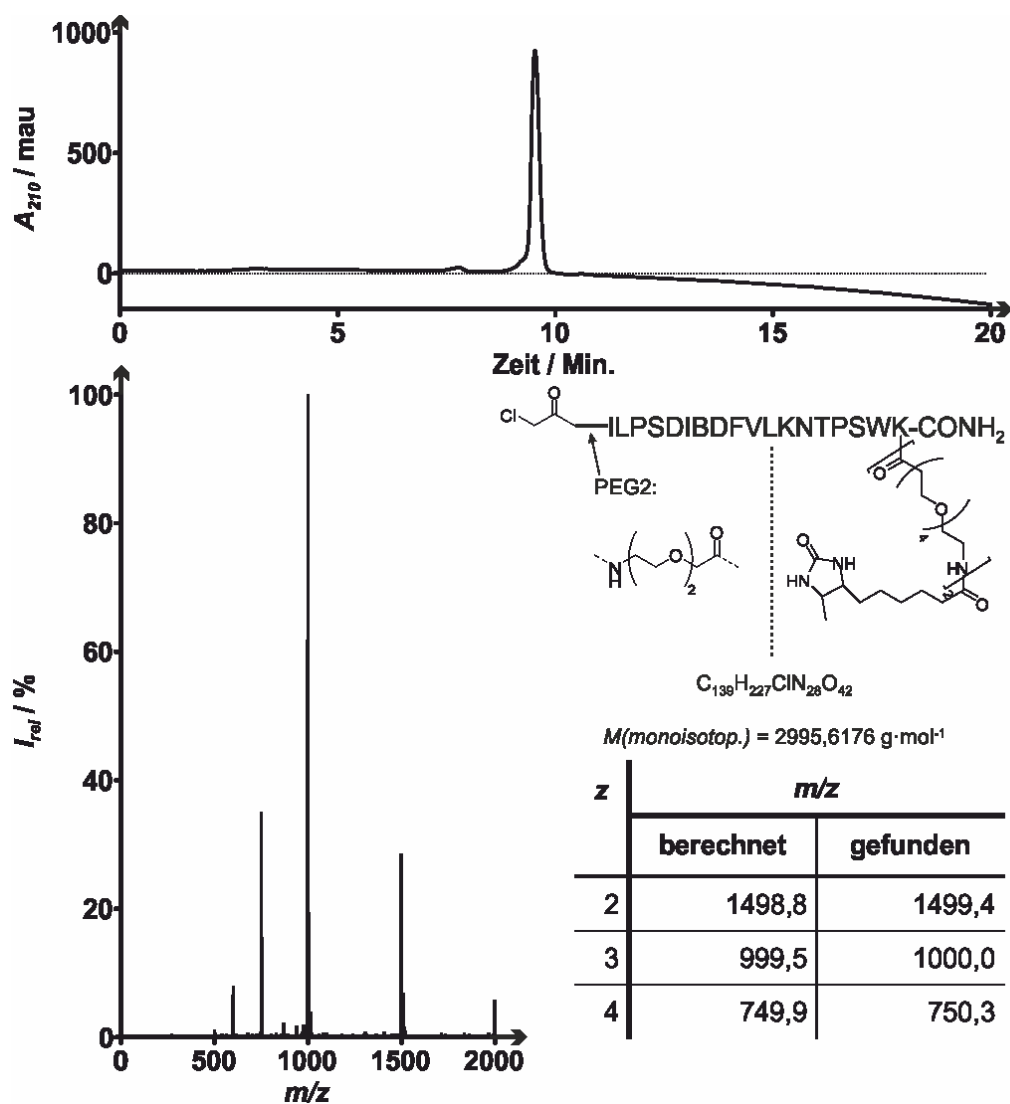


Abbildung A64: Analytische HPLC-MS Messung mit UV/Vis-Detektion des Liganden **Cl-9L-dtb**. Oben: Chromatogramm der HPLC bei 210 nm (Gradient: 30–90% des HPLC-Lösungsmittels B gegen das HPLC-Lösungsmittel A in 20 Min.). Unten: Massenspektrum des höchsten Signalausgangs aus dem HPLC-Chromatogramm mit berechneten und gefundenen m/z -Werten.

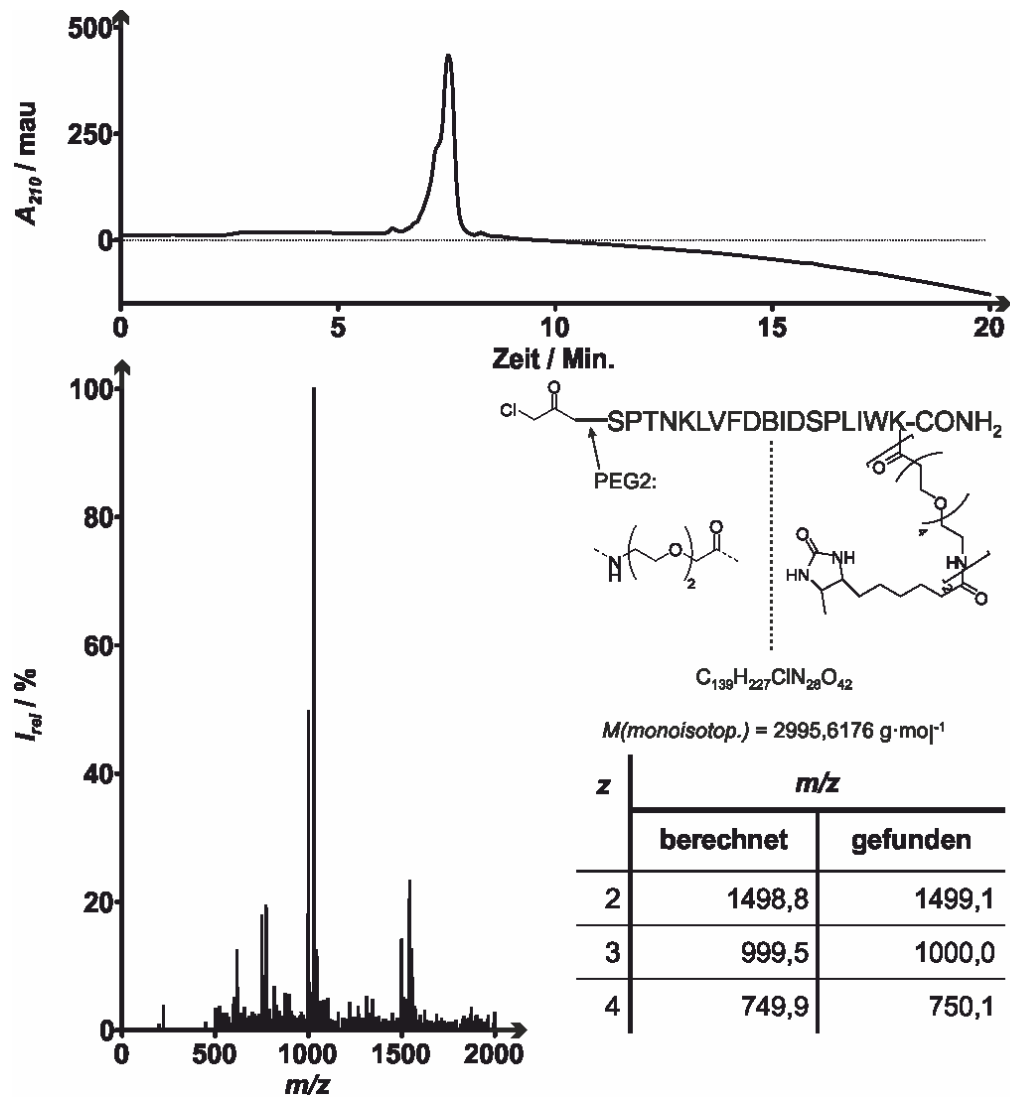


Abbildung A65: Analytische HPLC-MS Messung mit UV/Vis-Detektion des Liganden **Cl-9iL-dtb**. Oben: Chromatogramm der HPLC bei 210 nm (Gradient: 30–90% des HPLC-Lösungsmittels B gegen das HPLC-Lösungsmittel A in 20 Min.). Unten: Massenspektrum des höchsten Signalausgangs aus dem HPLC-Chromatogramm mit berechneten und gefundenen m/z -Werten.

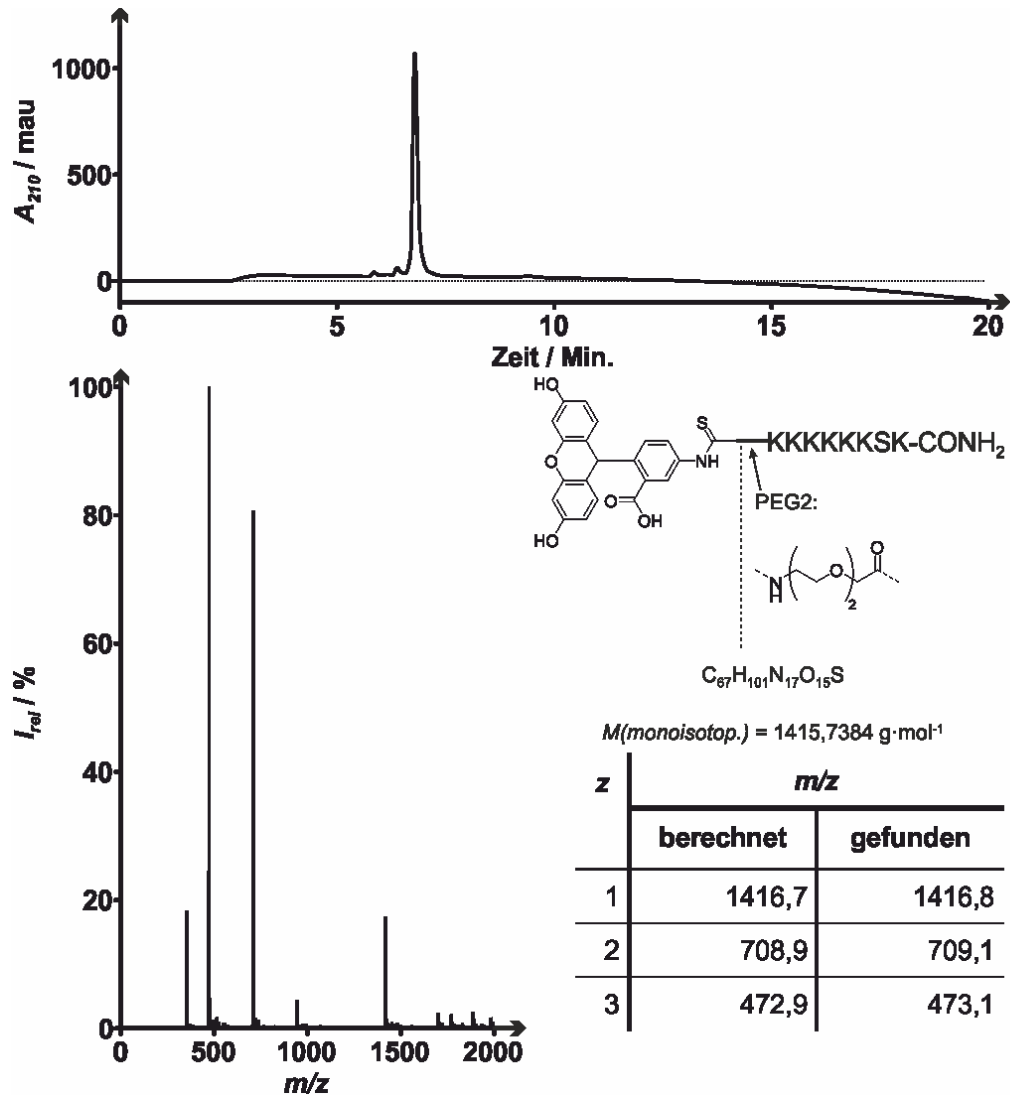


Abbildung A66: Analytische HPLC-MS Messung mit UV/Vis-Detektion der Lokalisationssequenz **f-9NLS**. Oben: Chromatogramm der HPLC bei 210 nm (Gradient: 10–90% des HPLC-Lösungsmittels B gegen das HPLC-Lösungsmittel A in 20 Min.). Unten: Massenspektrum des höchsten Signalausgangs aus dem HPLC-Chromatogramm mit berechneten und gefundenen m/z -Werten.

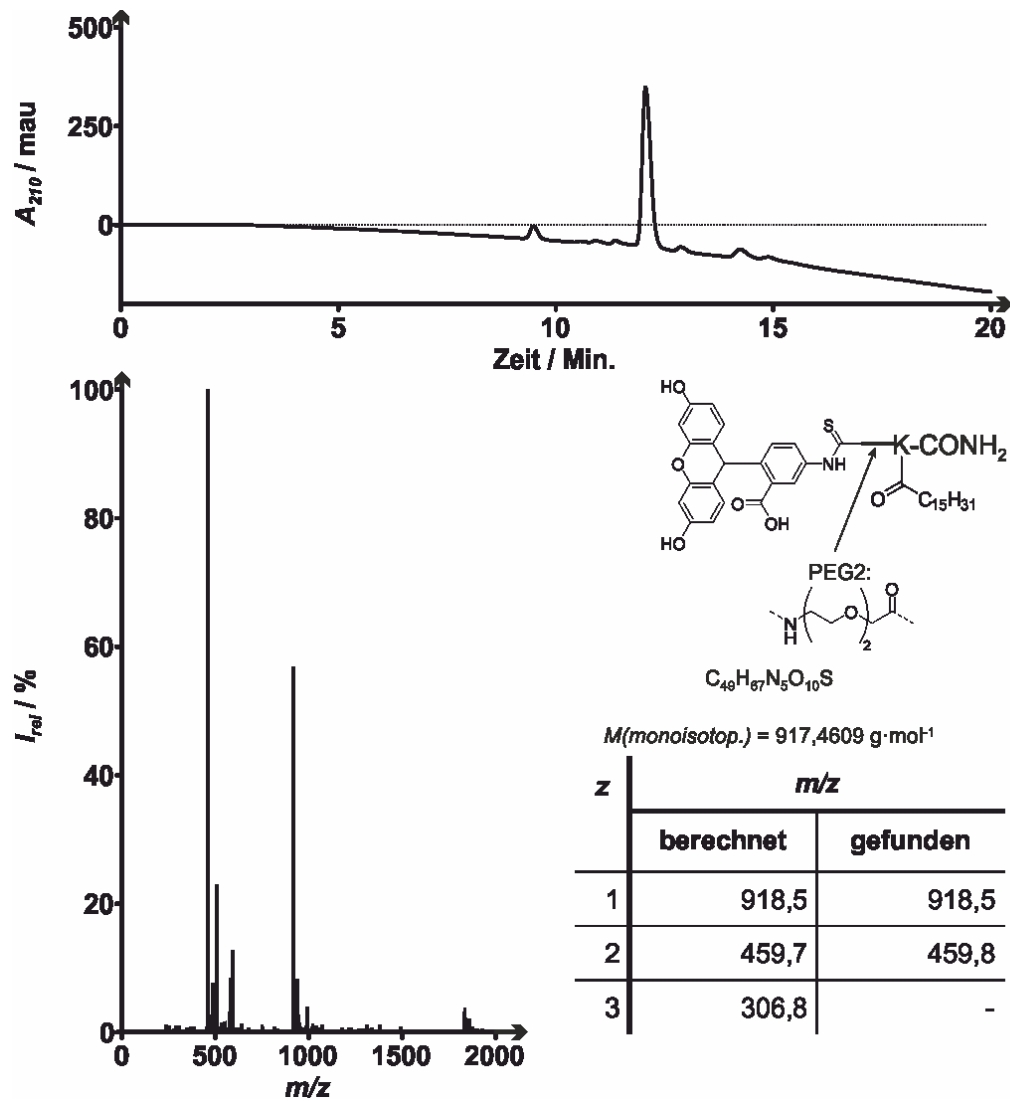


Abbildung A67: Analytische HPLC-MS Messung mit UV/Vis-Detektion der Lokalisationssequenz **f-9MA1**. Oben: Chromatogramm der HPLC bei 210 nm (Gradient: 50–9% des HPLC-Lösungsmittels B gegen das HPLC-Lösungsmittel A in 20 Min.). Unten: Massenspektrum des höchsten Signalausfalls aus dem HPLC-Chromatogramm mit berechneten und gefundenen m/z -Werten.

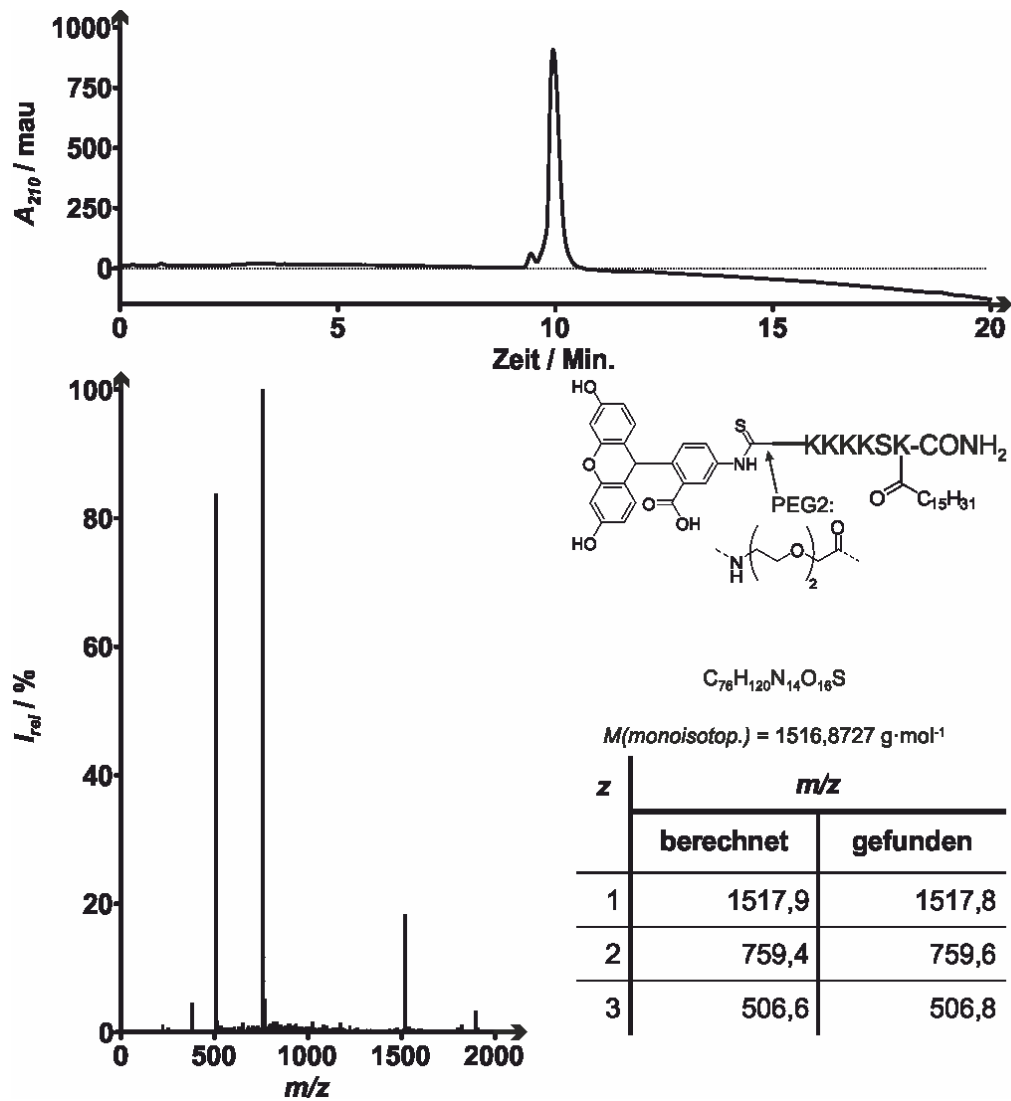


Abbildung A68: Analytische HPLC-MS Messung mit UV/Vis-Detektion der Lokalisationssequenz **f-9MA2**. Oben: Chromatogramm der HPLC bei 210 nm (Gradient: 30–90% des HPLC-Lösungsmittels B gegen das HPLC-Lösungsmittel A in 20 Min.). Unten: Massenspektrum des höchsten Signalausgangs aus dem HPLC-Chromatogramm mit berechneten und gefundenen m/z -Werten.

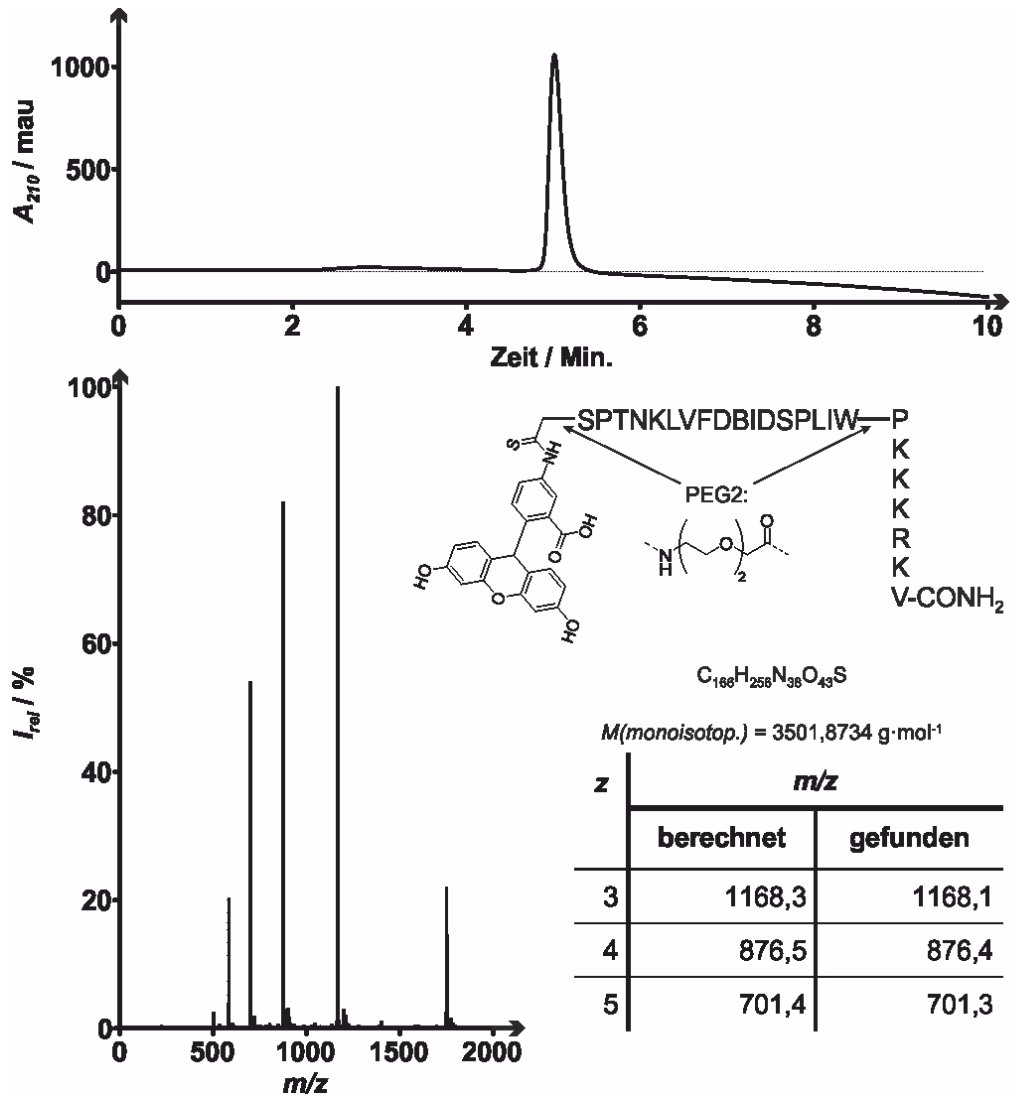


Abbildung A70: Analytische HPLC-MS Messung mit UV/Vis-Detektion des Liganden **f-9L-NLS**. Oben: Chromatogramm der HPLC bei 210 nm (Gradient: 30–95% des HPLC-Lösungsmittels B gegen das HPLC-Lösungsmittel A in 10 Min.). Unten: Massenspektrum des höchsten Signalausgangs aus dem HPLC-Chromatogramm mit berechneten und gefundenen m/z -Werten.

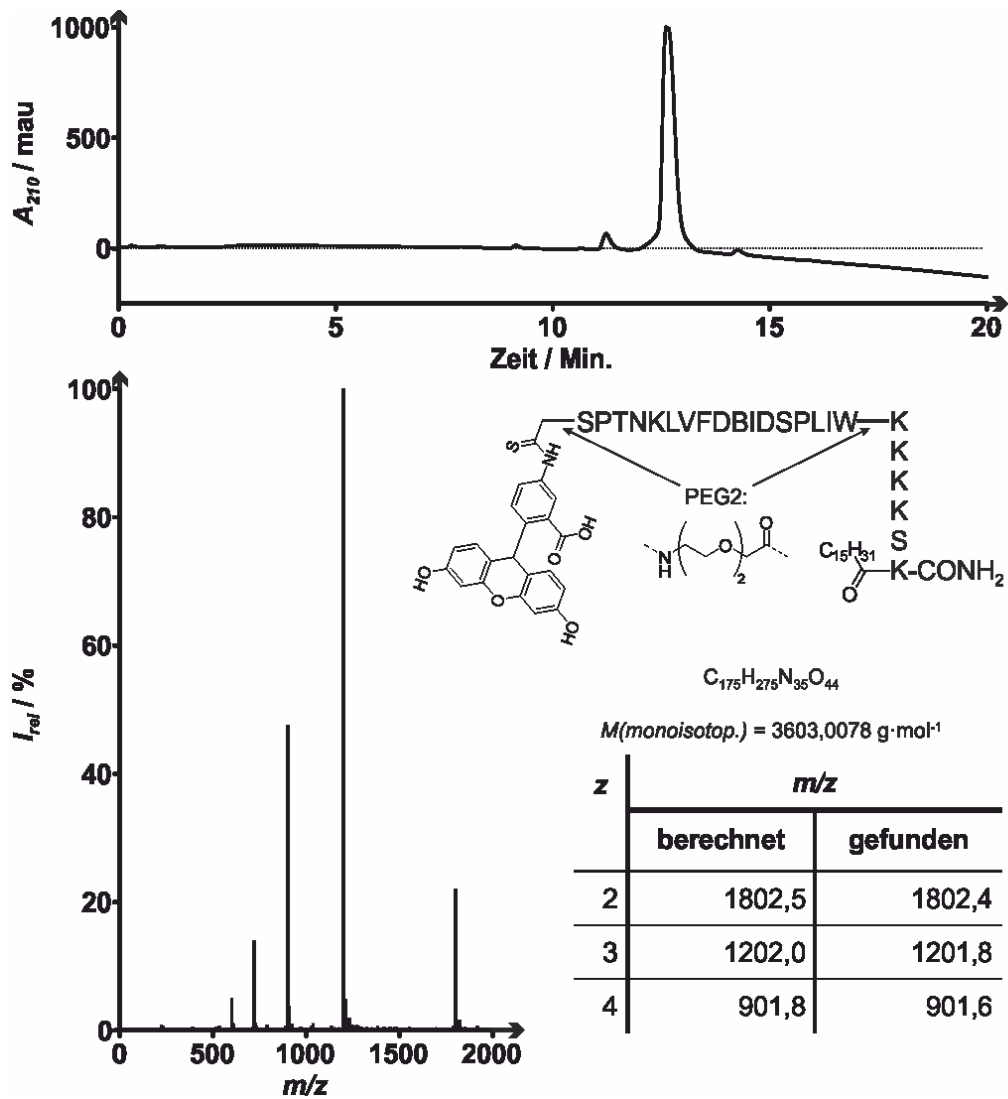


Abbildung A71: Analytische HPLC-MS Messung mit UV/Vis-Detektion des Liganden **f-9L-MA2**. Oben: Chromatogramm der HPLC bei 210 nm (Gradient: 30–90% des HPLC-Lösungsmittels B gegen das HPLC-Lösungsmittel A in 20 Min.). Unten: Massenspektrum des höchsten Signalaussschlags aus dem HPLC-Chromatogramm mit berechneten und gefundenen m/z -Werten.

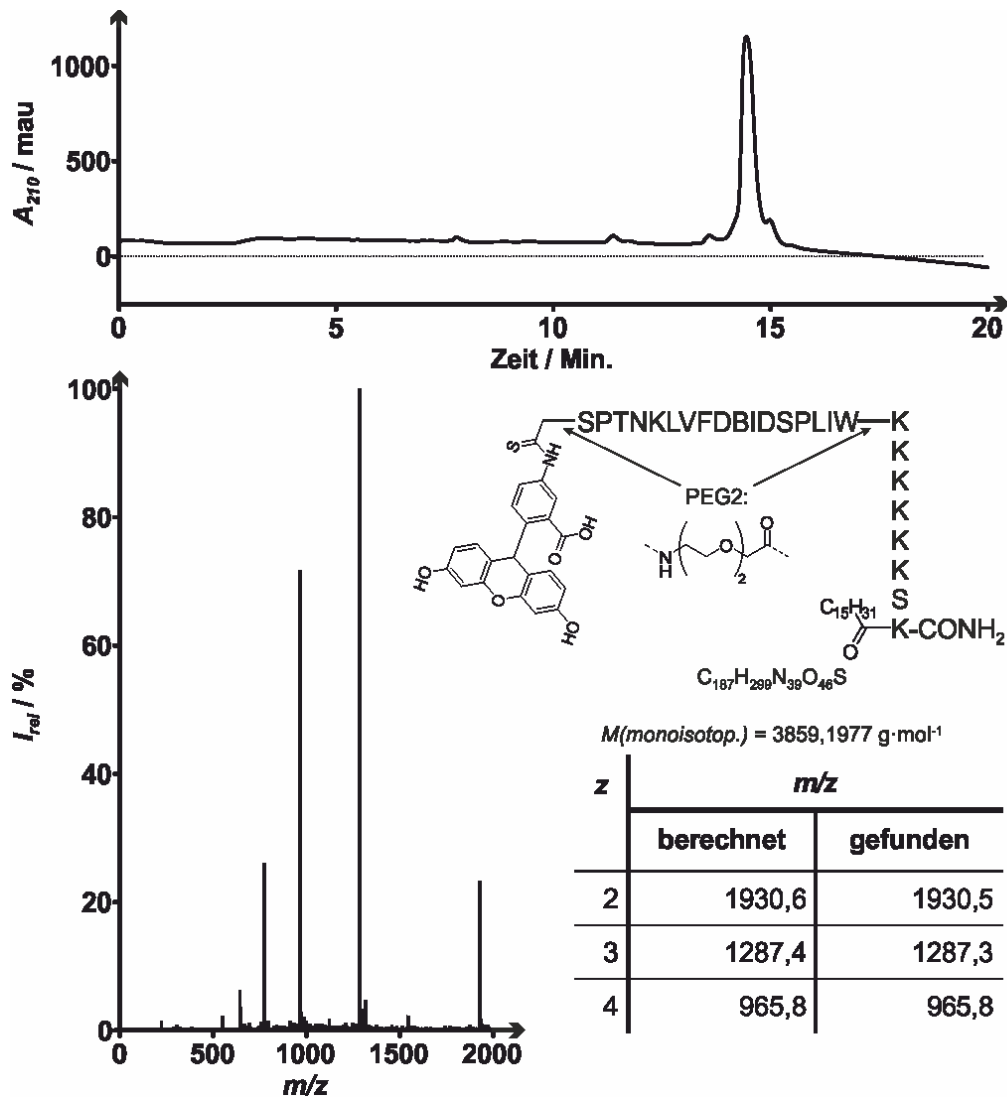


Abbildung A72: Analytische HPLC-MS Messung mit UV/Vis-Detektion des Liganden **f-9L-MA3**. Oben: Chromatogramm der HPLC bei 210 nm (Gradient: 10–90% des HPLC-Lösungsmittels B gegen das HPLC-Lösungsmittel A in 20 Min.). Unten: Massenspektrum des höchsten Signalausgangs aus dem HPLC-Chromatogramm mit berechneten und gefundenen m/z -Werten.

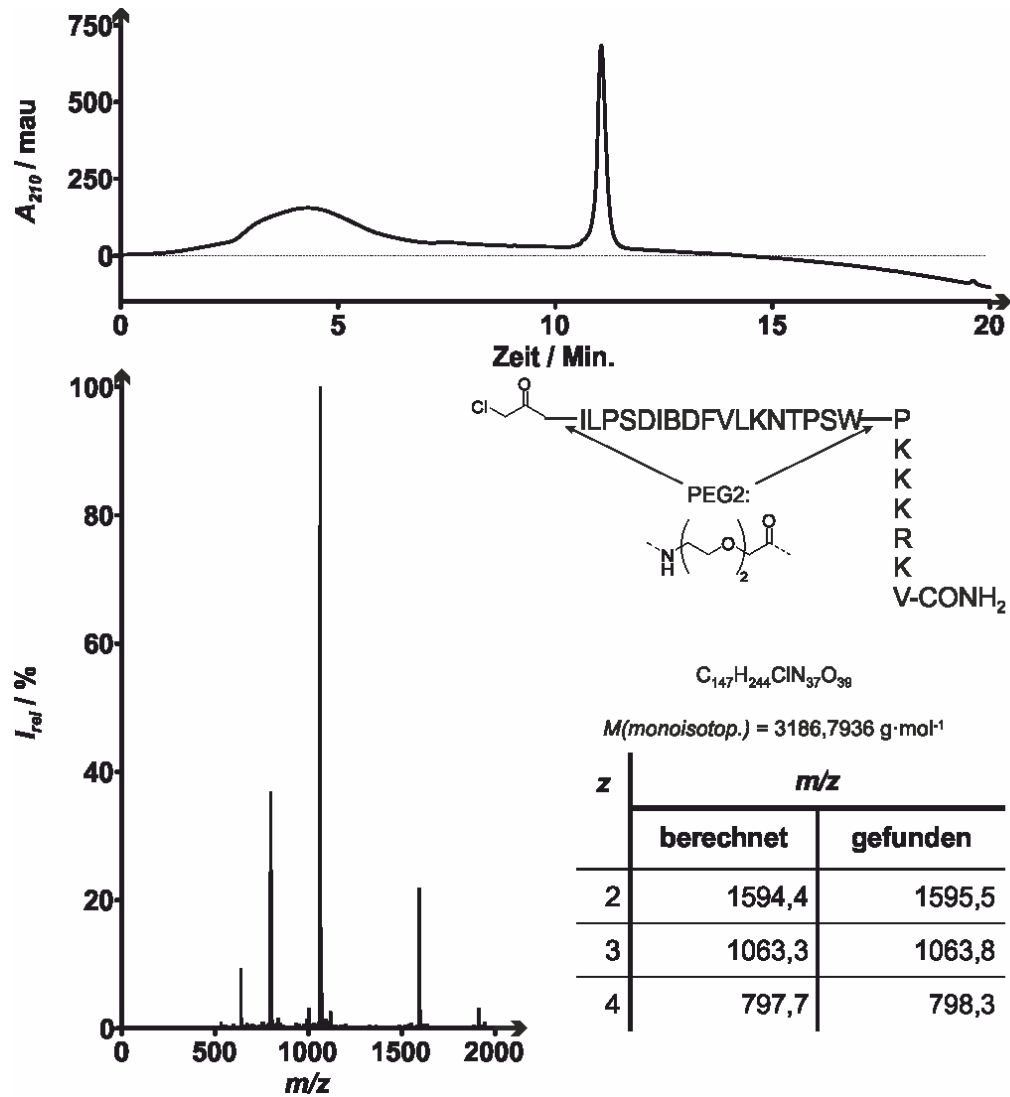


Abbildung A73: Analytische HPLC-MS Messung mit UV/Vis-Detektion des Liganden **CI-9L-NLS**. Oben: Chromatogramm der HPLC bei 210 nm (Gradient: 10–90% des HPLC-Lösungsmittels B gegen das HPLC-Lösungsmittel A in 20 Min.). Unten: Massenspektrum des höchsten Signalaussschlags aus dem HPLC-Chromatogramm mit berechneten und gefundenen m/z -Werten.

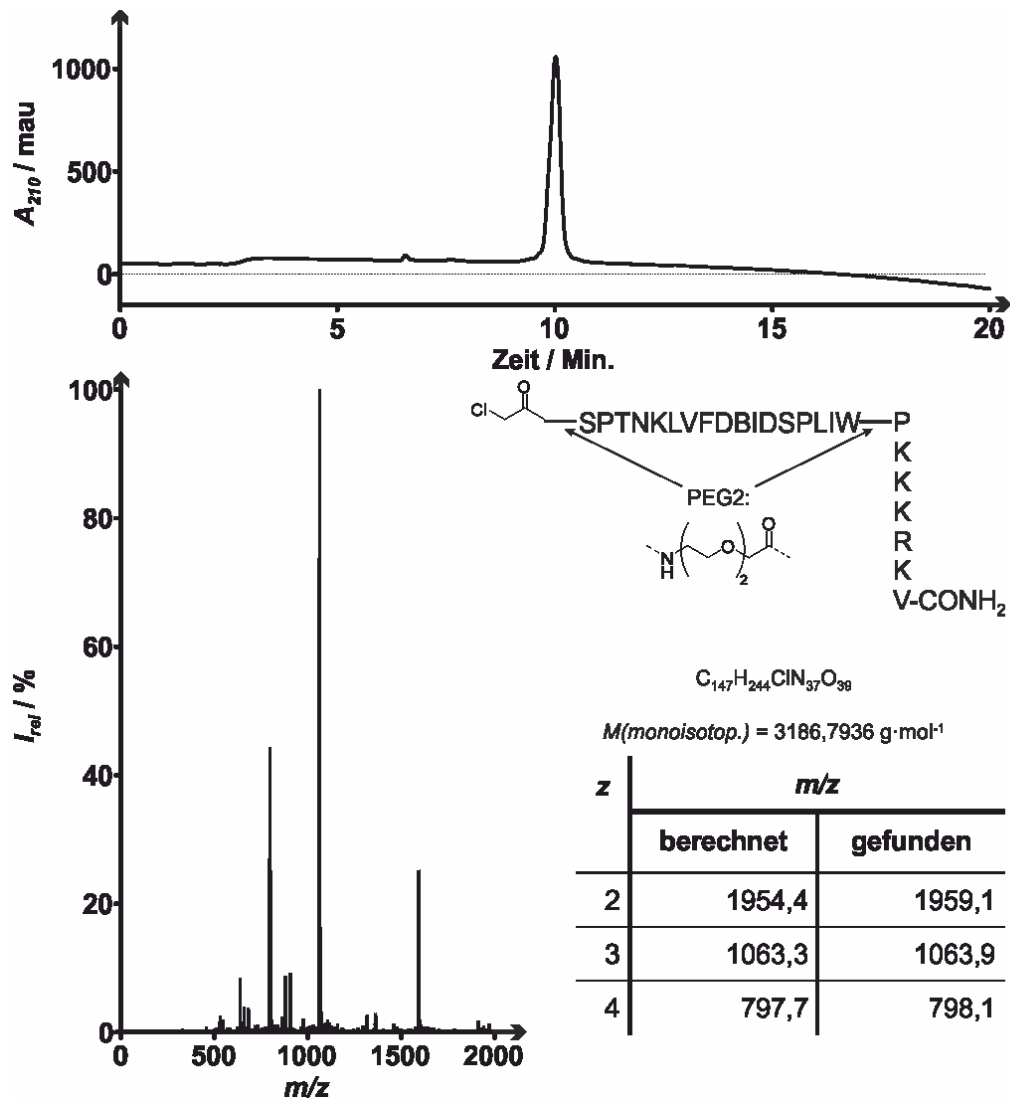


Abbildung A74: Analytische HPLC-MS Messung mit UV/Vis-Detektion des Liganden **CI-9iL-NLS**. Oben: Chromatogramm der HPLC bei 210 nm (Gradient: 10–90% des HPLC-Lösungsmittels B gegen das HPLC-Lösungsmittel A in 20 Min.). Unten: Massenspektrum des höchsten Signalausgangs aus dem HPLC-Chromatogramm mit berechneten und gefundenen m/z -Werten.

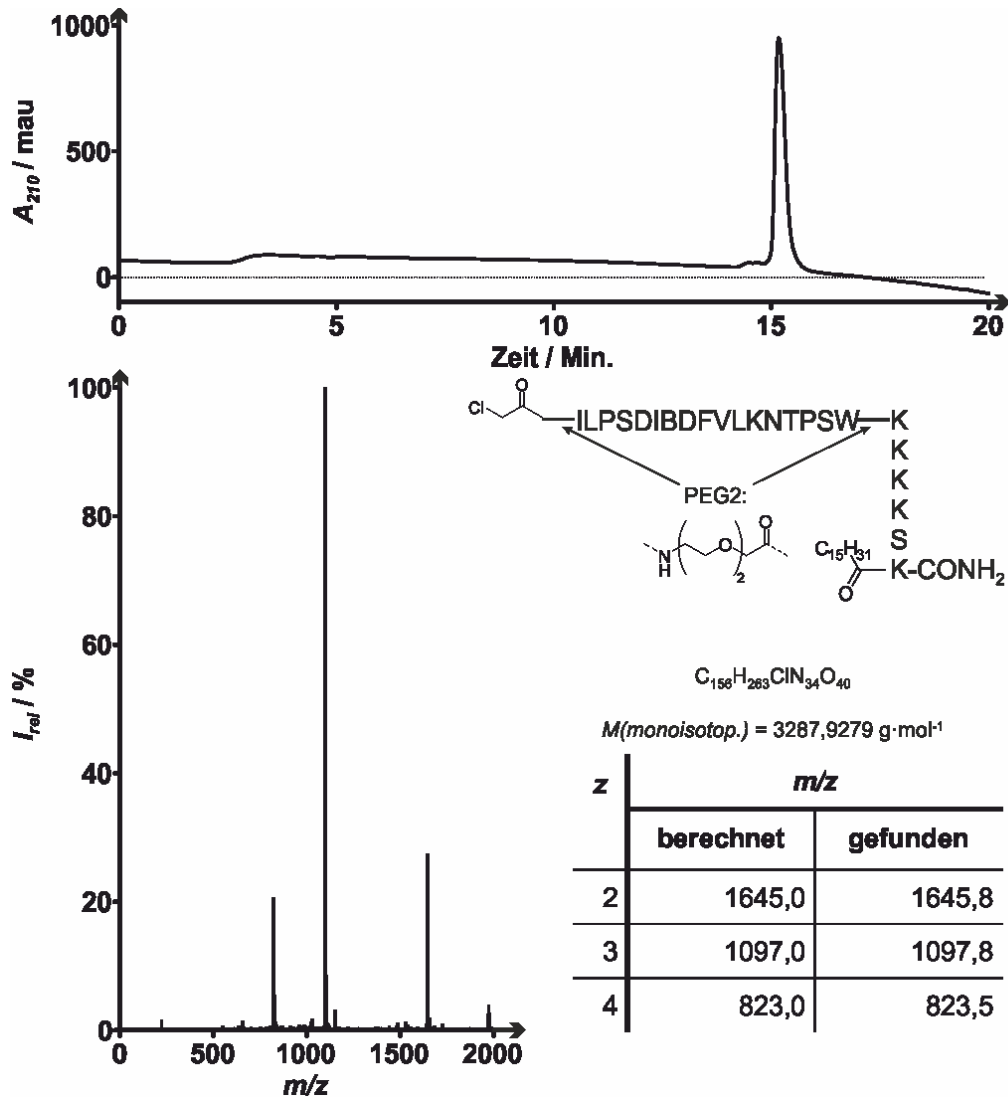


Abbildung A75: Analytische HPLC-MS Messung mit UV/Vis-Detektion des Liganden **CI-9L-MA2**. Oben: Chromatogramm der HPLC bei 210 nm (Gradient: 10–90% des HPLC-Lösungsmittels B gegen das HPLC-Lösungsmittel A in 20 Min.). Unten: Massenspektrum des höchsten Signalausgangs aus dem HPLC-Chromatogramm mit berechneten und gefundenen m/z -Werten.

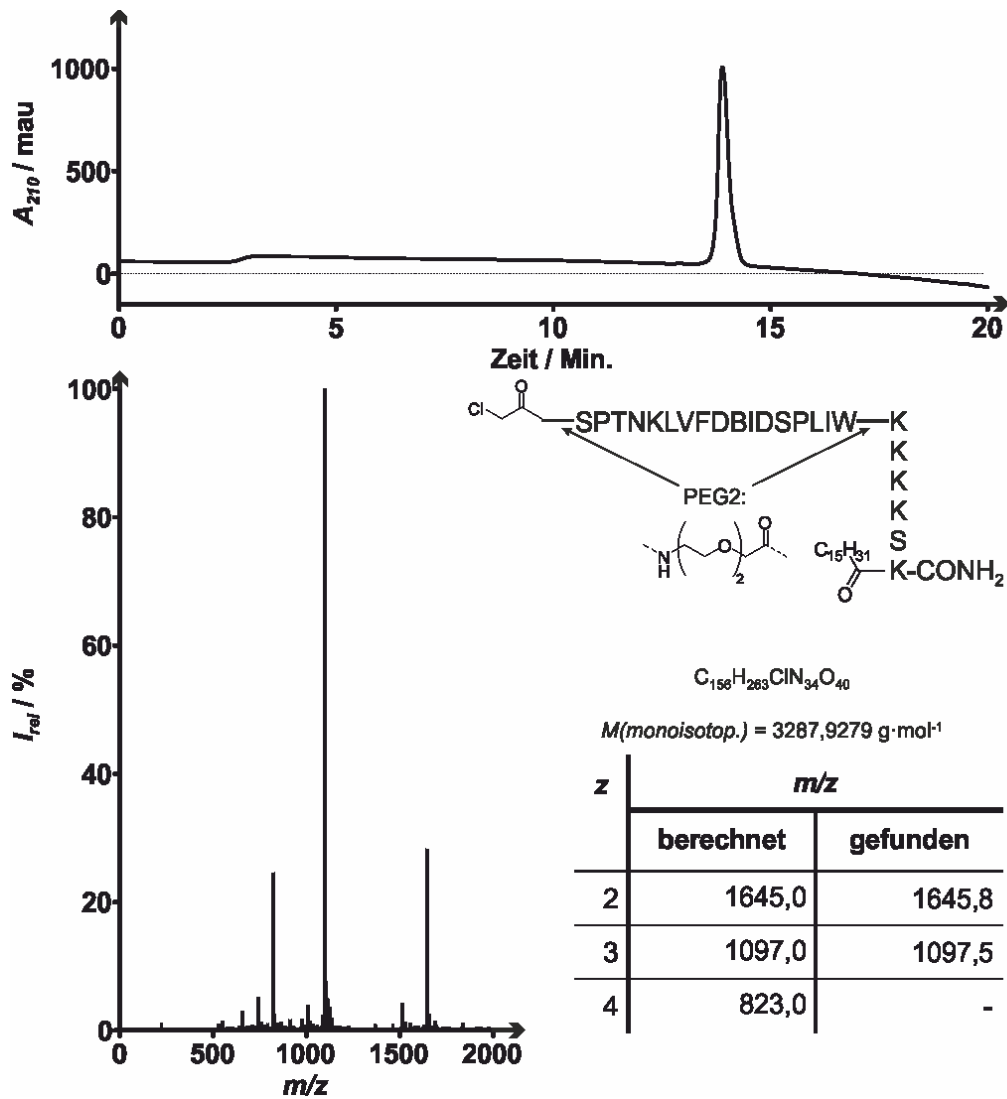


Abbildung A76: Analytische HPLC-MS Messung mit UV/Vis-Detektion des Liganden CI-9iL-MA2. Oben: Chromatogramm der HPLC bei 210 nm (Gradient: 10–90% des HPLC-Lösungsmittels B gegen das HPLC-Lösungsmittel A in 20 Min.). Unten: Massenspektrum des höchsten Signalausfalls aus dem HPLC-Chromatogramm mit berechneten und gefundenen m/z -Werten.

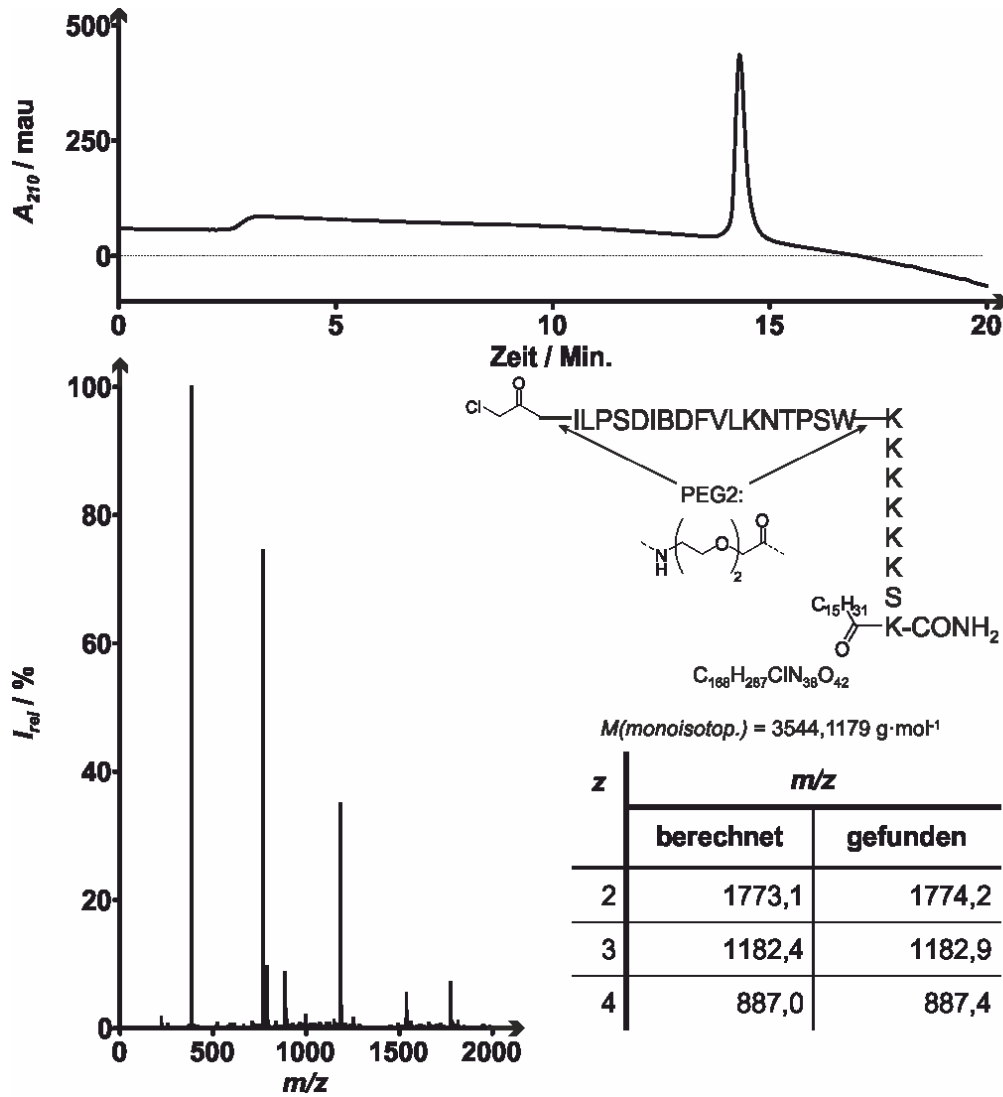


Abbildung A77: Analytische HPLC-MS Messung mit UV/Vis-Detektion des Liganden CI-9L-MA3. Oben: Chromatogramm der HPLC bei 210 nm (Gradient: 30–90% des HPLC-Lösungsmittels B gegen das HPLC-Lösungsmittel A in 20 Min.). Unten: Massenspektrum des höchsten Signalausfalls aus dem HPLC-Chromatogramm mit berechneten und gefundenen m/z -Werten.

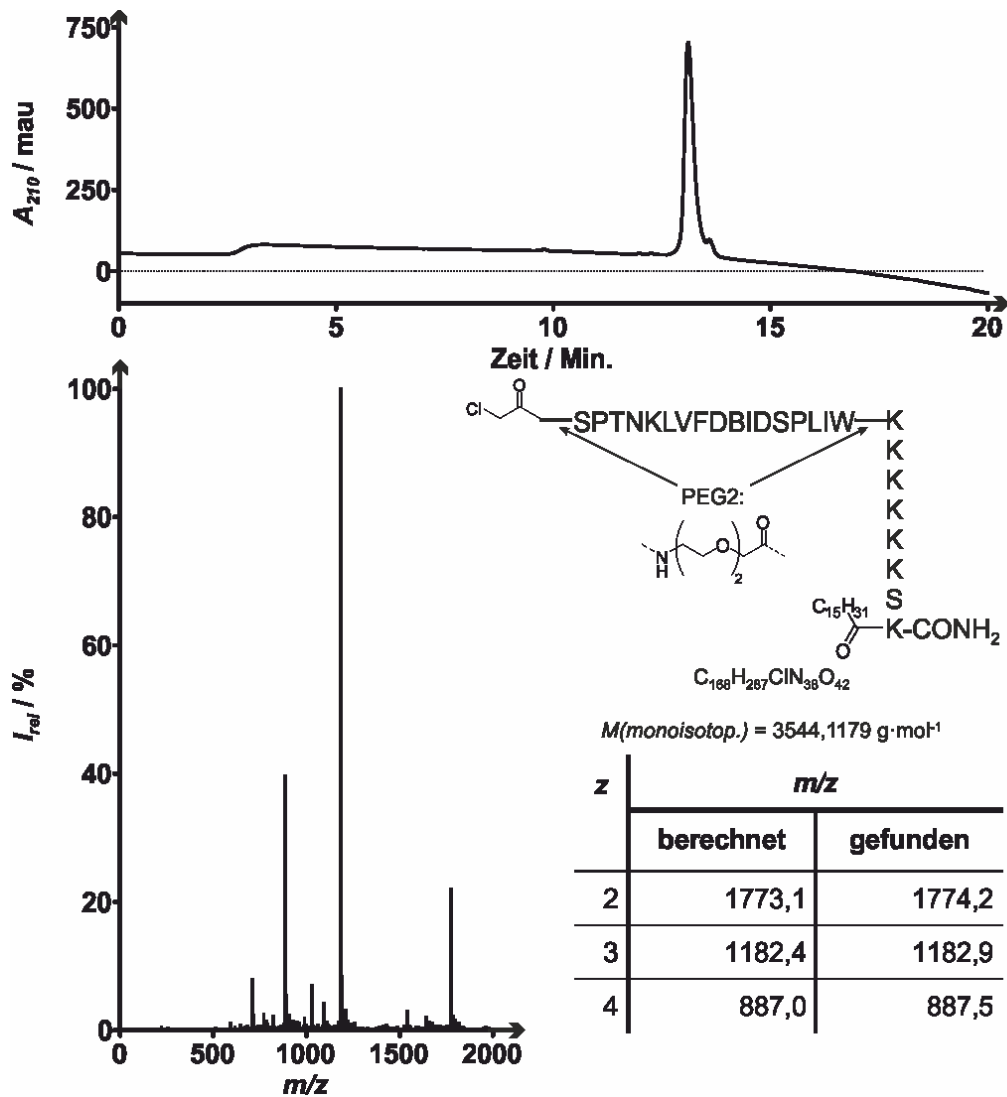


Abbildung A78: Analytische HPLC-MS Messung mit UV/Vis-Detektion des Liganden CI-9iL-MA3. Oben: Chromatogramm der HPLC bei 210 nm (Gradient: 10–90% des HPLC-Lösungsmittels B gegen das HPLC-Lösungsmittel A in 20 Min.). Unten: Massenspektrum des höchsten Signalausgangs aus dem HPLC-Chromatogramm mit berechneten und gefundenen m/z -Werten.

8.3.2 Daten der hochaufgelösten Massenspektrometrie

Tabelle A5: HRMS-Daten für die in dieser Arbeit verwendeten Liganden mit der jeweiligen Summenformel sowie den berechneten und gefundenen Werten einer exemplarischen m/z mit der Ladung z .

Peptid	Summenformel	z	m/z	
			berechnet	gefunden
f-L(M)-W	C ₁₁₉ H ₁₆₅ N ₂₃ O ₃₃ S ₂	2	1255,07690	1255,08246
f-L(B)-W	C ₁₂₀ H ₁₆₇ N ₂₃ O ₃₃ S	2	1246,09814	1246,10434
H-L-f	C ₁₂₂ H ₁₇₀ N ₂₄ O ₃₂ S	2	1258,60670	1258,09978
H-L(s1)-f	C ₁₃₂ H ₁₈₆ N ₂₄ O ₃₃ S	2	1334,67402	1334,67874
H-L(s2)-f	C ₁₃₀ H ₁₈₁ N ₂₅ O ₃₅ S	2	1343,15091	1343,15521
H-L(s3)-f	C ₁₃₅ H ₁₉₃ N ₂₅ O ₃₂ S	2	1355,20549	1355,2094
H-L(A2844)-f	C ₁₂₅ H ₁₇₆ N ₂₆ O ₃₃ S	3	868,09440	868,09768
H-L(A2845)-f	C ₁₂₅ H ₁₇₆ N ₂₆ O ₃₃ S	3	868,09440	868,09730
H-L(A2848)-f	C ₁₂₇ H ₁₈₂ N ₂₆ O ₃₁ S	3	867,44678	867,44990
H-L(A2849)-f	C ₁₁₉ H ₁₆₄ N ₂₄ O ₃₂ S	2	1237,59049	1237,59447
H-L(A2850)-f	C ₁₁₉ H ₁₆₄ N ₂₄ O ₃₂ S	2	1237,59049	1237,59652
H-L(A2851)-f	C ₁₂₇ H ₁₈₂ N ₂₆ O ₃₁ S	3	867,44678	867,44975
H-L(A2852)-f	C ₁₁₆ H ₁₆₆ N ₂₄ O ₃₂ S	2	1220,59831	1220,60473
H-L(A2853)-f	C ₁₂₆ H ₁₇₈ N ₂₆ O ₃₂ S	3	872,76629	872,76879
H-L(A2854)-f	C ₁₁₉ H ₁₆₄ N ₂₄ O ₃₂ S	2	1237,58915	1237,61713
H-L(A2856)-f	C ₁₂₁ H ₁₆₉ N ₂₃ O ₃₁ S	2	1258,6067	1237,63728
H-iL-f	C ₁₂₂ H ₁₇₀ N ₂₄ O ₃₂ S	2	1258,60670	1259,12033
Cl-4L-f	C ₁₂₅ H ₁₇₄ ClN ₂₅ O ₃₃ S	2	1311,11303	1311,11635
Cl-9L-f	C ₁₂₈ H ₁₈₀ ClN ₂₅ O ₃₅ S	2	1348,13142	1348,13686
Cl-13L-f	C ₁₃₁ H ₁₈₆ ClN ₂₅ O ₃₆ S	2	1377,15235	1377,15730
Cl-19L-f	C ₁₃₅ H ₁₉₄ ClN ₂₅ O ₃₈ S	2	1421,17857	1421,18378
Cl-38L-f	C ₁₄₈ H ₂₁₉ ClN ₂₅ O ₄₄ S	3	1044,51089	1044,50826
Cl-9iL-f	C ₁₂₈ H ₁₈₀ ClN ₂₅ O ₃₅ S	2	1348,13142	1348,12256
H-9L-b	C ₁₃₉ H ₂₂₆ N ₂₈ O ₄₂ S	2	1496,80650	1496,80565
Cl-9L-b	C ₁₃₉ H ₂₂₅ ClN ₂₈ O ₄₂ S	2	1513,78700	1513,79562
Cl-9iL-b	C ₁₃₉ H ₂₂₅ ClN ₂₈ O ₄₂ S	2	1513,78700	1513,79501
H-9L-dtb	C ₁₃₉ H ₂₂₈ N ₂₈ O ₄₂	2	1498,81000	1498,81646
Cl-9L-dtb	C ₁₃₉ H ₂₂₇ ClN ₂₈ O ₄₂	2	1498,81000	1498,82132
Cl-9iL-dtb	C ₁₃₉ H ₂₂₇ ClN ₂₈ O ₄₂	2	1481,80500	1481,83987
f-9NLS	C ₆₇ H ₁₀₁ N ₁₇ O ₁₅ S	3	472,91333	472,91990
f-9MA1	C ₄₉ H ₆₇ N ₅ O ₁₀ S	1	918,46000	918,47011
f-9MA2	C ₇₆ H ₁₂₀ N ₁₄ O ₁₆ S	2	759,43500	759,44680
f-9MA3	C ₈₈ H ₁₄₆ N ₁₈ O ₁₈ S	3	592,02090	592,02741
f-9L-NLS	C ₁₆₆ H ₂₅₆ N ₃₈ O ₄₃ S	5	700,97200	700,97516
f-9L-MA2	C ₁₇₅ H ₂₇₅ N ₃₅ O ₄₄	5	721,198	721,21024
f-9L-MA3	C ₁₈₇ H ₂₉₉ N ₃₉ O ₄₆ S	2	822,98250	822,99246
Cl-9L-NLS	C ₁₄₇ H ₂₄₄ ClN ₃₇ O ₃₉	5	638,35800	638,16614
Cl-9iL-NLS	C ₁₄₇ H ₂₄₄ ClN ₃₇ O ₃₉	4	797,69750	797,70638
Cl-9L-MA2	C ₁₅₆ H ₂₆₃ ClN ₃₄ O ₄₀	4	822,98250	822,99246
Cl-9iL-MA2	C ₁₅₆ H ₂₆₃ ClN ₃₄ O ₄₀	4	822,98250	822,99105
Cl-9L-MA3	C ₁₆₈ H ₂₈₇ ClN ₃₈ O ₄₂	4	886,78065	886,91595
Cl-9iL-MA3	C ₁₆₈ H ₂₈₇ ClN ₃₈ O ₄₂	4	886,78065	887,06860

8.4 Daten zur Charakterisierung nicht-kovalenter Protein-Ligand-Komplexe

8.4.1 Fluoreszenzpolarisationsspektroskopie

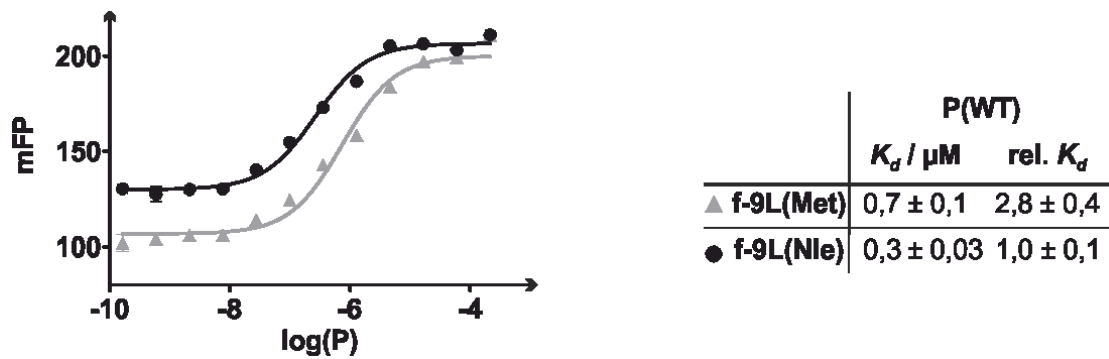


Abbildung A79: Sigmoidale Bindungskurven der Fluoreszenzpolarisationsspektroskopie der Liganden f-9L(M)-W und f-9L(B)-W gegenüber dem Protein P(WT). Startkonzentration des Proteins: $c_{P(WT)} = 216 \mu\text{M}$; Verdünnungsfaktor: 1 zu 3; Ligandkonzentration im Assay: $c_{f-L(M)-W} = 10 \text{ nM}$; $c_{f-L(B)-W} = 10 \text{ nM}$.

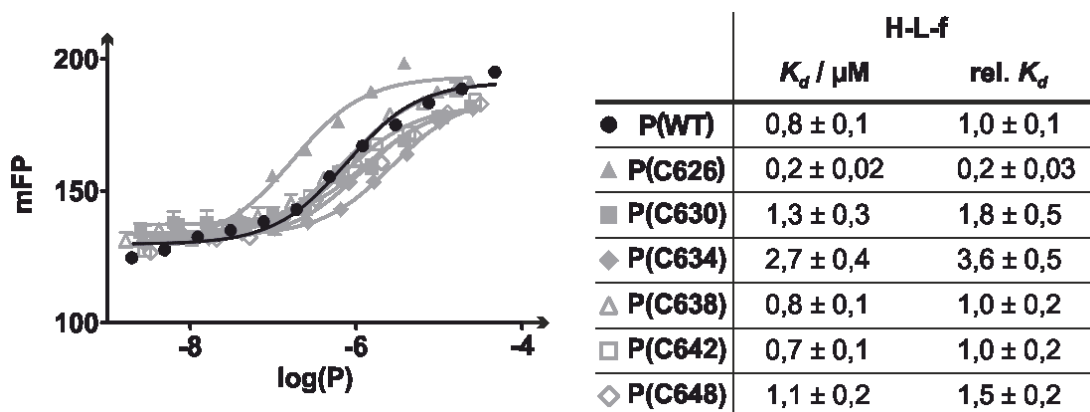
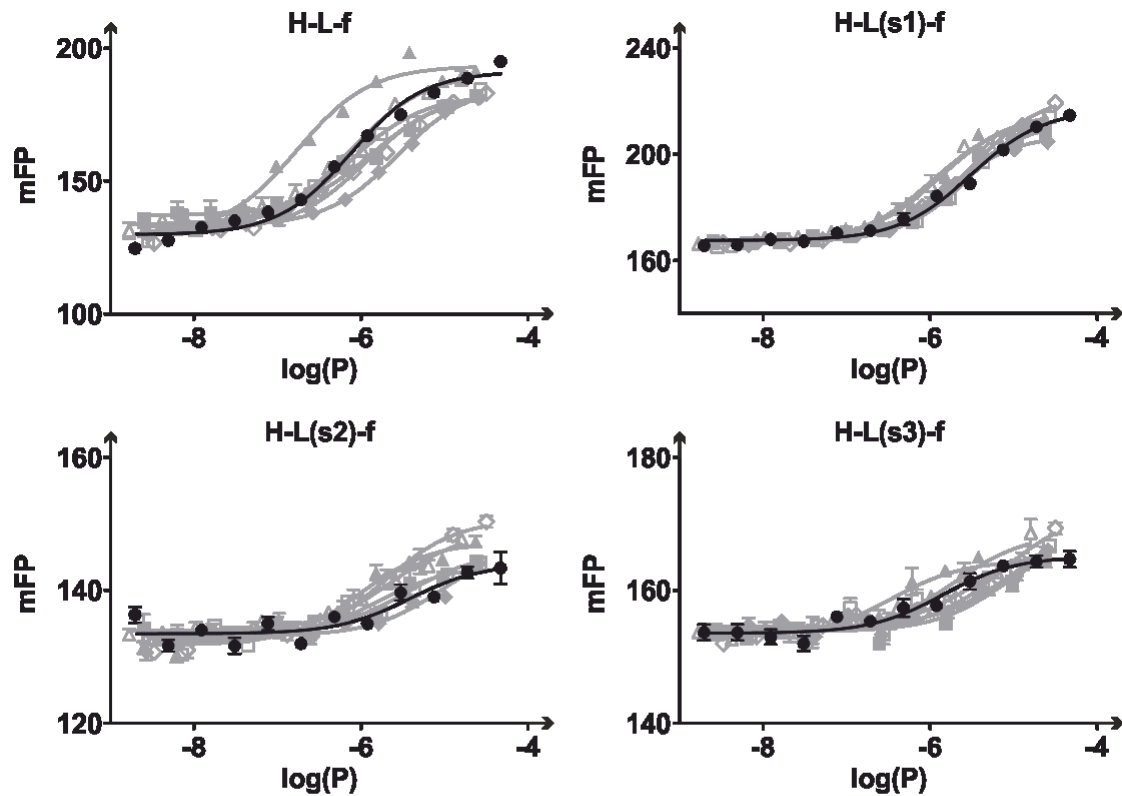


Abbildung A80: Sigmoidale Bindungskurven der Fluoreszenzpolarisationsspektroskopie des Liganden H-L-f gegenüber den sieben Proteinvarianten. Startkonzentrationen der Proteins: $c_{P(WT)} = 6 \mu\text{M}$, $c_{P(C626)} = 14 \mu\text{M}$, $c_{P(C630)} = 17 \mu\text{M}$, $c_{P(C634)} = 13 \mu\text{M}$, $c_{P(C638)} = 27 \mu\text{M}$, $c_{P(C642)} = 34 \mu\text{M}$, $c_{P(C648)} = 14 \mu\text{M}$; Verdünnungsfaktor: 1 zu 2,5; Ligandkonzentration im Assay: $c_{H-L-f} = 10 \text{ nM}$.



	●P(WT)	▲P(C626)	■P(C630)	◆P(C634)	△P(C638)	□P(C642)	◇P(C648)
H-L-f	0,2 ± 0,02	1,0 ± 0,3	2,4 ± 0,4	0,7 ± 0,1	0,6 ± 0,1	1,0 ± 0,2	0,8 ± 0,1 μM
H-L(s1)-f	1,3 ± 0,2	1,9 ± 0,4	1,5 ± 0,2	1,0 ± 0,1	3,3 ± 0,4	3,0 ± 0,2	3,1 ± 0,4 μM
H-L(s2)-f	1,0 ± 0,3	3,7 ± 2,4	9,5 ± 5,6	1,9 ± 0,6	1,3 ± 0,6	1,6 ± 0,4	3,8 ± 2,6 μM
H-L(s3)-f	0,4 ± 0,1	6,9 ± 4,0	6,6 ± 2,9	1,8 ± 0,6	2,9 ± 1,3	6,1 ± 2,3	1,4 ± 0,5 μM

Abbildung A81: Sigmoidale Bindungskurven der Fluoreszenzpolarisationsspektroskopie der Liganden **H-L-f**, **H-L(s1)-f**, **H-L(s2)-f** und **H-L(s3)-f** gegenüber den sieben Proteinvarianten. Startkonzentrationen der Proteine: $c_{P(WT)} = 47 \mu\text{M}$, $c_{P(C626)} = 24 \mu\text{M}$, $c_{P(C630)} = 24 \mu\text{M}$, $c_{P(C634)} = 26 \mu\text{M}$, $c_{P(C638)} = 16 \mu\text{M}$, $c_{P(C642)} = 27 \mu\text{M}$, $c_{P(C648)} = 32 \mu\text{M}$; Verdünnungsfaktor 1 zu 2,5; Ligandenkonzentrationen im Assay: $c_{H-L-f} = 20 \text{ nM}$, $c_{H-L(s1)-f} = 20 \text{ nM}$, $c_{H-L(s2)-f} = 20 \text{ nM}$, $c_{H-L(s3)-f} = 20 \text{ nM}$.

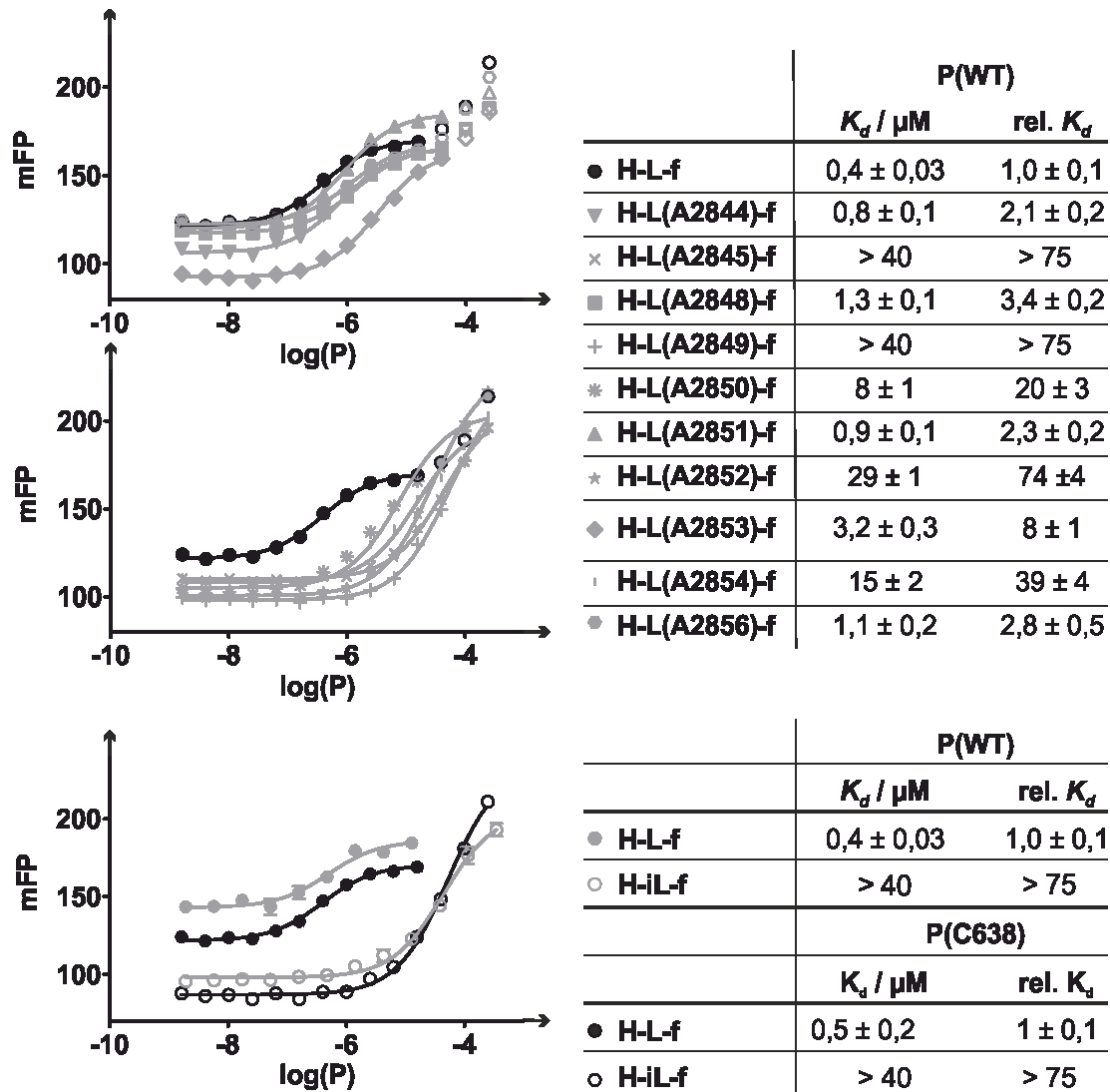


Abbildung A82: Sigmoidale Bindungskurven der Fluoreszenzpolarisationsspektroskopie der Alaninvarianten des Liganden sowie des Liganden **H-iL-f**. Startkonzentrationen der Proteine: $c_{P(WT)} = 245 \mu\text{M}^{\text{a}}$, $c_{P(C638)} = 179 \mu\text{M}^{\text{b}}$; Verdünnungsfaktor: 1 zu 2,5; Ligandenkonzentrationen im Assay: $c_{H-L-f} = 20 \text{ nM}$, $c_{H-L(A2844)-f} = 20 \text{ nM}$, $c_{H-L(A2845)-f} = 20 \text{ nM}$, $c_{H-L(A2848)-f} = 20 \text{ nM}$, $c_{H-L(A2849)-f} = 20 \text{ nM}$, $c_{H-L(A2850)-f} = 20 \text{ nM}$, $c_{H-L(A2851)-f} = 20 \text{ nM}$, $c_{H-L(A2852)-f} = 20 \text{ nM}$, $c_{H-L(A2853)-f} = 20 \text{ nM}$, $c_{H-L(A2854)-f} = 20 \text{ nM}$, $c_{H-L(A2856)-f} = 20 \text{ nM}$, $c_{H-iL-f} = 20 \text{ nM}$.

^aEinige der Liganden zeigten bei dieser Konzentration bereits eine zweite sigmoidale Kurve (Symbole der gleichen Form und Farbe, aber mit weißer Füllung), die auf eine Bindung der Liganden in die zweite Bindungsstelle des Proteins zurückzuführen sein dürfte.¹⁵² In diesen Fällen wurden einige der höheren Verdünnungsschritte bei der Berechnung nicht berücksichtigt, sodass sich in Abhängigkeit von den Liganden folgende Startkonzentrationen ergaben: für **H-L(A2845)-f**, **H-L(A2849)-f**, **H-L(A2850)-f**, **H-L(A2852)-f**, **H-L(A2854)-f** gilt $c_{P(WT)} = 245 \mu\text{M}$; für **H-L(A2844)-f**, **H-L(A2848)-f**, **H-L(A2851)-f**, **H-L(A2854)-f**, **H-iL-f** gilt $c_{P(WT)} = 39 \mu\text{M}$; für **H-L(A2856)-f** gilt $c_{P(WT)} = 16 \mu\text{M}$; für **H-L-f** gilt $c_{P(WT)} = 6 \mu\text{M}$.

^{b)}Auch für die Kombination des Liganden **H-L-f** mit dem Protein **P(C638)** deutete sich bei hohen Konzentrationen eine zusätzliche Bindung in die zweite Bindungsstelle des Proteins ab.¹⁵² Daher wurden einige der höheren Verdünnungsschritte bei der Berechnung nicht berücksichtigt, sodass sich eine Startkonzentration von $c_{P(C638)} = 29 \mu\text{M}$ ergab.

8.5 Daten zur nachbarschaftsinduzierten Proteinmodifikation

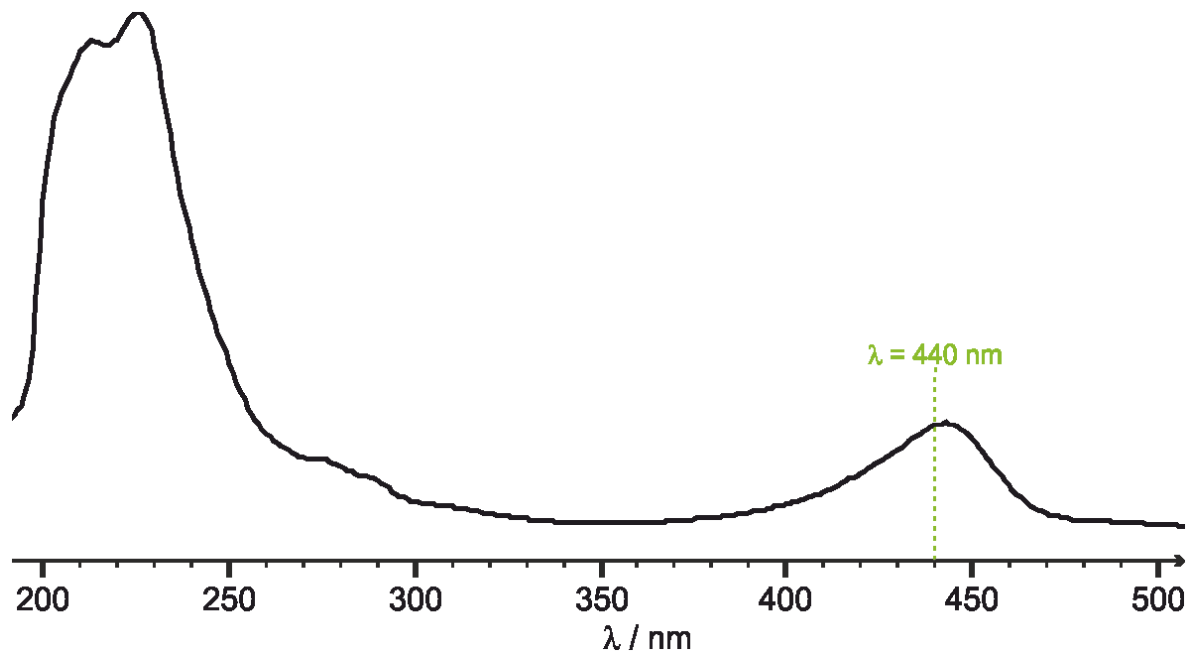


Abbildung A83: Absorptionsspektrum von Fluorescein auf der analytischen HPLC. Freies Fluorescein eluiert in seiner kationischen Form bei 60% des HPLC-Lösungsmittels B und zeigt zwei charakteristische Absorptionsmaxima bei ca. 225 nm und 440 nm.^{181,182} Da der größere Signalausschlag bei 225 nm mit der Absorption peptidischer Bindungen überlappt, wurde der kleinere Signalausschlag bei 440 nm zur Quantifizierung von FITC-modifizierten Spezies genutzt.

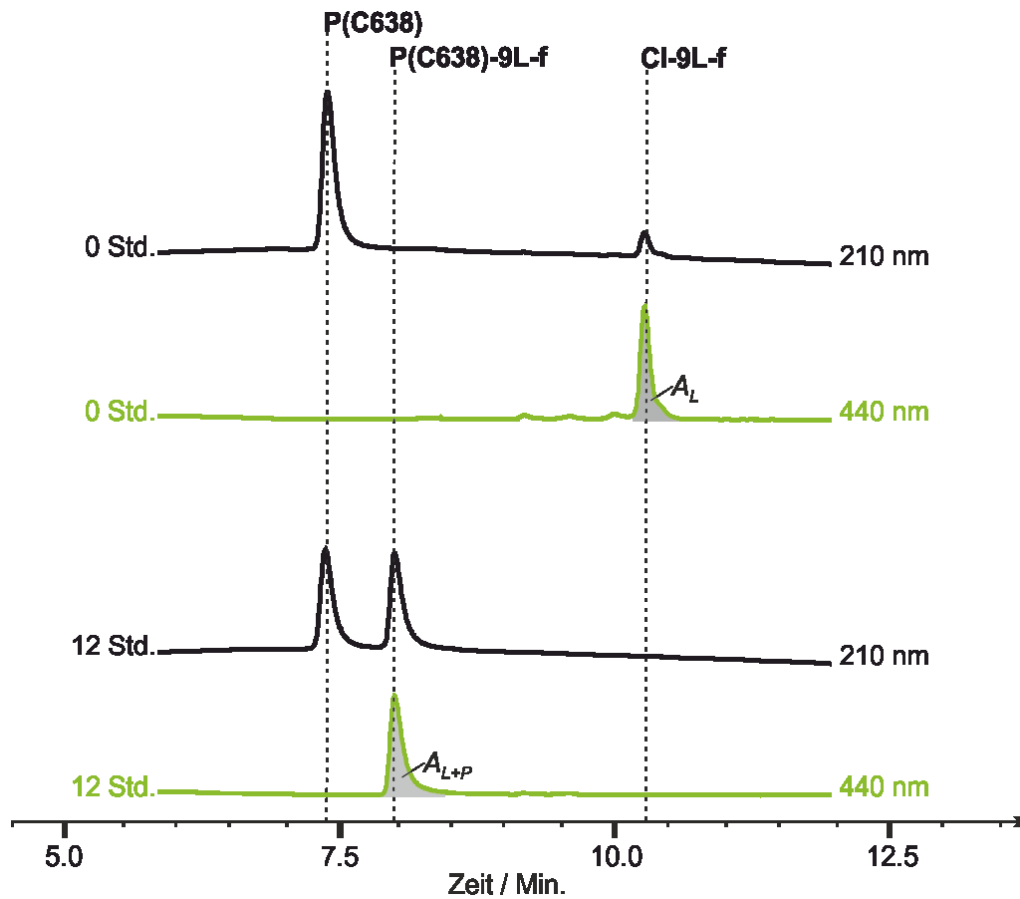


Abbildung A84: oben (0 Std.): Exemplarische Chromatogramme einer Mischung aus **P(C638)** und **CI-9L-f** bei 210 nm (schwarz) und 440 nm (grün), die vor Zugabe des Liganden angesäuert worden war, sodass keine Reaktionen stattfand. unten (12 Std.): Exemplarische Chromatogramme der Reaktion von **P(C638)** und **CI-9L-f** nach 12-stündiger Inkubation bei 37°C bei 210 nm (schwarz) und 440 nm (grün). Die zur Auswertung verwendeten Signalaussschläge des reinen Liganden und des Protein-Ligand-Konjugates haben deutlich unterscheidbare Retentionszeiten, sodass sie zur Auswertung der Reaktionsausbeute mittels Integration genutzt werden können. Hierzu wurde in jedem Chromatogramm die Flächen (grau) unter den Signalaussschlägen des freien Liganden (A_L) und des Reaktionsproduktes (A_{L+P}) bestimmt.

8.5.1 Rohdaten des Reaktivitätstests

Tabelle A6: Mit Hilfe der molekulardynamischen Simulationen berechnete prozentuale Aufenthaltswahrscheinlichkeit P des α -Kohlenstoffs der reaktiven Gruppe am Liganden innerhalb von 5 Å um das Thiol des proteinogenen Cysteins.

	$P / \%$				
	CI-3L-f	CI-9L-f	CI-13L-f	CI-19L-f	CI-38L-f
P(C626)	0	0	0	0,6	4,1
P(C630)	0,2	0,8	2,4	4,4	6,3
P(C634)	4,6	17	6,7	11	11
P(C638)	19	15	16	13	11
P(C642)	0	1,3	4,2	4,0	2,2
P(C648)	0	0	0,2	1,5	0

Tabelle A7: Prozentuale Ausbeuten des Reaktivitätstests aller cystein-enthaltenden Proteinvarianten mit den fünf reaktiven Liganden mit verschiedenen Abstandshaltern nach 1 und 6 Stunden. Ist kein Wert angegeben, lag die Ausbeute unterhalb des Detektionslimit der analytischen HPLC (10 pmol FITC).

		Ausbeute / %					
		CI-3L-f	CI-9L-f	CI-13L-f	CI-19L-f	CI-38L-f	
Reaktionszeit / Std.	1	P(C626)	-	-	-	-	6
		P(C630)	-	5	27	62	27
		P(C634)	18	58	47	51	18
		P(C638)	39	100	100	100	69
		P(C642)	-	-	-	3	-
		P(C648)	-	6	5	40	54
	6	P(C626)	9	27	20	28	37
		P(C630)	21	53	85	98	61
		P(C634)	84	100	97	95	56
		P(C638)	90	99	100	100	73
		P(C642)	-	2	30	60	20
		P(C648)	37	59	55	93	72

Tabelle A8: Aus den in Tabelle A7 angegebenen prozentualen Ausbeuten des Reaktivitätstests abgeschätzte initiale Reaktionsgeschwindigkeiten v_u .

	$v_u / \text{nM}\cdot\text{s}^{-1}$				
	CI-3L-f	CI-9L-f	CI-13L-f	CI-19L-f	CI-38L-f
P(C626)	0,041	0,12	0,094	0,13	0,16
P(C630)	0,10	0,15	0,75	1,7	0,75
P(C634)	0,49	1,6	1,3	1,4	0,49
P(C638)	1,1	> 2,8	> 2,8	> 2,8	1,9
P(C642)	-	0,010	0,14	0,073	0,093
P(C648)	0,17	0,16	0,12	1,1	1,5

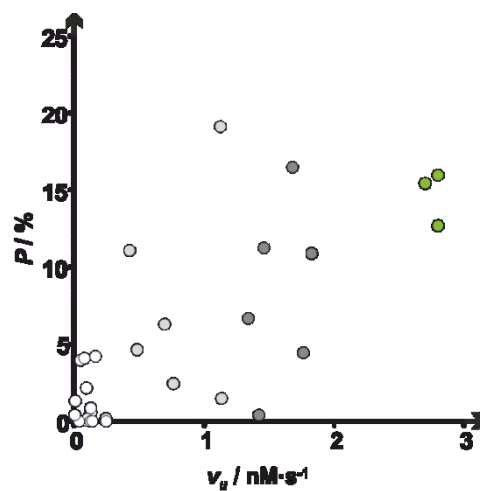


Abbildung A85: Streudiagramm der berechneten Aufenthaltswahrscheinlichkeit P der beiden reaktiven Gruppen innerhalb von 5 \AA zueinander gegen die experimentell bestimmten ungefähren initialen Reaktionsgeschwindigkeiten v_u derselben Paare. Grüne, hell- und dunkelgraue sowie weiße Punkte entsprechen der Farbgebung in Abbildung 25b.

8.5.2 Rohdaten der Reaktionen zur Bestimmung der initialen Reaktionsgeschwindigkeiten

Tabelle A9: Prozentuale Ausbeuten der drei vollständig unabhängigen Reaktionen zur Bestimmung der initialen Reaktionsgeschwindigkeit des Protein-Ligand-Paares P(C638)+CI-9L-f.

Zeit / Min.	Ausbeute / %		
	Messung 1	Messung 2	Messung 3
0,5	0	0	0
1,0	12	2	6
1,5	25	13	10
2,0	31	32	19
2,5	(39)	(37)	(31)
5,0	(63)	(54)	(42)
10,0	(84)	(87)	(74)
15,0	(100)	(95)	(85)
30,0	(100)	(100)	(89)
60,0	(100)	(100)	(100)
120,0	(100)	(100)	(100)
180,0	(100)	(100)	(100)
360,0	(100)	(100)	(100)
540,0	(100)	(100)	(100)
720,0	(100)	(100)	(100)

Tabelle A10: Prozentuale Ausbeuten der drei vollständig unabhängigen Reaktionen zur Bestimmung der initialen Reaktionsgeschwindigkeit des Protein-Ligand-Paares P(C638)+CI-13L-f.

Zeit / Min.	Ausbeute / %		
	Messung 1	Messung 2	Messung 3
0,5	(0)	(0)	(0)
1,0	(0)	(0.2)	(0.)
1,5	(4)	(0.2)	(1)
2,0	10	(0.8)	4
2,5	13	4	8
5,0	19	6	11
10,0	38	16	22
15,0	(64)	(41)	(45)
30,0	(93)	(59)	(59)
60,0	(96)	(85)	(91)
120,0	(100)	(94)	(99)
180,0	(100)	(100)	(100)
360,0	(100)	(100)	(100)
540,0	(100)	(100)	(100)
720,0	(100)	(100)	(100)

Tabelle A11: Prozentuale Ausbeuten der drei vollständig unabhängigen Reaktionen zur Bestimmung der initialen Reaktionsgeschwindigkeit des Protein-Ligand-Paares **P(C638)+Cl-19L-f**.

Zeit / Min.	Ausbeute / %		
	Messung 1	Messung 2	Messung 3
0,5	(0)	(0)	(0)
1,0	(0)	(0)	(0)
1,5	7	(0)	(1)
2,0	15	(2)	4
2,5	20	9	8
5,0	24	15	11
10,0	(43)	29	22
15,0	(66)	(55)	(45)
30,0	(72)	(74)	(59)
60,0	(97)	(94)	(91)
120,0	(100)	(100)	(99)
180,0	(100)	(100)	(99)
360,0	(100)	(100)	(100)
540,0	(100)	(100)	(100)
720,0	(100)	(100)	(100)

Tabelle A12: Prozentuale Ausbeuten der drei vollständig unabhängigen Reaktionen zur Bestimmung der initialen Reaktionsgeschwindigkeit des Protein-Ligand-Paares **P(C638)+Cl-9iL-f**.

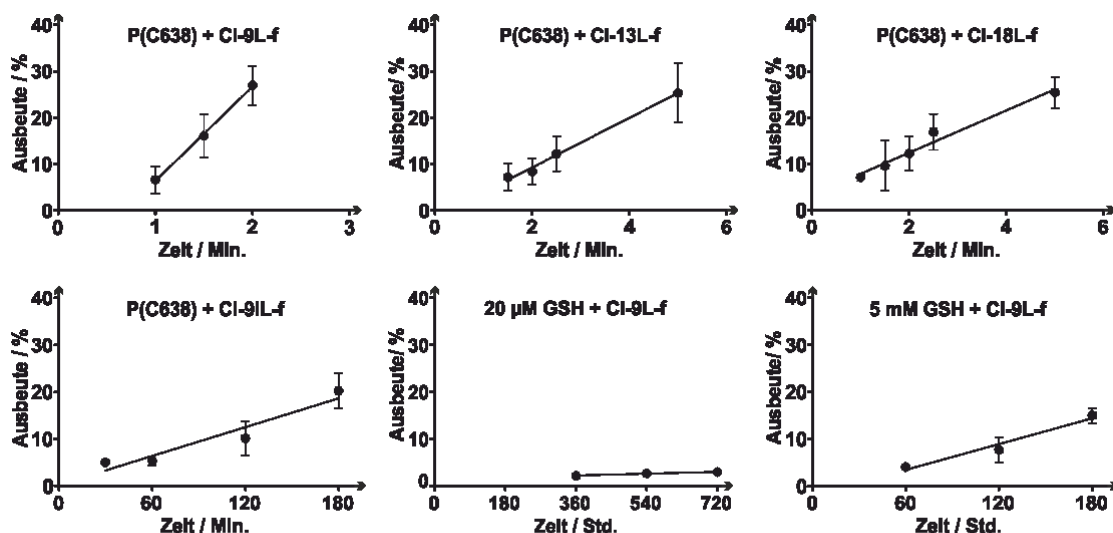
Zeit / Min.	Ausbeute / %		
	Messung 1	Messung 2	Messung 3
0,5	(0)	(0)	(0)
1,0	(0)	(0)	(0)
1,5	(0)	(0)	(0)
2,0	(0)	(0)	(0)
2,5	(0)	(0)	(0)
5,0	(0)	(0)	(0)
10,0	(0)	(2)	(0)
15,0	(0)	(7)	(0)
30,0	(0)	(1)	(0)
60,0	(2)	5	5
120,0	6.25	7	3
180,0	18	6	8
360,0	25	22	13
540,0	(55)	(44)	(26)
720,0	(68)	(63)	(38)

Tabelle A13: Prozentuale Ausbeuten der drei vollständig unabhängigen Reaktionen zur Bestimmung der initialen Reaktionsgeschwindigkeit des Liganden **CI-9L-f** mit Glutathion einer Konzentration von 20 μM .

Zeit / Min.	Ausbeute / %		
	Messung 1	Messung 2	Messung 3
0,5	(0)	(0)	(0)
1,0	(0)	(0)	(0)
1,5	(0)	(0)	(0)
2,0	(0)	(0)	(0)
2,5	(0)	(0)	(0)
5,0	(0)	(0)	(0)
10,0	(0)	(0)	(0)
15,0	(0)	(0)	(0)
30,0	(0)	(0)	(0)
60,0	(0)	(0)	(0)
120,0	(0)	(0)	(0)
180,0	(0)	(0.7)	(1)
360,0	2	(0.3)	2
540,0	3	(1.5)	3
720,0	6	3	2

Tabelle A14: Prozentuale Ausbeuten der drei vollständig unabhängigen Reaktionen zur Bestimmung der initialen Reaktionsgeschwindigkeit des Liganden **CI-9L-f** mit Glutathion einer Konzentration von 5 mM.

Zeit / Min.	Ausbeute / %		
	Messung 1	Messung 2	Messung 3
0,5	(0)	(0)	(0)
1,0	(0)	(0)	(0)
1,5	(0)	(0)	(0)
2,0	(0)	(0)	(0)
2,5	(0)	(0)	(0)
5,0	(0)	(0)	(0)
10,0	(0)	(0)	(0)
15,0	(0)	(0)	(0)
30,0	(0)	(0)	(0)
60,0	(0)	(2)	(0)
120,0	(0)	4	(0)
180,0	(0)	10	5
360,0	16	17	12
540,0	(39)	(39)	(25)
720,0	(46)	(53)	(35)



Nu	c_{Nu} / mM	E	m	$v / \text{nM}\cdot\text{s}^{-1}$	v_{rel}
P(C638)	0,02	CI-9L-f	$20 \pm 0,8$	$34 \pm 1,9$	9500 ± 2500
P(C638)	0,02	CI-13L-f	$5,3 \pm 0,29$	$8,9 \pm 0,59$	2500 ± 600
P(C638)	0,02	CI-18L-f	$4,6 \pm 0,46$	$7,6 \pm 0,83$	2000 ± 600
P(C638)	0,02	CI-9IL-f	$0,1 \pm 0,021$	$0,17 \pm 0,036$	50 ± 20
GSH	5,00	CI-9L-f	$0,091 \pm 0,017$	$0,15 \pm 0,030$	40 ± 20
GSH	0,02	CI-9L-f	$0,0022 \pm 0,00041$	$0,0036 \pm 0,00070$	$1 \pm 0,4$

Abbildung A86: Graphische Auswertung der Reaktionsausbeuten zur Bestimmung der initialen Reaktionsgeschwindigkeit zwischen den beiden Nucleophilen **P(C638)** und GSH mit den elektrophilen Liganden ($c_L = 10 \mu\text{M}$) bis zur Erreichung einer Ausbeute von 30%. Die zur Auswertung verwendete Ausgleichsgerade ist eingezeichnet. In der Tabelle sind ihre Steigung und die daraus berechneten initialen Reaktionsgeschwindigkeiten v sowie die relative Geschwindigkeit v_{rel} im Vergleich zur nicht-nachbarschafts-induzierten Reaktion des Paares GSH ($c_{GSH} = 20 \mu\text{M}$) und **CI-9L-f** aufgeföhrt.

8.5.3 Daten zur massenspektrometrischen Analyse des P(C638)-L9-Konjugates

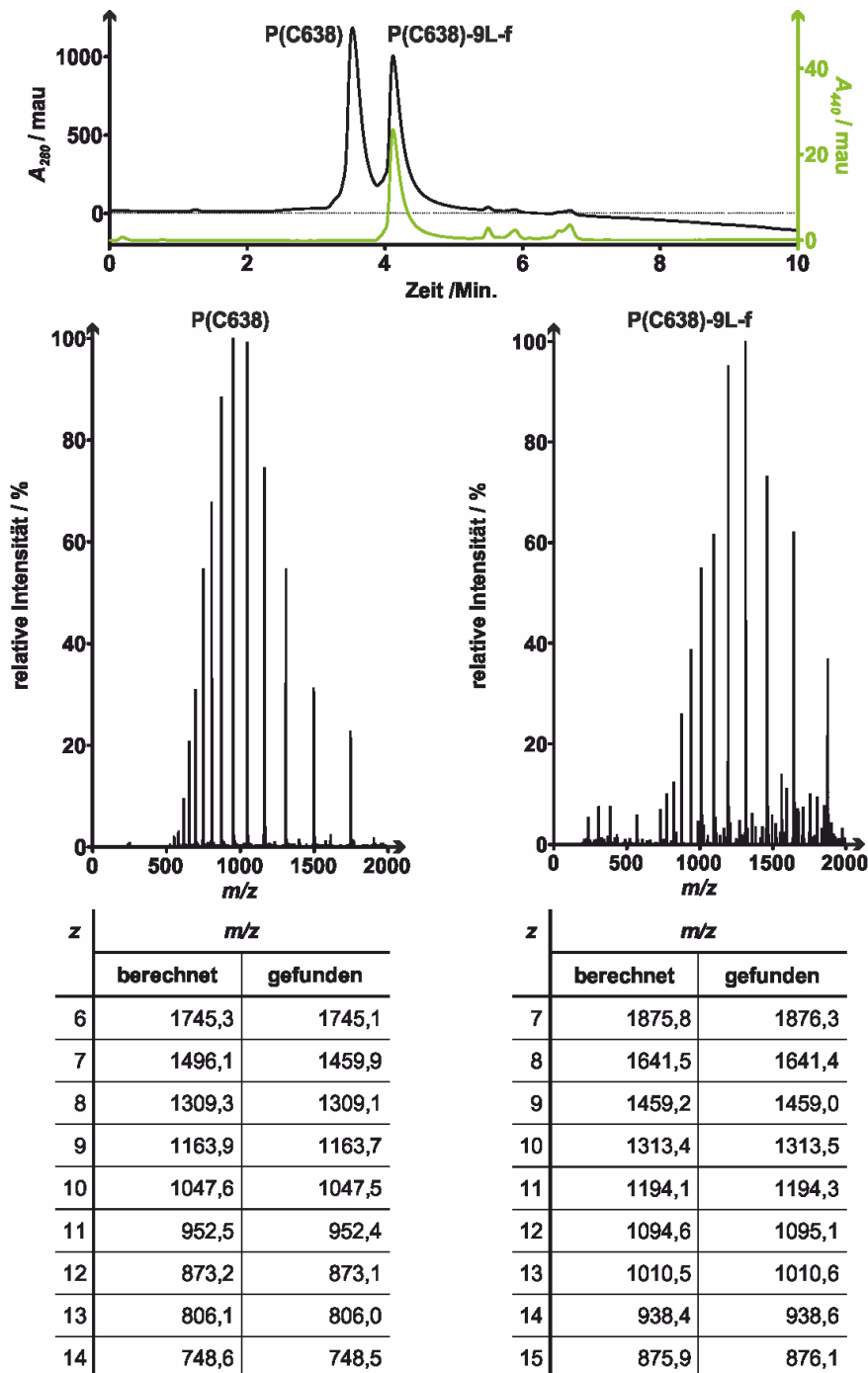


Abbildung A87: Analytische HPLC-MS Messung mit UV/Vis-Detektion einer Reaktionslösung des Protein-Ligand-Paares **P(C638)+CI-9L-f** nach 1 Stunde. Oben: Chromatogramm der HPLC bei 210 nm (schwarz) und 440 nm (grün) (Gradient: 30–95% des HPLC-Lösungsmittels B gegen das HPLC-Lösungsmittel A in 10 Min.). Unten: Massenspektren der beiden höchsten Signalauslässe aus dem HPLC-Chromatogramm mit berechneten und gefundenen m/z -Werten. Die Software der HPLC-MS berechnet daraus ein Molekulargewicht von 10464 Da bzw. 13124 Da, was in guter Übereinstimmung mit dem mittels des Programmes *ProtParam* bestimmten Molekulargewichte von **P(C638)** (10466 Da) und **P(C638)-9L-f** (13123 Da) ist.

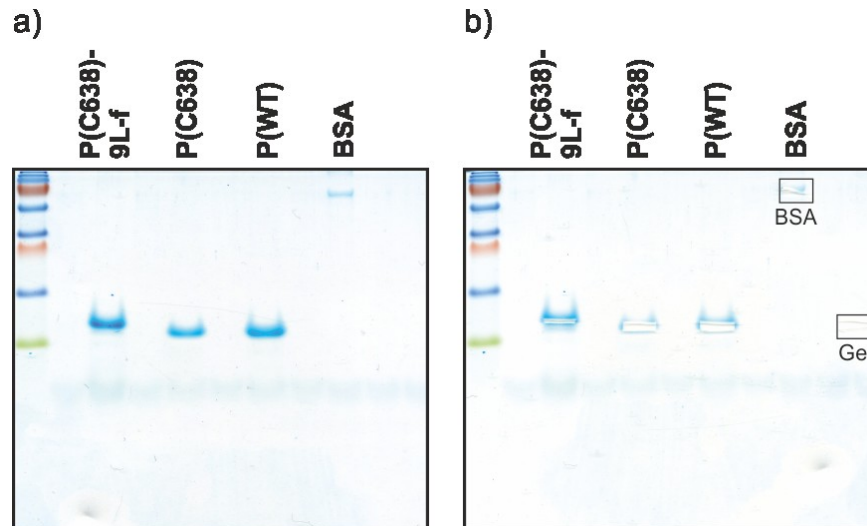


Abbildung A88: Für den *In-Gel*-Verdau verwendetes 17%-iges SDS-Polyacrylamidgel des Protein-Ligand-Konjugates **P(C638)-9L-f** sowie der parallel durchgeführten Kontrollproben a) vor und b) nach dem Ausschneiden der Proteinbanden. Die Positionen, an der die zur Kontrolle verwendeten BSA- und Gelproben genommen wurden, wurden durch Kästen markiert.

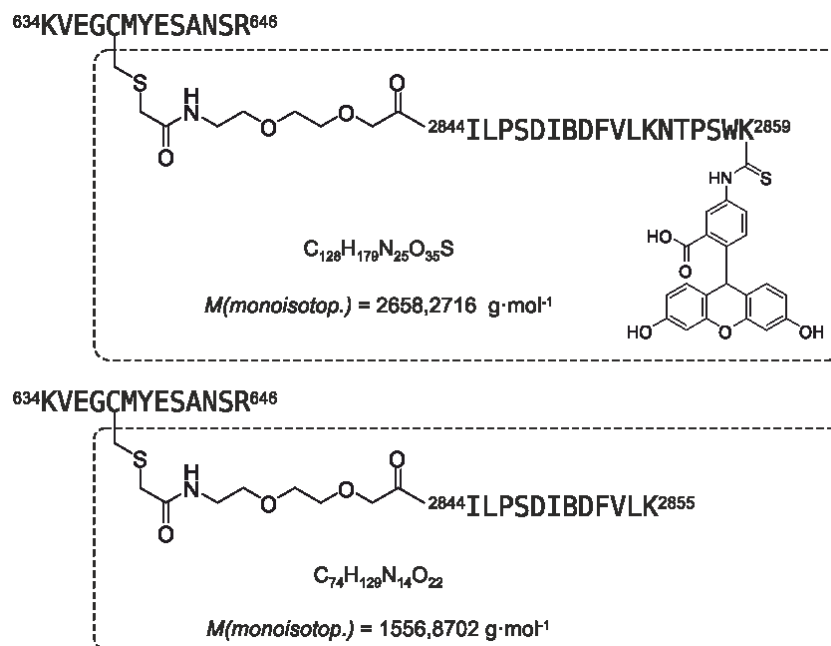


Abbildung A89: Die beiden möglichen Modifizierungen des Cystein-enthaltenen Fragmentes des Proteins **P(C638)** durch den Liganden **CI-9L-f**. Dieser kann entweder vollständig oder bis zur enthaltenen Schnittstelle der Endopeptidase Trypsin kovalent an das Protein gebunden sein. Dadurch nimmt das Molekulargewicht des tryptischen Fragmentes aus **P(C638)** um die monoisotopischen Molekulargewichte der beiden Ligandmodifizierungen ($M = 2658,2716 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ bzw. $M = 1556,8702 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) zu, wodurch es ein monoisotopisches Molekulargewicht von $M = 4002,8154 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ bzw. $M = 2901,4140 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ erreicht.

8.6 Daten zu *in cellulo* Experimenten

8.6.1 Mikroskopische Aufnahmen der Zellpermeabilitätsuntersuchungen

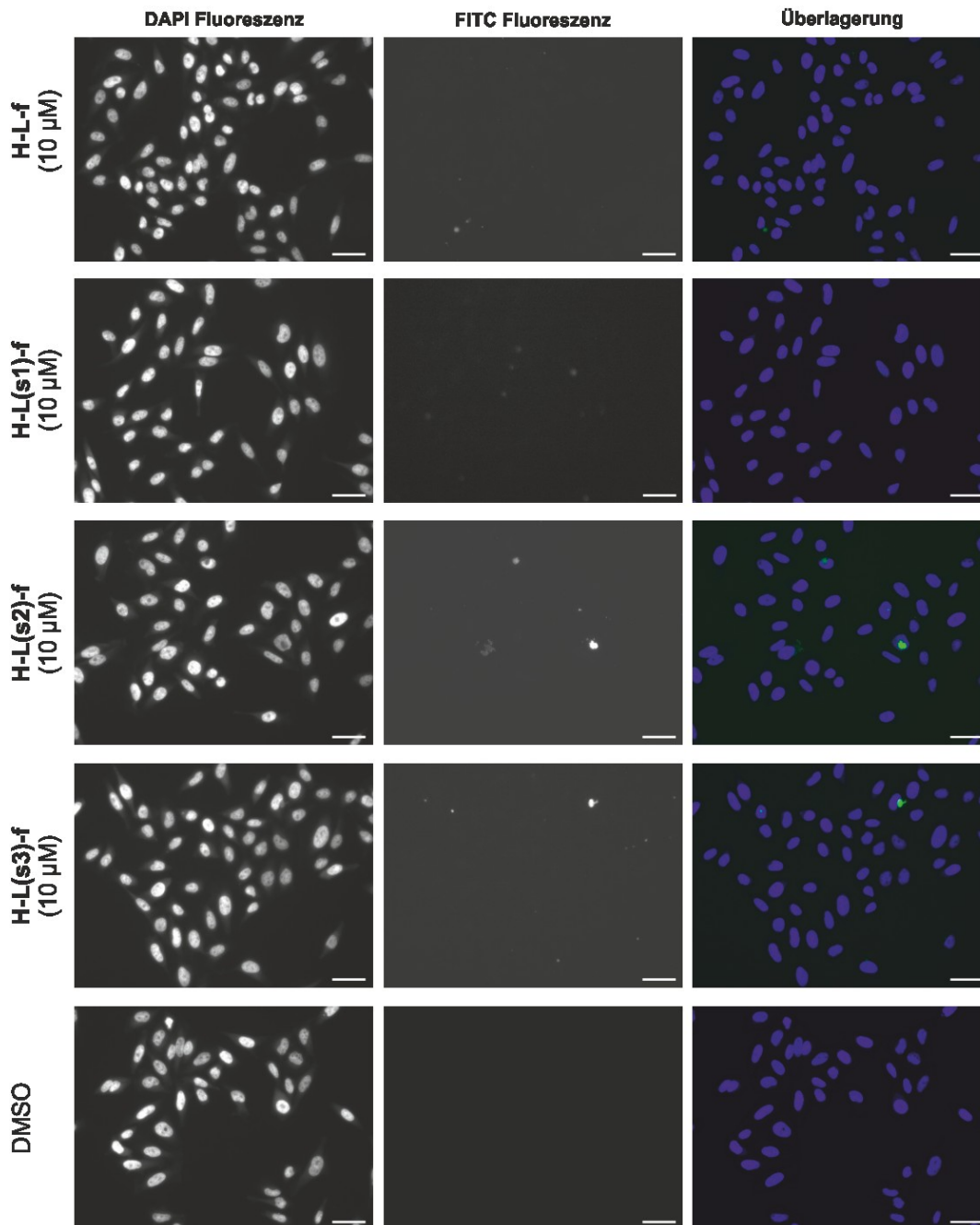


Abbildung A90: Representative Fluoreszenzaufnahmen von HeLa-Zellen zur Untersuchung der Zellpermeabilität der verbrückten Liganden **H-L(s1)-f**, **H-L(s2)-f** und **H-L(s31)-f**. Gezeigt sind die DAPI-Fluoreszenz (links, Filtereinstellungen: Filter_{ex} = G365, Strahlteiler = FT395, Filter_{em} = BP445/50), die FITC-Fluoreszenz (Mitte, Filtereinstellungen: Filter_{ex} = BP450/50, Strahlteiler = FT480, Filter_{em} = BP510/50) sowie eine Überlagerung der beiden Aufnahmen (rechts). Der Maßstab (weiß) entspricht 50 µm. Dieses Experiment wurde von Frau L. Dietrich durchgeführt.

8.6.2 Mikroskopische Aufnahmen der Zelltransfektionen

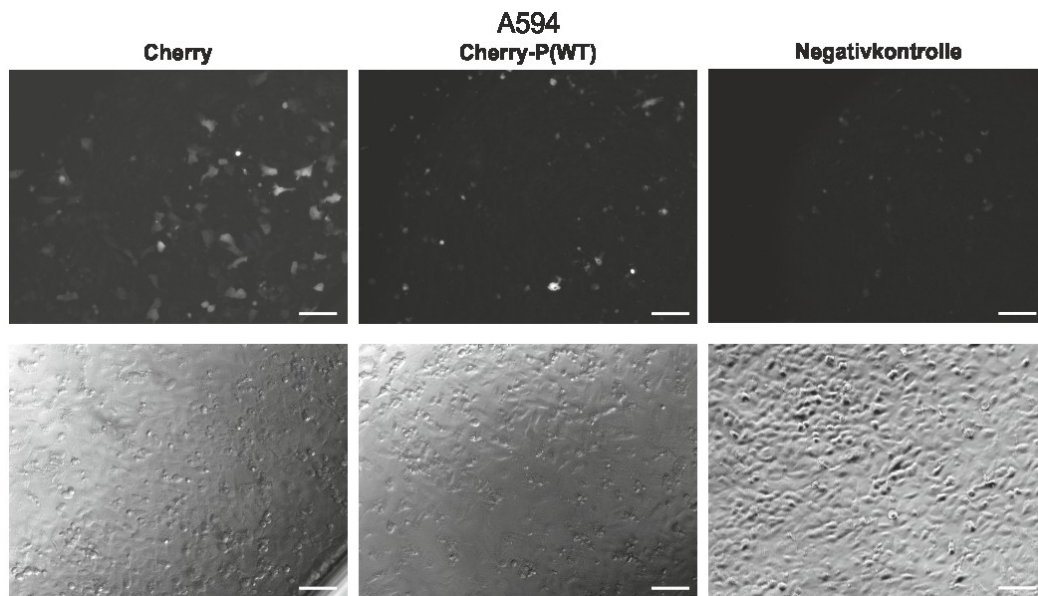


Abbildung A91: Representative Fluoreszenzaufnahmen der mCherry-Fluoreszenz (oben, Filtereinstellungen: $\text{Filter}_{\text{ex}} = \text{BP546/12}$, $\text{Strahlteiler} = \text{FT560}$, $\text{Filter}_{\text{em}} = \text{BP575-640}$) mit zugehörigen Durchlichtaufnahmen (unten) 48 Stunden nach der Testtransfektion von A594-Zellen mit den Vektoren pmCherry C1 und pmCherry-P(WT) sowie ohne Vektor. Maßstab = 100 μm .

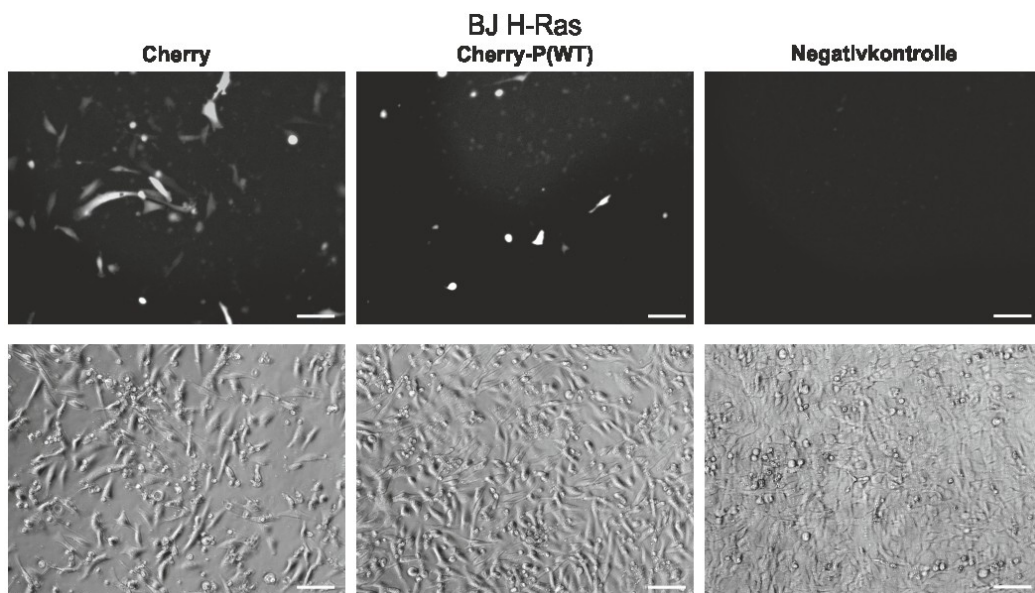


Abbildung A92: Representative Fluoreszenzaufnahmen der mCherry-Fluoreszenz (oben, Filtereinstellungen: $\text{Filter}_{\text{ex}} = \text{BP546/12}$, $\text{Strahlteiler} = \text{FT560}$, $\text{Filter}_{\text{em}} = \text{BP575-640}$) mit zugehörigen Durchlichtaufnahmen (unten) 48 Stunden nach der Testtransfektion von BJ H-Ras-Zellen mit den Vektoren pmCherry C1 und pmCherry-P(WT) sowie ohne Vektor. Maßstab = 100 μm .

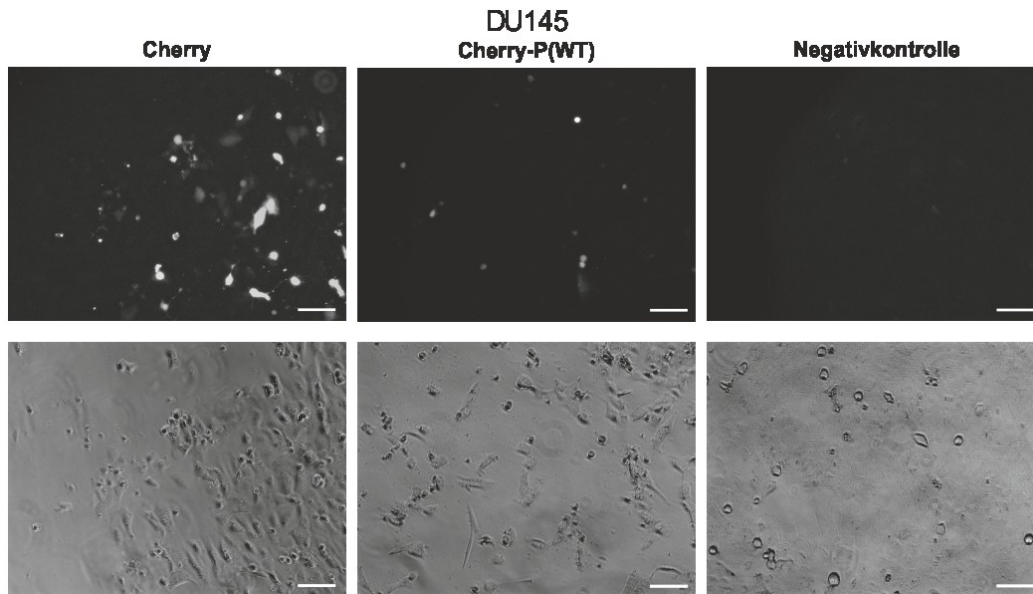


Abbildung A93: Representative Fluoreszenzaufnahmen der mCherry-Fluoreszenz (oben, Filtereinstellungen: $\text{Filter}_{\text{ex}} = \text{BP546/12}$, Strahlteiler = FT560, $\text{Filter}_{\text{em}} = \text{BP575-640}$) mit zugehörigen Durchlichtaufnahmen (unten) 48 Stunden nach der Testtransfektion von DU145-Zellen mit den Vektoren pmCherry C1 und pmCherry-P(WT) sowie ohne Vektor. Maßstab = 100 μm .

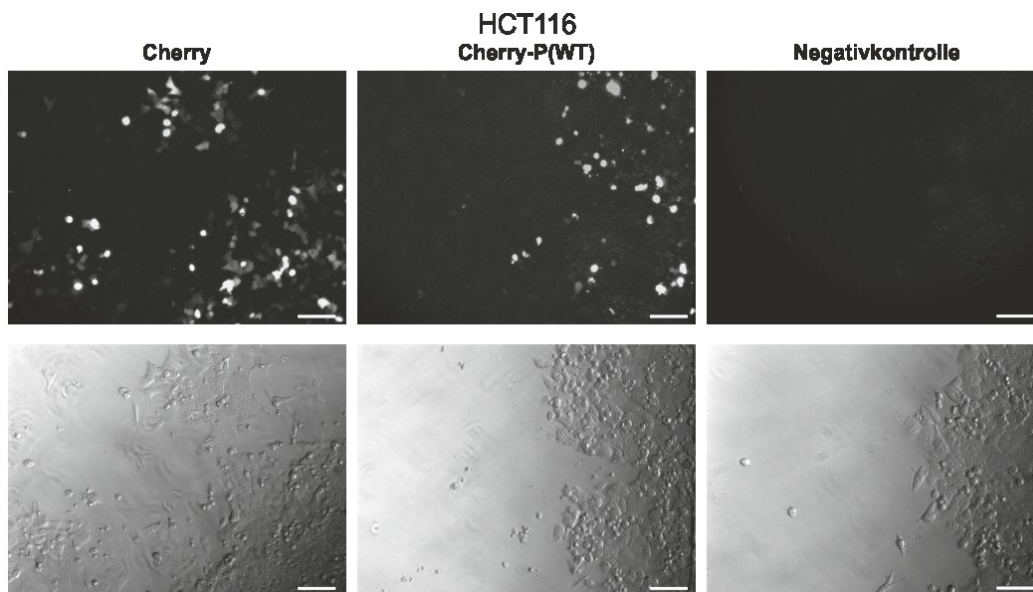


Abbildung A94: Representative Fluoreszenzaufnahmen der mCherry-Fluoreszenz (oben, Filtereinstellungen: $\text{Filter}_{\text{ex}} = \text{BP546/12}$, Strahlteiler = FT560, $\text{Filter}_{\text{em}} = \text{BP575-640}$) mit zugehörigen Durchlichtaufnahmen (unten) 48 Stunden nach der Testtransfektion von HCT11-Zellen mit den Vektoren pmCherry C1 und pmCherry-P(WT) sowie ohne Vektor. Maßstab = 100 μm .

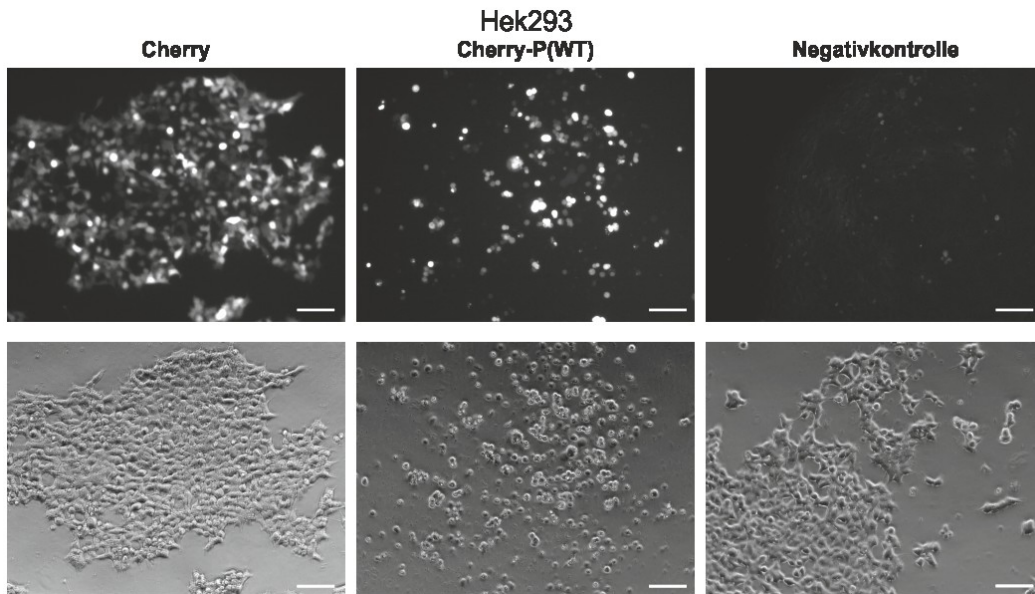


Abbildung A95: Representative Fluoreszenzaufnahmen der mCherry-Fluoreszenz (oben, Filtereinstellungen: $\text{Filter}_{\text{ex}} = \text{BP546/12}$, $\text{Strahlteiler} = \text{FT560}$, $\text{Filter}_{\text{em}} = \text{BP575-640}$) mit zugehörigen Durchlichtaufnahmen (unten) 48 Stunden nach der Testtransfektion von Hek293-Zellen mit den Vektoren pmCherry C1 und pmCherry-P(WT) sowie ohne Vektor. Maßstab = 100 μm .

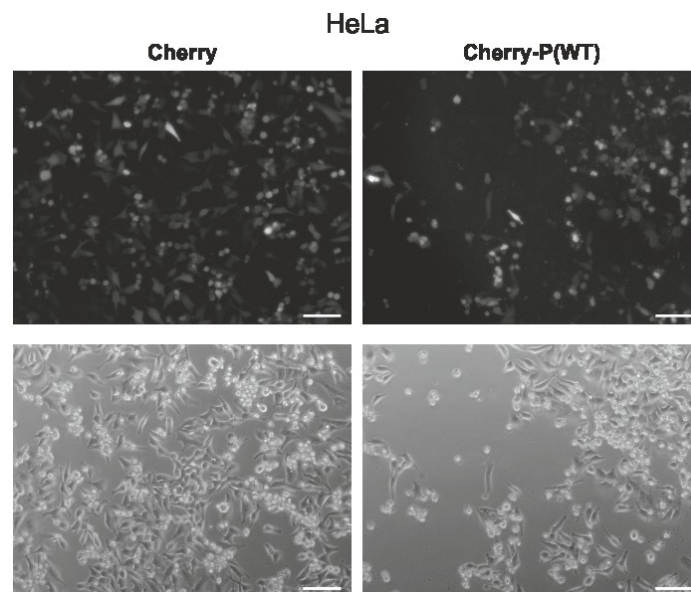


Abbildung A96: Representative Fluoreszenzaufnahmen der mCherry-Fluoreszenz (oben, Filtereinstellungen: $\text{Filter}_{\text{ex}} = \text{BP546/12}$, $\text{Strahlteiler} = \text{FT560}$, $\text{Filter}_{\text{em}} = \text{BP575-640}$) mit zugehörigen Durchlichtaufnahmen (unten) 48 Stunden nach der Testtransfektion von HeLa-Zellen mit den Vektoren pmCherry C1 und pmCherry-P(WT). Maßstab = 100 μm .

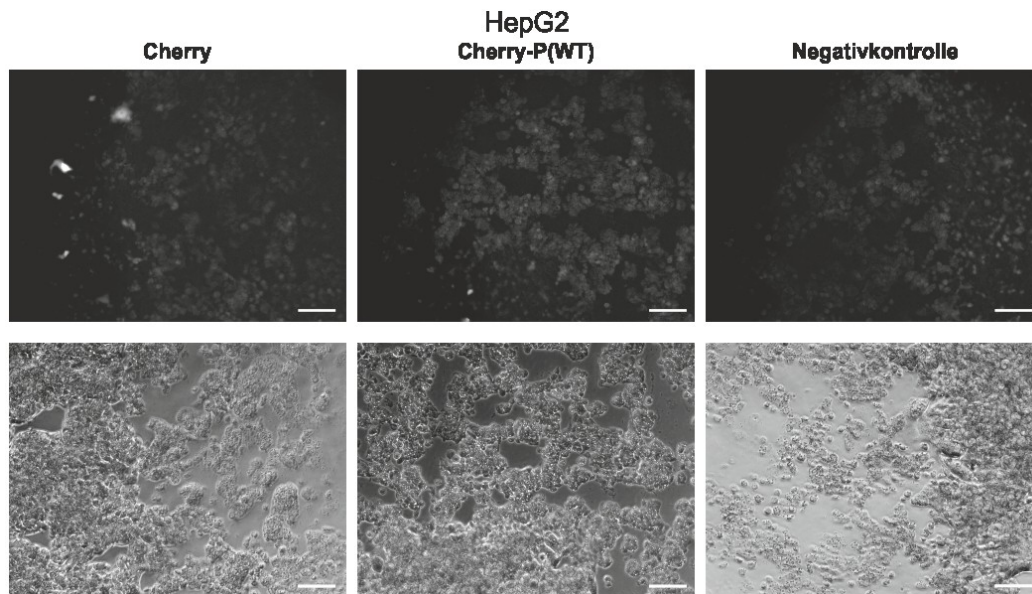


Abbildung A97: Representative Fluoreszenzaufnahmen der mCherry-Fluoreszenz (oben, Filtereinstellungen: $\text{Filter}_{\text{ex}} = \text{BP546/12}$, Strahlteiler = FT560, $\text{Filter}_{\text{em}} = \text{BP575-640}$) mit zugehörigen Durchlichtaufnahmen (unten) 48 Stunden nach der Testtransfektion von HepG2-Zellen mit den Vektoren pmCherry C1 und pmCherry-P(WT) sowie ohne Vektor. Maßstab = 100 μm .

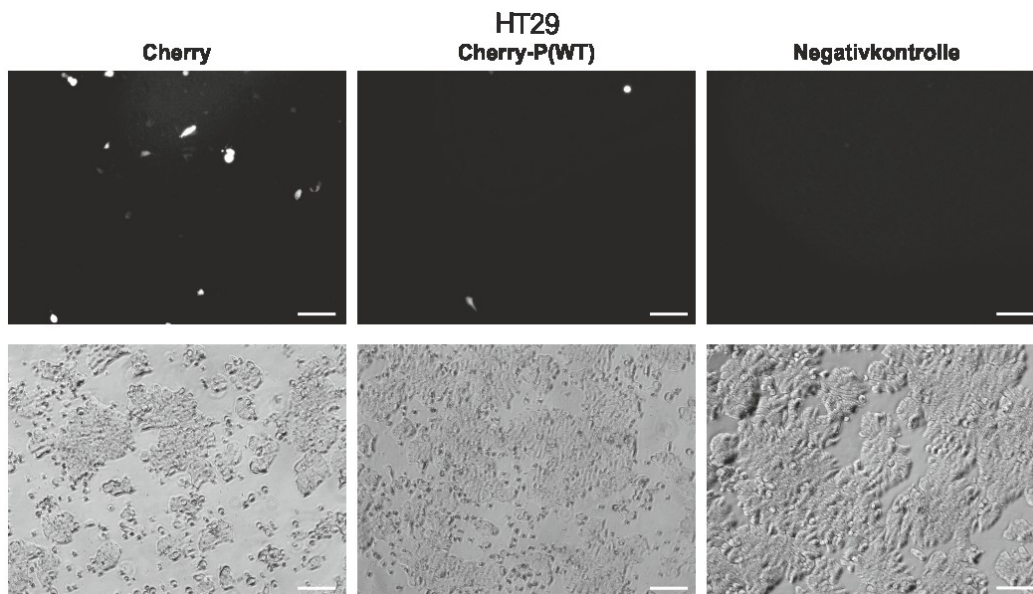


Abbildung A98: Representative Fluoreszenzaufnahmen der mCherry-Fluoreszenz (oben, Filtereinstellungen: $\text{Filter}_{\text{ex}} = \text{BP546/12}$, Strahlteiler = FT560, $\text{Filter}_{\text{em}} = \text{BP575-640}$) mit zugehörigen Durchlichtaufnahmen (unten) 48 Stunden nach der Testtransfektion von HT29-Zellen mit den Vektoren pmCherry C1 und pmCherry-P(WT) sowie ohne Vektor. Maßstab = 100 μm .

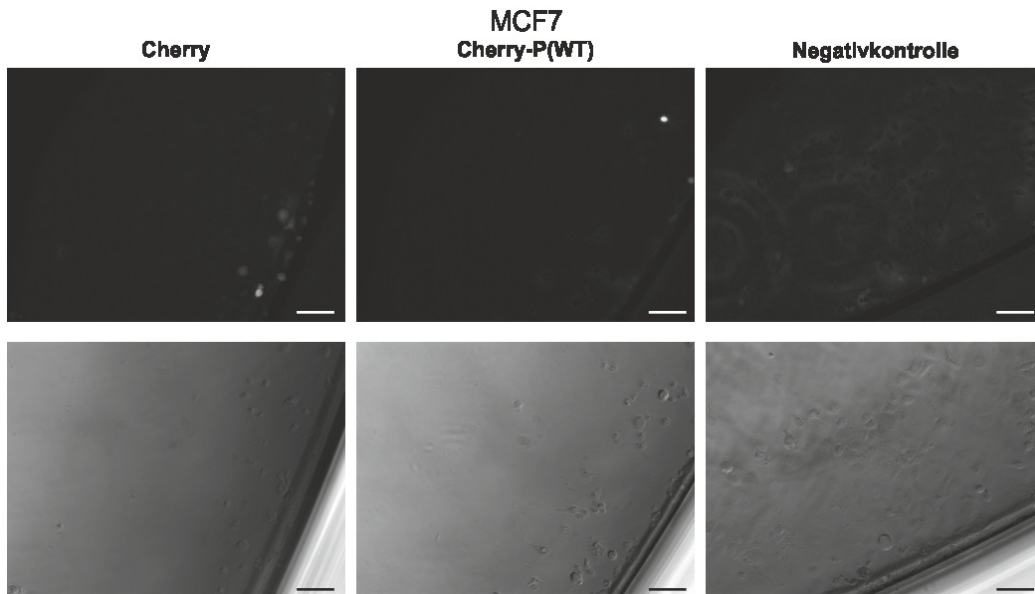


Abbildung A99: Representative Fluoreszenzaufnahmen der mCherry-Fluoreszenz (oben, Filtereinstellungen: $\text{Filter}_{\text{ex}} = \text{BP546/12}$, $\text{Strahlteiler} = \text{FT560}$, $\text{Filter}_{\text{em}} = \text{BP575-640}$) mit zugehörigen Durchlichtaufnahmen (unten) 48 Stunden nach der Testtransfektion von MCF7-Zellen mit den Vektoren pmCherry C1 und pmCherry-P(WT) sowie ohne Vektor. Maßstab = 100 μm .

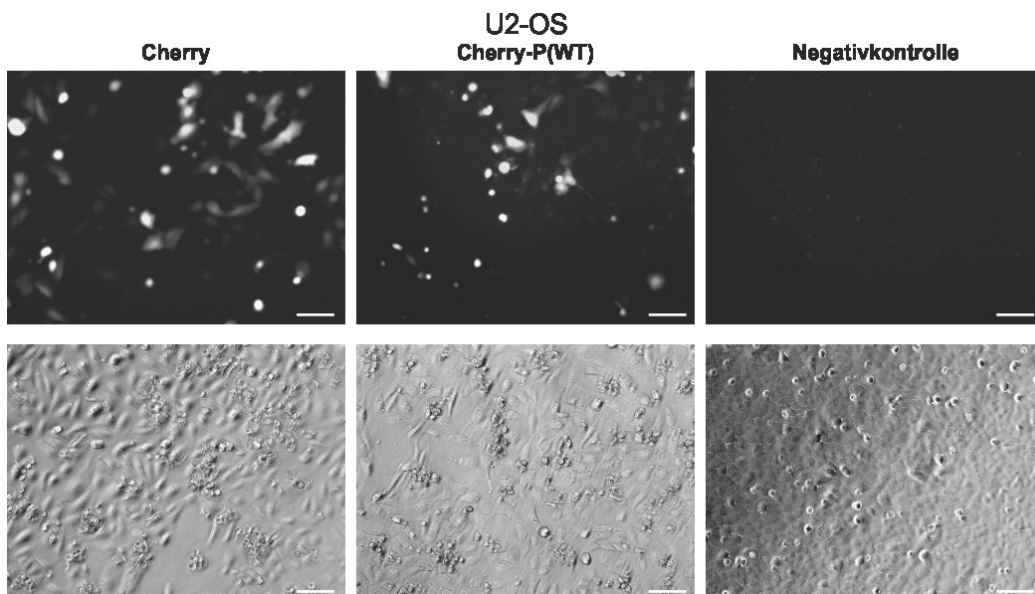


Abbildung A100: Representative Fluoreszenzaufnahmen der mCherry-Fluoreszenz (oben, Filtereinstellungen: $\text{Filter}_{\text{ex}} = \text{BP546/12}$, $\text{Strahlteiler} = \text{FT560}$, $\text{Filter}_{\text{em}} = \text{BP575-640}$) mit zugehörigen Durchlichtaufnahmen (unten) 48 Stunden nach der Testtransfektion von U2-OS-Zellen mit den Vektoren pmCherry C1 und pmCherry-P(WT) sowie ohne Vektor. Maßstab = 100 μm .

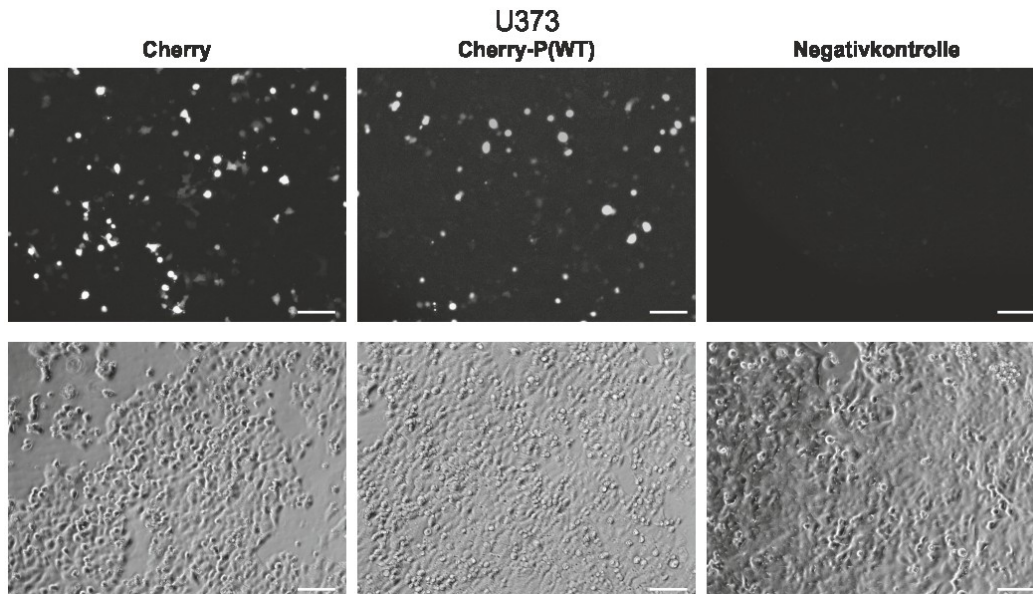


Abbildung A101: Representative Fluoreszenzaufnahmen der mCherry-Fluoreszenz (oben, Filtereinstellungen: $\text{Filter}_{\text{ex}} = \text{BP546/12}$, $\text{Strahlteiler} = \text{FT560}$, $\text{Filter}_{\text{em}} = \text{BP575-640}$) mit zugehörigen Durchlichtaufnahmen (unten) 48 Stunden nach der Testtransfektion von U373-Zellen mit den Vektoren pmCherry C1 und pmCherry-P(WT) sowie ohne Vektor. Maßstab = 100 μm .

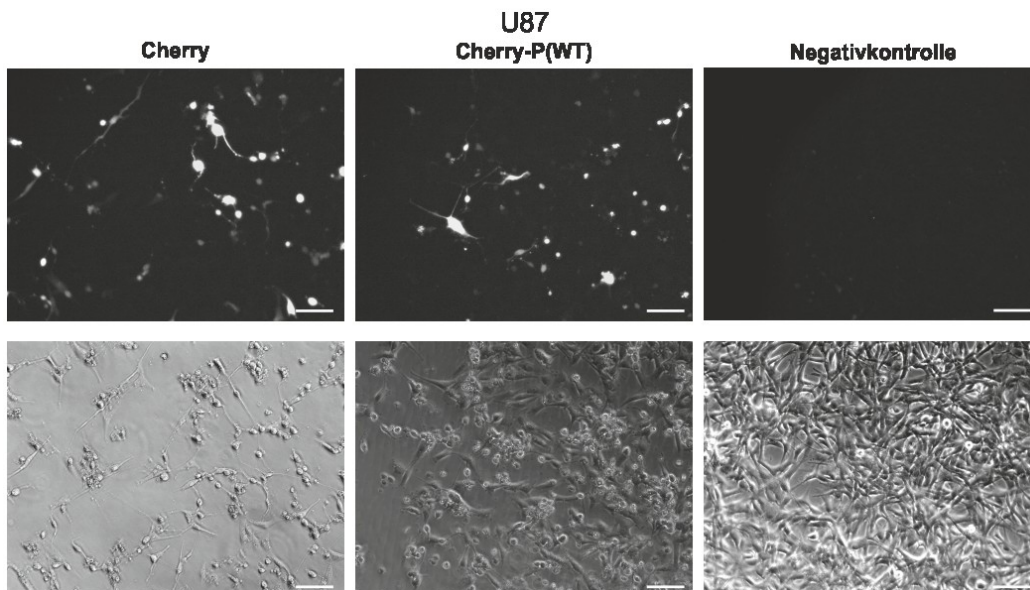


Abbildung A102: Representative Fluoreszenzaufnahmen der mCherry-Fluoreszenz (oben, Filtereinstellungen: $\text{Filter}_{\text{ex}} = \text{BP546/12}$, $\text{Strahlteiler} = \text{FT560}$, $\text{Filter}_{\text{em}} = \text{BP575-640}$) mit zugehörigen Durchlichtaufnahmen (unten) 48 Stunden nach der Testtransfektion von U87-Zellen mit den Vektoren pmCherry C1 und pmCherry-P(WT) sowie ohne Vektor. Maßstab = 100 μm .

8.6.3 Western Blots der Expressionsanalysen

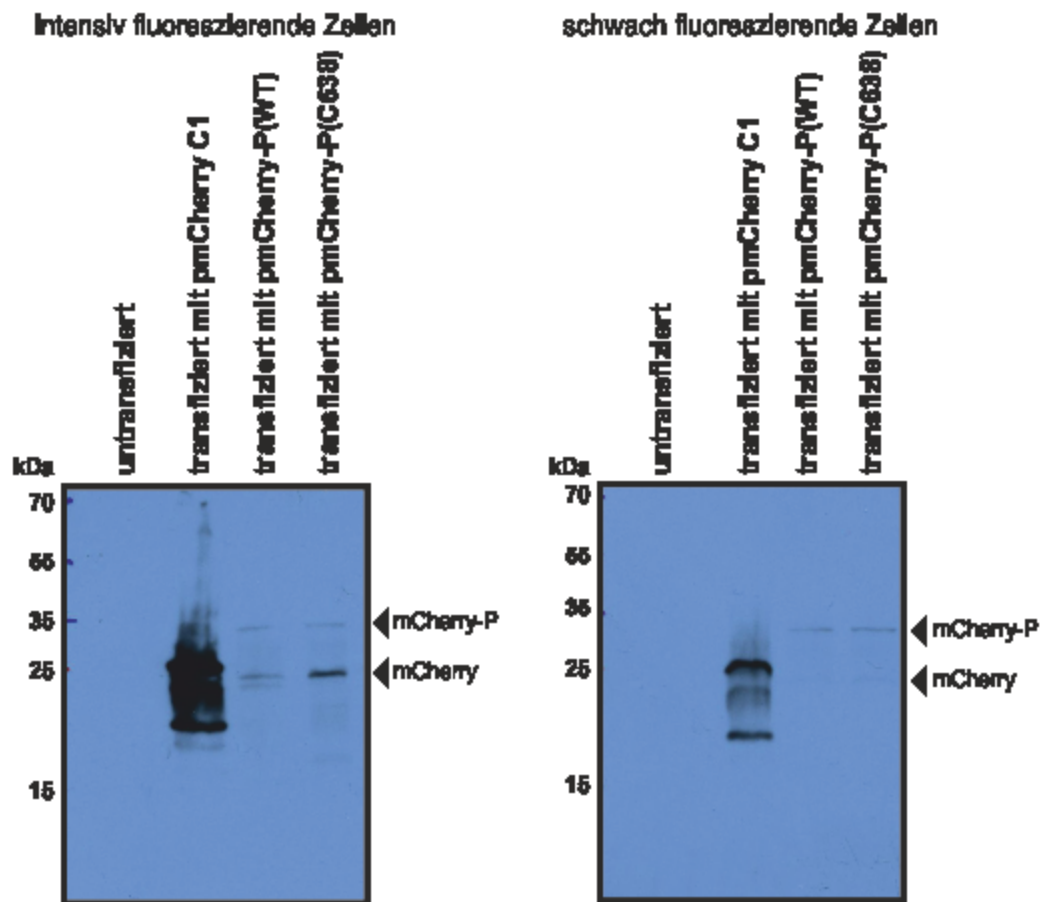


Abbildung A103: Western Blots mit chemolumineszenter Detektion der 20%-igen SDS-Polyacralamidgelen zum Expressionsvergleich von intensiv und schwach fluoreszierenden Hek293-Zellen, welche mit den Vektoren pmCherry C1, pmCherry-P(WT) und pmCherry-P(C638) stabil transfiziert wurden. Pro Bahn wurden auf beiden Gelen je 30 μg Gesamtprotein der jeweiligen Hek293-Zelllysate aufgetragen.

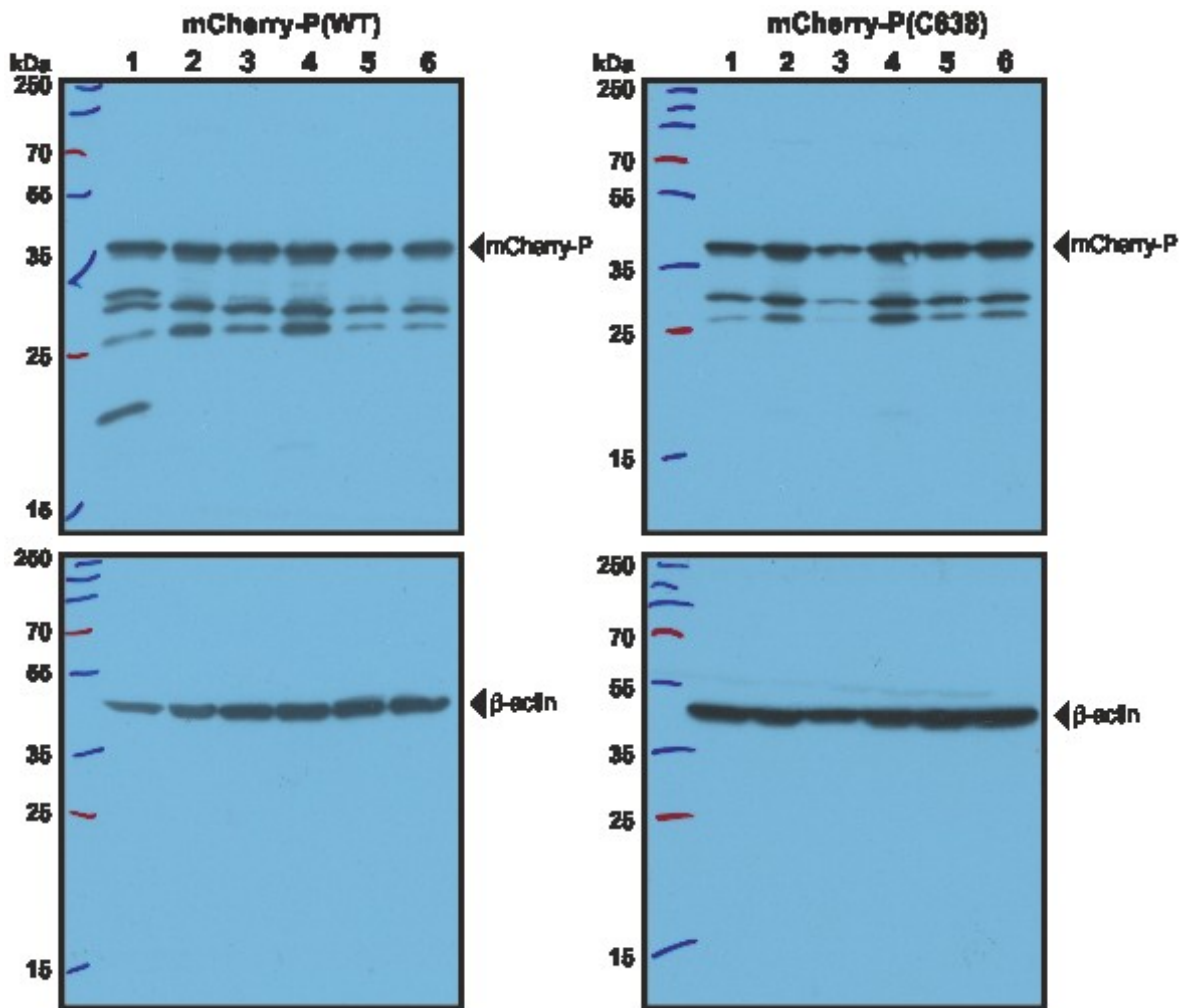


Abbildung A104: Western Blots mit chemolumineszenter Detektion der 15%-igen SDS-Polyacrylamidgele zum Expressionsvergleich von monoklonalen Hek293-Zellen, welche mit den Vektoren pmCherry-P(WT) und pmCherry-P(C638) stabil transfiziert wurden. Als Kontrolle wurde auf je einem zweiten Gel der β -actin-Gehalt der aufgetragenen Proben verglichen. Pro Bahn wurden auf beiden Gelen je 40 μ g Gesamtprotein der jeweiligen Hek293-Zelllysate aufgetragen.

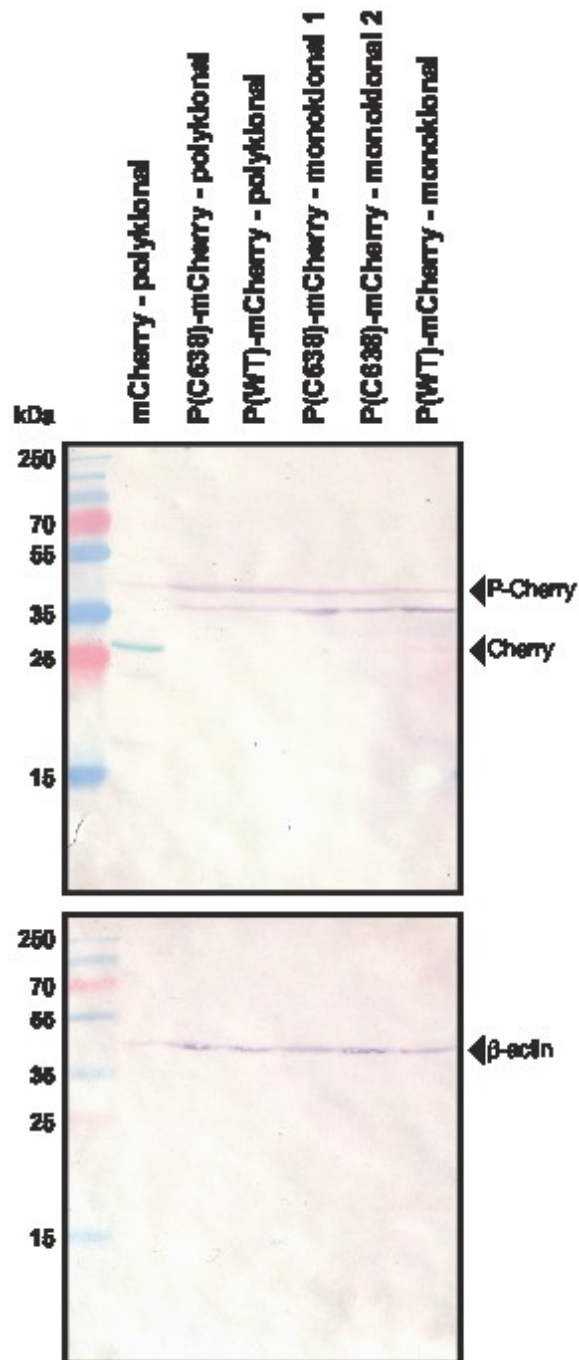


Abbildung A105: Western Blot mit Farbdetektion des 15%-igen SDS-Polyacralamidgels zum Expressionsvergleich von poly- und monoklonalen Hek293-Zellen, welche mit den Vektoren pmCherry N1, pP(WT)-mCherry und pP(C638)-mCherry stabil transfiziert wurden. Als Kontrolle wurde auf einem zweiten Gel der β -actin-Gehalt der aufgetragenen Proben verglichen. Pro Bahn wurden auf beiden Gelen je 40 μ g Gesamtprotein der jeweiligen Hek293-Zelllysate aufgetragen.

8.6.4 Aufnahmen der SDS-Polyacrylamidgele des Lysatlabelns

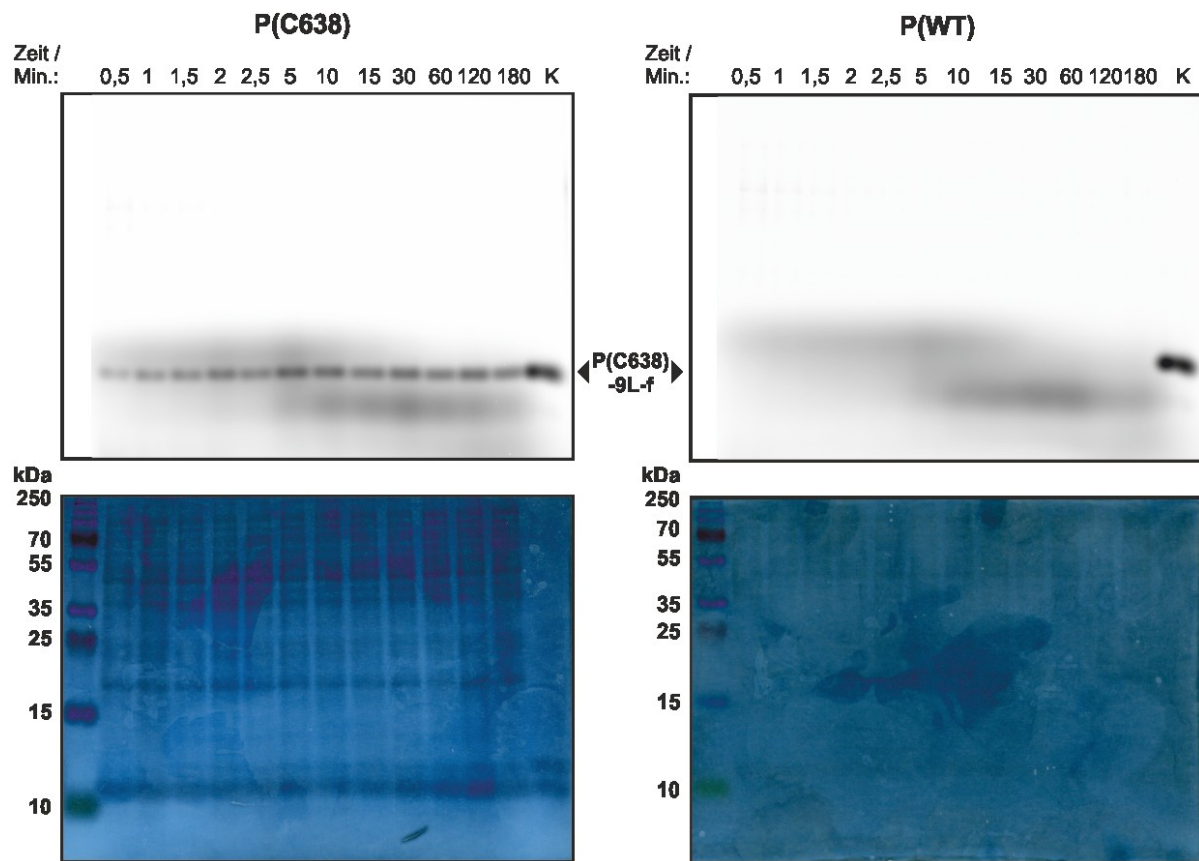


Abbildung A106: 17%-ige SDS-Polyacrylamidgele zu den Markierungsexperimenten in mit **P(C638)** oder **P(WT)** versetzten *E. coli*-Zelllysaten mit dem Liganden **CI-9L-f**. Oben: Fluoreszenzaufnahme: Das Fluorophor FITC wurde bei $\lambda_{ex} = 488$ nm angeregt und seine Emission bei $\lambda_{em} > 526$ nm detektiert. Die Aufnahme wurde mit einer Pixelgröße von 50 μm aufgenommen. Unten: Zink-Imidazol-Färbung derselben Gele.

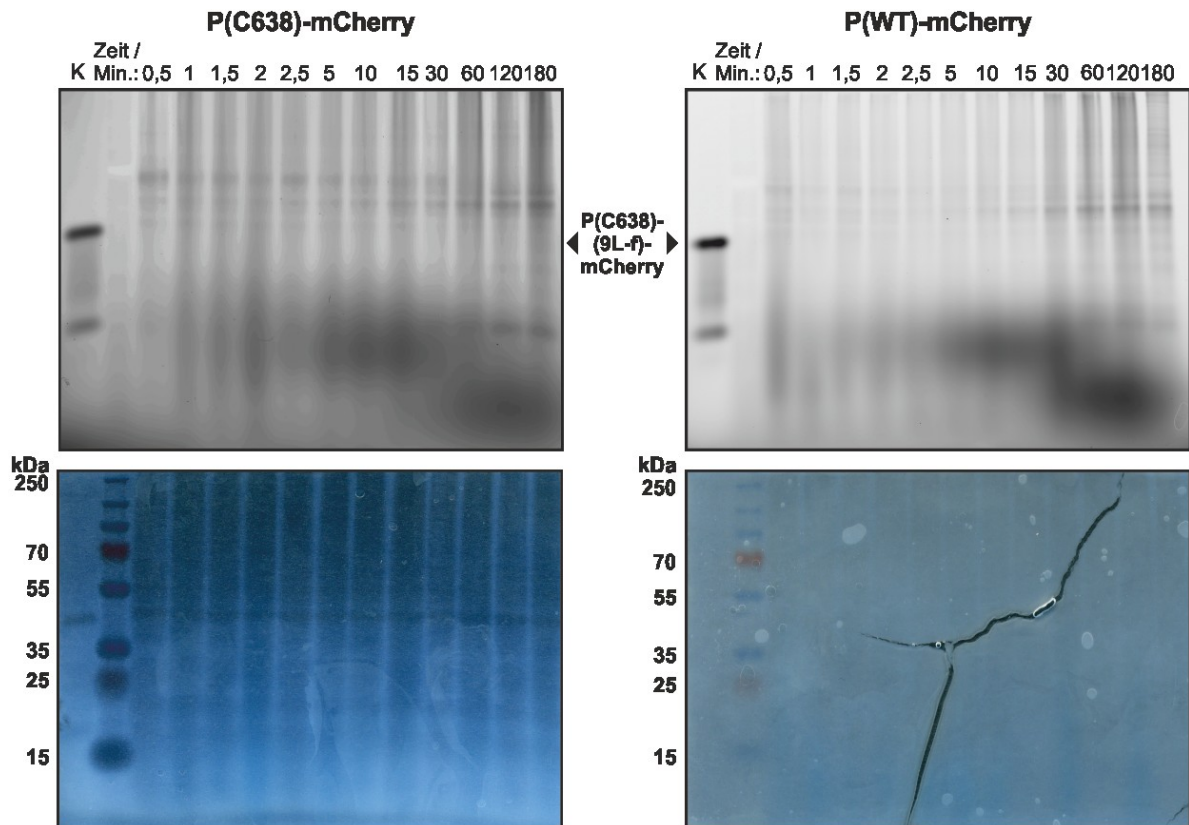


Abbildung A107: 15%-ige SDS-Polyacrylamidgele zu den Markierungsexperimenten in Hek293-Zelllysaten aus **P(C638)-** oder **P(WT)-mCherry** exprimierenden monoklonalen Zelllinien mit dem Liganden **CI-9L-f**. Oben: Fluoreszenzaufnahme: Das Fluorophor FITC wurde bei $\lambda_{ex} = 488$ nm angeregt und seine Emission bei $\lambda_{em} > 526$ nm detektiert. Die Aufnahme wurde mit einer Pixelgröße von $50 \mu\text{m}$ aufgenommen. Unten: Zink-Imidazol-Färbung derselben Gele.

8.6.5 Konfokale Mikroskopaufnahmen der Lokalisationsexperimente

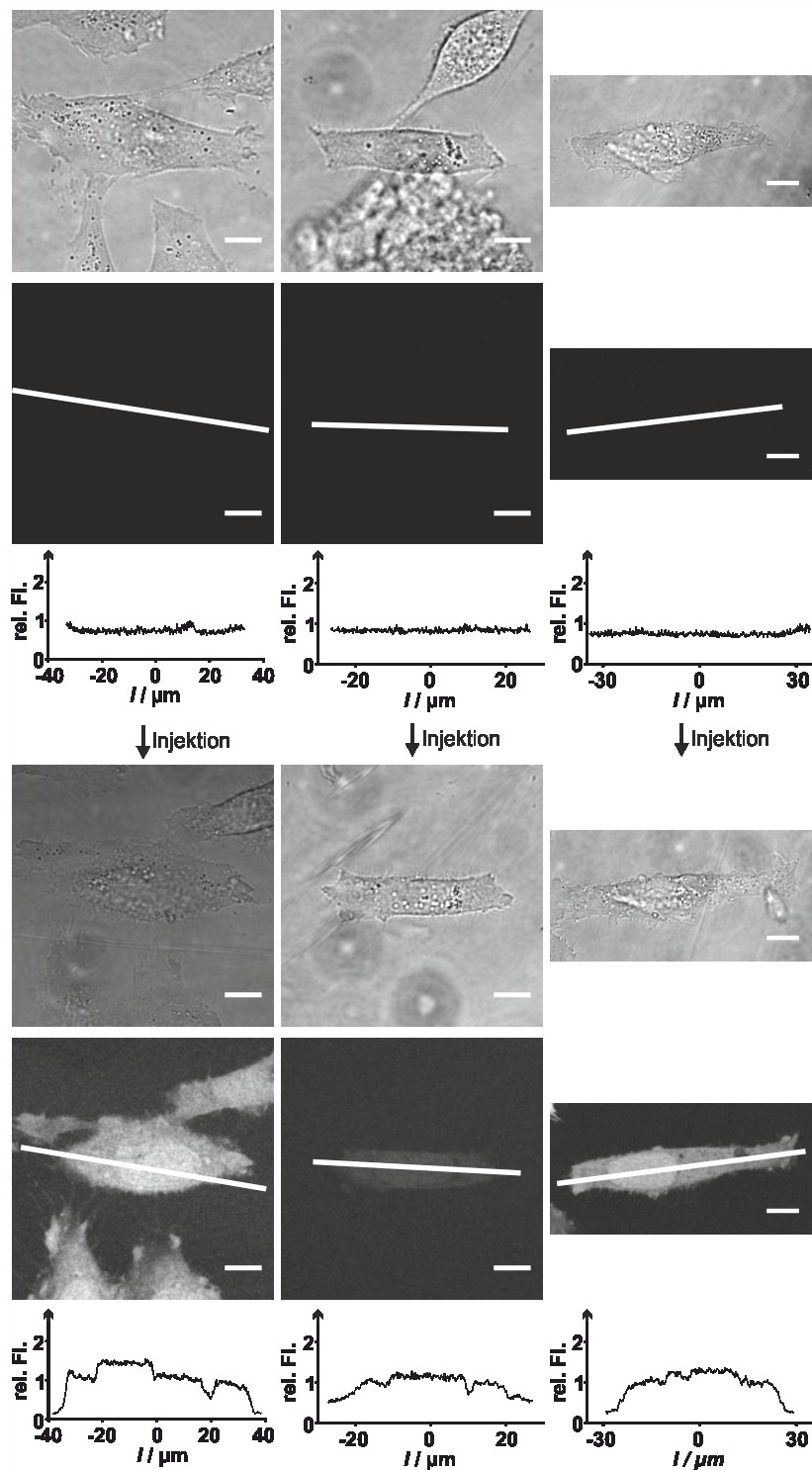


Abbildung A108: Konfokale Mikroskopaufnahmen von HeLa Zellen, die mit dem Peptid **f-9NLS** injiziert wurden. Für jede Zelle ist die Fluoreszenzaufnahme der FITC-Markierung ($\lambda_{ex} = 561 \text{ nm}$, $\lambda_{em} > 575 \text{ nm}$), die Durchlichtaufnahme und ein Graph mit der Fluoreszenzintensität entlang der weißen Linie vor (oben) und 5 Minuten nach (unten) der Injektion gezeigt. Maßstab = $10 \mu\text{m}$.

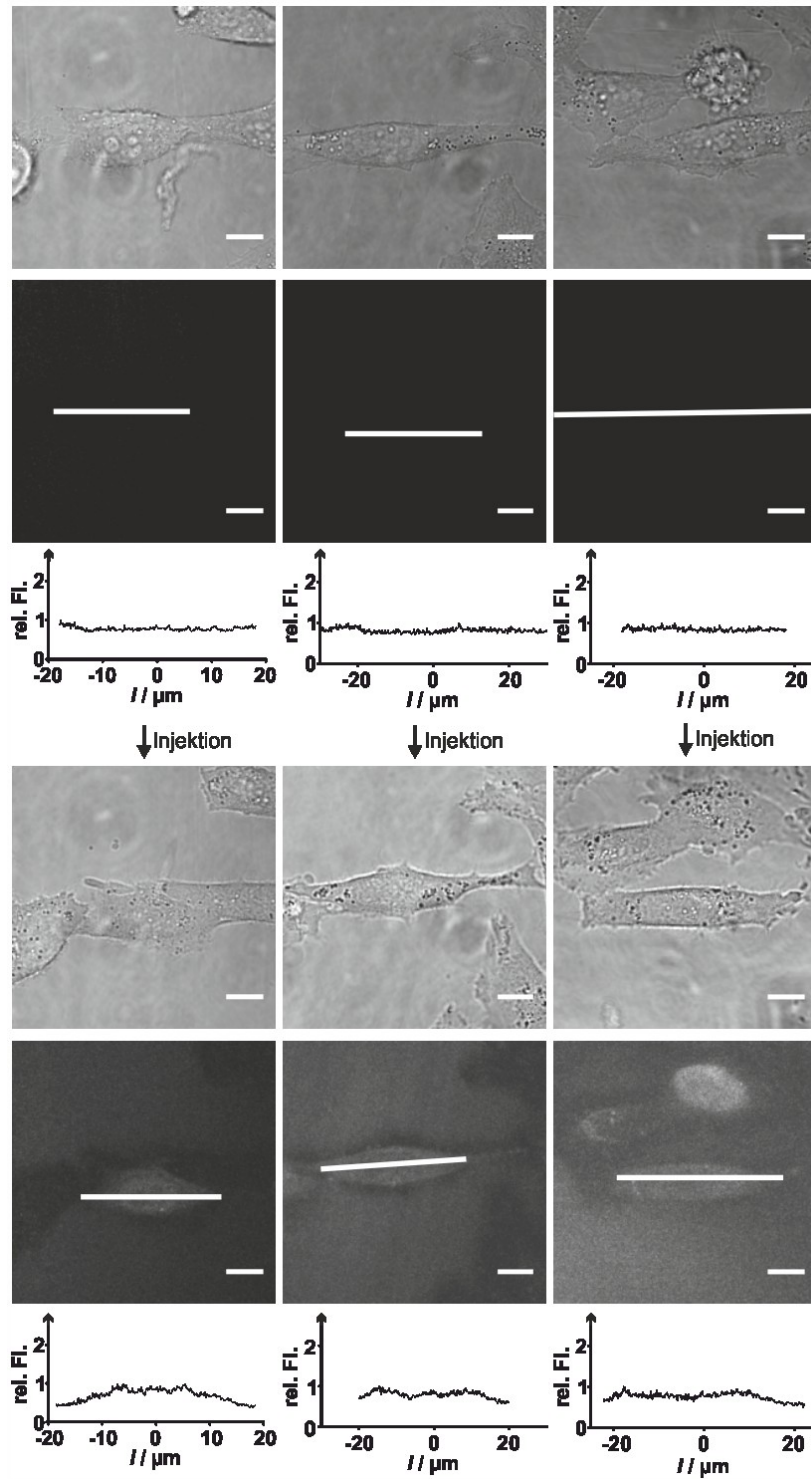


Abbildung A109: Konfokale Mikroskopie von HeLa Zellen, die mit dem Peptid **f-9MA1** injiziert wurden. Für jede Zelle ist die Fluoreszenzaufnahme der FITC-Markierung ($\lambda_{\text{ex}} = 561 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} > 575 \text{ nm}$), die Durchlichtaufnahme und ein Graph mit der Fluoreszenzintensität entlang der weißen Linie vor (oben) und 5 Minuten nach (unten) der Injektion gezeigt. Maßstab = 10 μm .

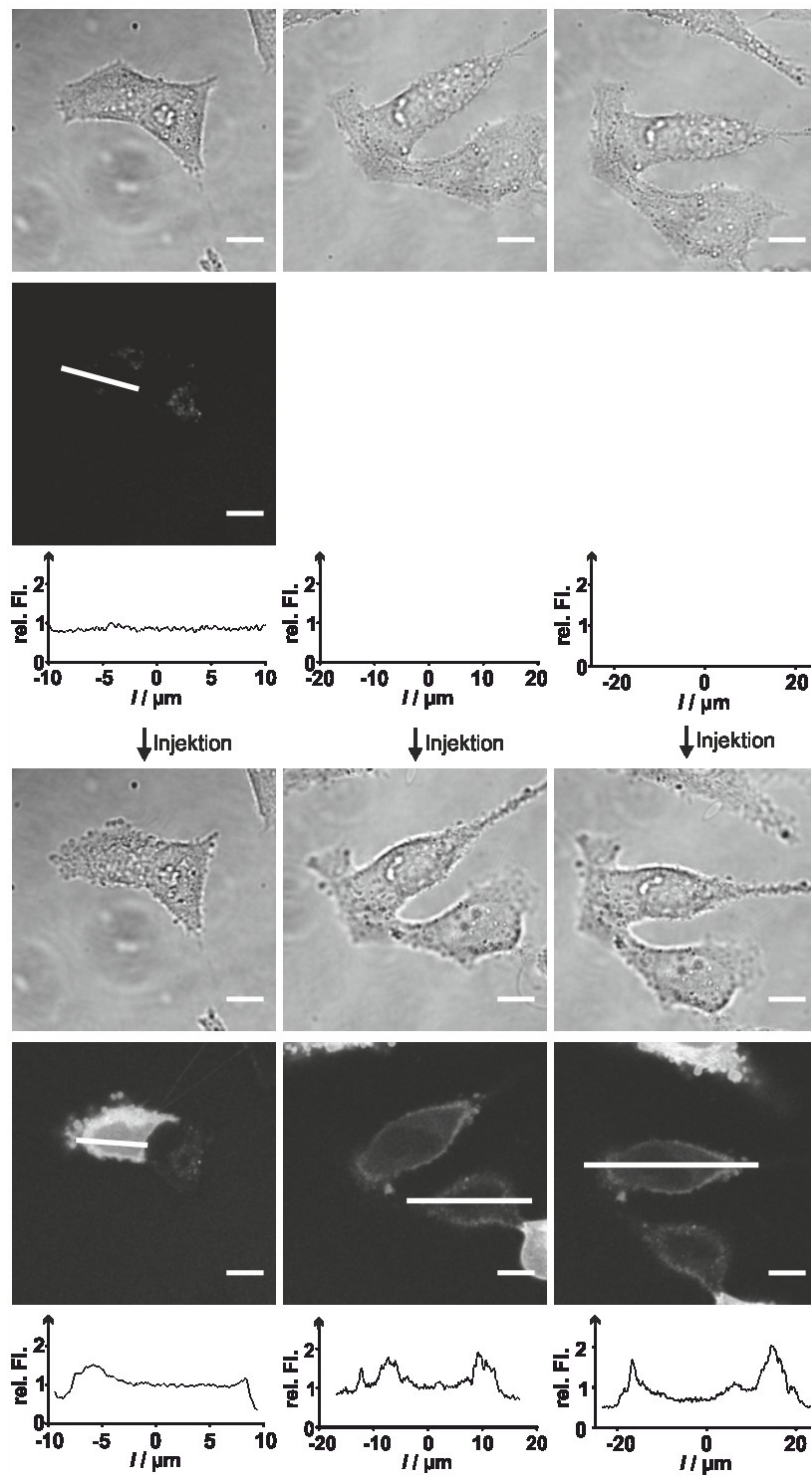


Abbildung A110: Konfokale Mikroskopaufnahmen von HeLa Zellen, die mit dem Peptid **f-9MA2** injiziert wurden. Für jede Zelle ist die Fluoreszenzaufnahme der FITC-Markierung ($\lambda_{ex} = 561 \text{ nm}$, $\lambda_{em} > 575 \text{ nm}$), die Durchlichtaufnahme und ein Graph mit der Fluoreszenzintensität entlang der weißen Linie vor (oben) und 5 Minuten nach (unten) der Injektion gezeigt. Maßstab = $10 \mu\text{m}$.

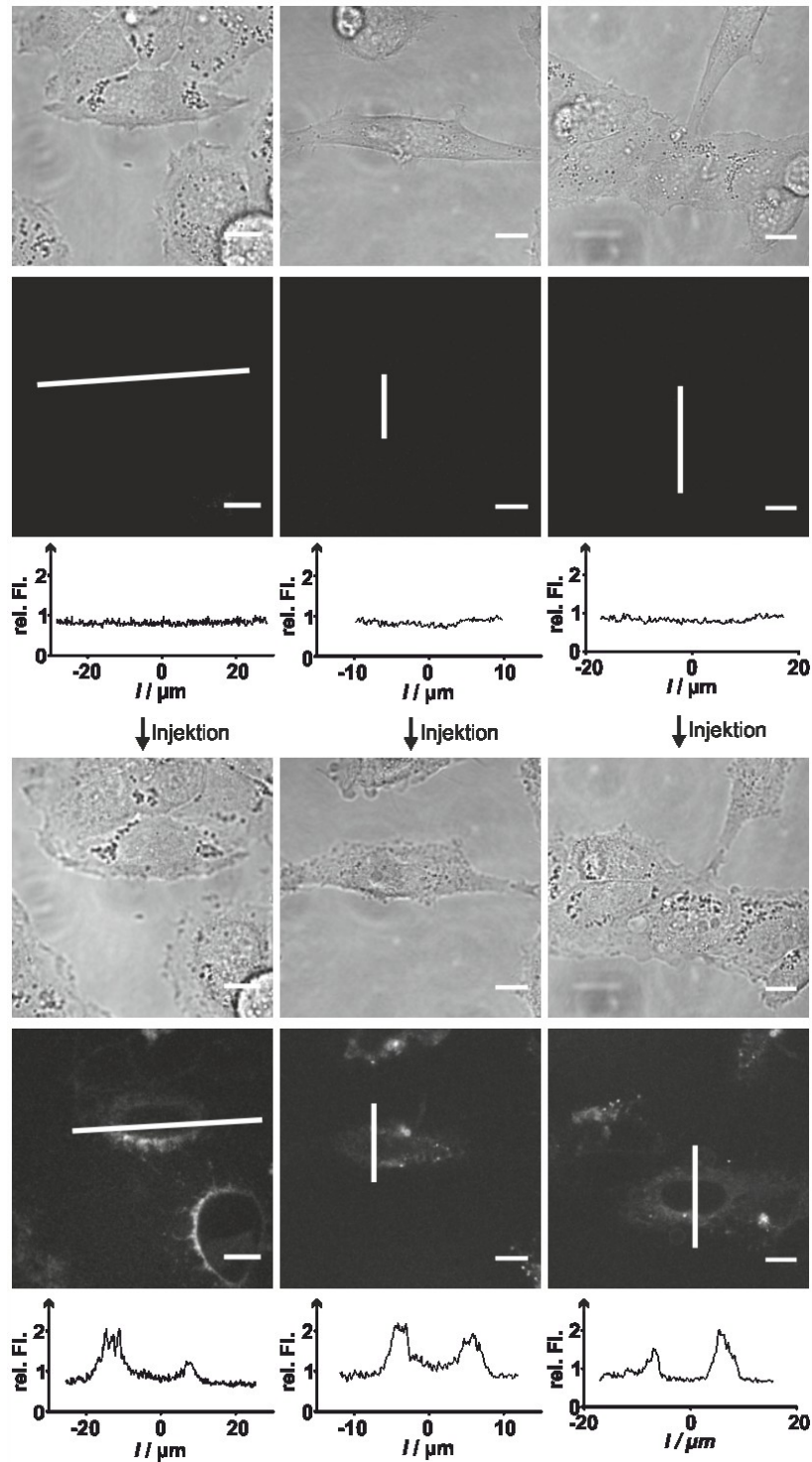


Abbildung A111: Konfokale Mikroskopaufnahmen von HeLa Zellen, die mit dem Peptid **f-9MA3** injiziert wurden. Für jede Zelle ist die Fluoreszenzaufnahme der FITC-Markierung ($\lambda_{ex} = 561 \text{ nm}$, $\lambda_{em} > 575 \text{ nm}$), die Durchlichtaufnahme und ein Graph mit der Fluoreszenzintensität entlang der weißen Linie vor (oben) und 5 Minuten nach (unten) der Injektion gezeigt. Maßstab = $10 \text{ }\mu\text{m}$.

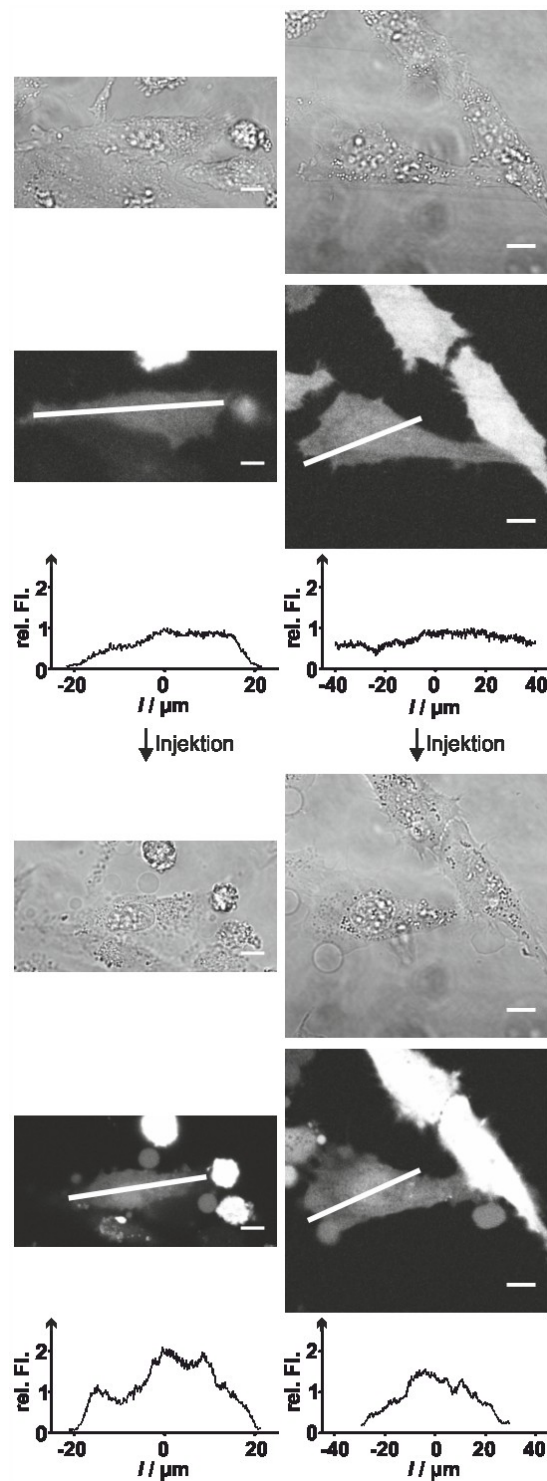


Abbildung A112: Konfokale Mikroskopaufnahmen von HeLa Zellen, die transient das Fusionsprotein **mCherry-P(C638)** exprimierten und mit dem Liganden **CI-9L-NLS** injiziert wurden. Für jede Zelle ist die Fluoreszenzaufnahme des mCherry-Proteins ($\lambda_{ex} = 561 \text{ nm}$, $\lambda_{em} > 575 \text{ nm}$), die zugehörige Durchlichtaufnahme und ein Graph mit der Fluoreszenzintensität entlang der weißen Linie vor (oben) und 60 Minuten nach (unten) der Injektion gezeigt. Maßstab = 10 μm .

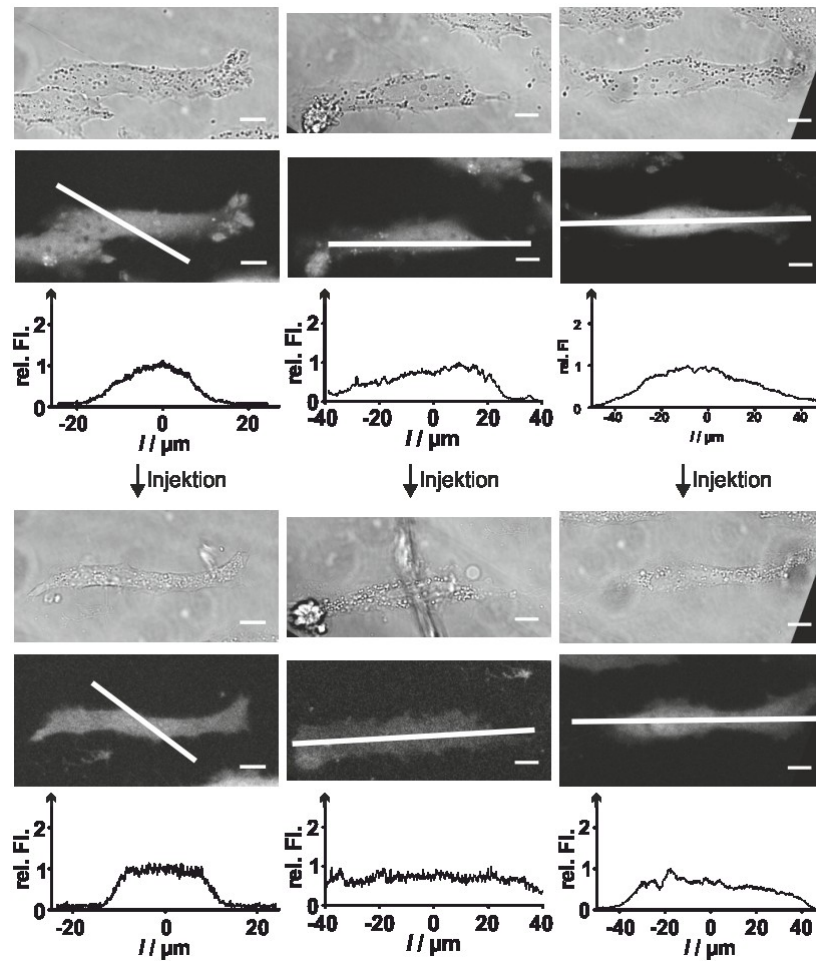


Abbildung A113: Konfokale Mikroskopie von HeLa Zellen, die transient das Fusionsprotein **mCherry-P(C638)** exprimierten und mit dem Liganden **CI-9iL-MA3** injiziert wurden. Für jede Zelle ist die Fluoreszenzaufnahme des mCherry-Proteins ($\lambda_{ex} = 561 \text{ nm}$, $\lambda_{em} > 575 \text{ nm}$), die zugehörige Durchlichtaufnahme und ein Graph mit der Fluoreszenzintensität entlang der weißen Linie vor (oben) und 60 Minuten nach (unten) der Injektion gezeigt. Maßstab = $10 \mu\text{m}$.

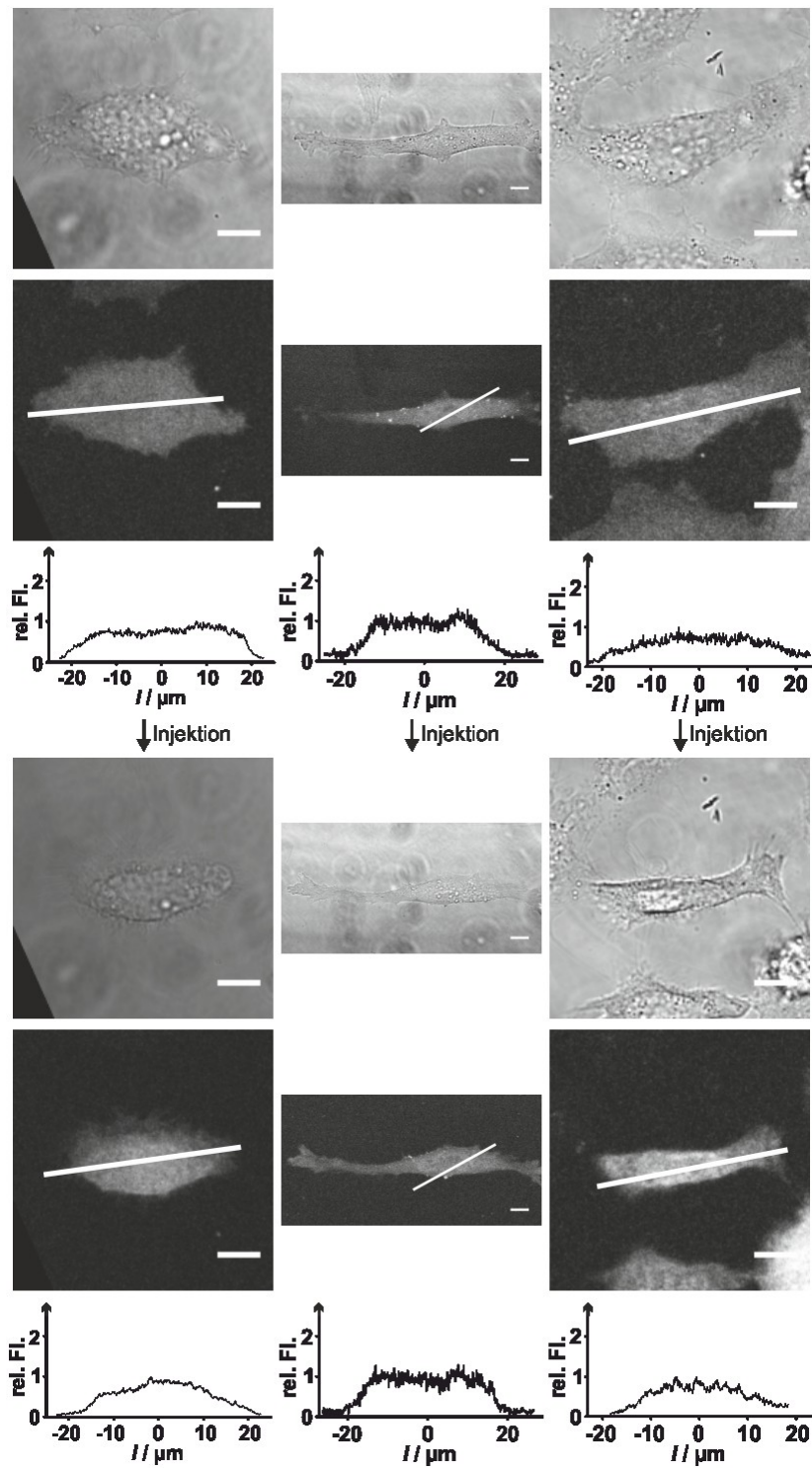


Abbildung A114: Konfokale Mikroskopieaufnahmen von HeLa Zellen, die transient das Fusionsprotein **mCherry-P(WT)** exprimierten und mit dem Liganden **CI-9L-MA3** injiziert wurden. Für jede Zelle ist die Fluoreszenzaufnahme des mCherry-Proteins ($\lambda_{ex} = 561 \text{ nm}$, $\lambda_{em} > 575 \text{ nm}$), die zugehörige Durchlichtaufnahme und ein Graph mit der Fluoreszenzintensität entlang der weißen Linie vor (oben) und 60 Minuten nach (unten) der Injektion gezeigt. Maßstab = $10 \mu\text{m}$.