



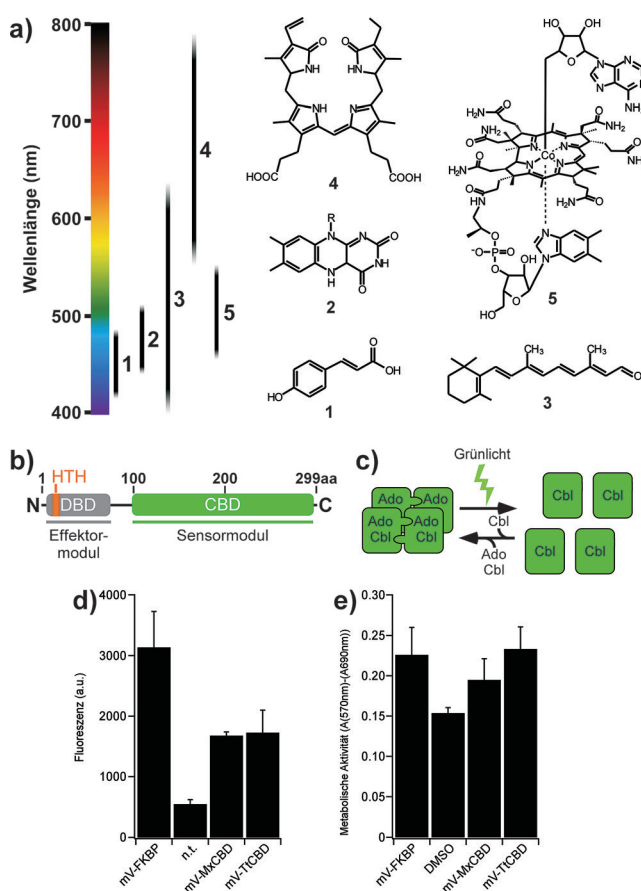
# Grünlicht-induzierte Rezeptorinaktivierung durch Cobalamin-bindende Domänen

Stephanie Kainrath, Manuela Stadler, Eva Reichhart, Martin Distel und Harald Janovjak\*

**Abstract:** Optogenetik und Photopharmakologie ermöglichen präzise räumliche und zeitliche Kontrolle von Proteinwechselwirkung und -funktion in Zellen und Tieren. Optogenetische Methoden, die auf grünes Licht ansprechen und zum Trennen von Proteinkomplexen geeignet sind, sind nicht weitläufig verfügbar, würden jedoch mehrfarbige Experimente zur Beantwortung von biologischen Fragestellungen ermöglichen. Hier demonstrieren wir die Verwendung von Cobalamin (Vitamin B12)-bindenden Domänen von bakteriellen CarH-Transkriptionsfaktoren zur Grünlicht-induzierten Dissoziation von Rezeptoren. Fusioniert mit dem Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptor 1 führten diese im Dunkeln in kultivierten Zellen zu Signalaktivität durch Oligomerisierung, welche durch Beleuchten umgehend aufgehoben wurde. In Zebrafischembryonen, die einen derartigen Rezeptor exprimieren, ermöglichte grünes Licht die Kontrolle über abnormale Signalaktivität während der Embryonalentwicklung.

Optogenetische Methoden ermöglichen präzise räumliche und zeitliche Kontrolle über molekulare Prozesse, Zellsignale und das Verhalten von Tieren, indem mikrobielle oder pflanzliche Photorezeptordomänen verwendet werden, um inter- oder intramolekulare Wechselwirkungen mit Licht zu steuern. Das derzeit verfügbare Repertoire an bekannten Domänen ermöglicht die Blaulicht- oder Rotlicht-induzierte Bildung von Proteinkomplexen,<sup>[1]</sup> hauptsächlich durch Homodimerisierung von „Light-Oxygen-Voltage-sensing“- (LOV)- und Phytochrom (PHY)-Domänen,<sup>[2]</sup> Heterodimerisierung mit Begleitproteinen im Fall von PHY und Cryptochromen (CRY)<sup>[3]</sup> oder Oligomerisierung von CRY.<sup>[4]</sup> Des Weiteren wurde Blaulicht- oder Rotlicht-induziertes Dissoziieren von Proteinkomplexen, die sich spontan in Dunkelheit bilden, für LOV-Domänen *in vitro*<sup>[5]</sup> und für PHY und CRY in

Hefe-Screens<sup>[6]</sup> beobachtet und im Fall von LOV-Domänen und manipulierten fluoreszierenden Proteinen als optogenetisches Verfahren implementiert.<sup>[7]</sup> Keine der bisher verwendeten optogenetischen Methoden zeigt jedoch ein Maximum an Empfindlichkeit gegenüber grünem Licht, das daher einen „blinden Fleck“ in optogenetischen Experimenten darstellt (Abbildung 1 a). Hier nutzen wir Cobalamin (Vitamin B12)-



[\*] S. Kainrath, E. Reichhart, Dr. H. Janovjak  
Synthetic Physiology  
Institute of Science and Technology Austria (IST Austria)  
Am Campus 1, 3400 Klosterneuburg (Österreich)  
E-Mail: harald@ist.ac.at

M. Stadler, Dr. M. Distel  
Innovative Cancer Models  
Children's Cancer Research Institute (CCRI)  
Zimmermannplatz 10, 1090 Wien (Österreich)

Hintergrundinformationen und die Identifikationsnummer (ORCID) eines Autors sind unter:  
<http://dx.doi.org/10.1002/ange.201611998> zu finden.

© 2017 Die Autoren. Veröffentlicht von Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Dieser Open Access Beitrag steht unter den Bedingungen der Creative Commons Attribution License, die jede Nutzung des Beitrages in allen Medien gestattet, sofern der ursprüngliche Beitrag ordnungsgemäß zitiert wird.

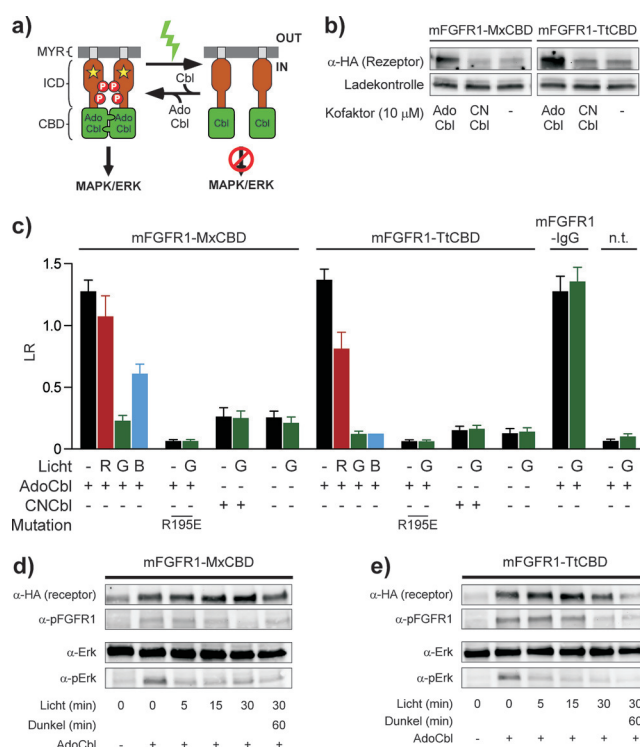
**Abbildung 1.** a) Chromophore der bekannten Photorezeptorklassen (1: *p*-Cumarinsäure, 2: Flavine, 3: Retinal, 4: Tetrapyrrole, 5: AdoCbl). b) Domänenstruktur von CarH mit lichtresponsiver CBD- und DNA-bindender Domäne (DBD, HTH: Helix-Schleife-Helix-Motiv), maßstäblich gezeichnet entsprechend CarH von *M. xanthus*. c) Im Dunkeln bilden CBDs mit gebundenem AdoCbl-Tetramere. Grünes Licht spaltet die 5'-Deoxyadenosylgruppe des Kofaktors, und der Komplex dissoziiert. d) Fluoreszenzintensität von mit mVenus (mV) markiertem MxCBD, TtCBD oder FKBP gemessen in transfizierten HEK293-Zellen, mit nicht transfizierten (n.t.) Zellen als Negativkontrolle. e) Metabolische Aktivität von HEK293-Zellen, die mV-MxCBD, mV-TtCBD oder mV-FKBP exprimieren, im Vergleich zu einer mit 5% DMSO behandelten Kontrolle mit reduzierter Viabilität. d) und e) zeigen Mittelwerte  $\pm$  SEM für drei unabhängige Experimente, jeweils in Triplikaten durchgeführt.

bindende Domänen (CBDs), um im Dunkeln gebildete Membranrezeptorwechselwirkungen durch Grünlicht zu inhibieren, und verwenden diese Domänen, um Signaltransduktionswege in menschlichen Zellen und in der Embryonalentwicklung im Zebrafisch zu kontrollieren.

Funktionelle, photochemische und strukturelle Informationen für die CBDs von CarH von *Myxococcus xanthus* und *Thermus thermophilus* sowie des verwandten LitR von *Streptomyces coelicolor* und *Bacillus megaterium* wurden in den letzten Jahren veröffentlicht und bilden einen aktiven Bereich photobiologischer Forschung (Abbildung 1b und c).<sup>[8]</sup> Diese Transkriptionsfaktoren sind lichtresponsive Repressoren der Carotinoide synthese, in denen die relativ kleinen CBDs (mit ca. 200 Aminosäuren) die Bildung von Dimer-Dimer-Komplexen im Dunkeln vermitteln. Grünes Licht induziert die photolytische Spaltung des 5'-Deoxyadenosylcobalamin(AdoCbl)-Kofaktors, was zur Dissoziation in Monomere führt (Abbildung 1c, Abbildung S1). AdoCbl ist eine aktive Form von Cobalamin, die auch in den Mitochondrien eukaryotischer Zellen gebildet wird.<sup>[9]</sup> In Säugern sind Cobalamine essenziell für die Synthese roter Blutkörperchen, Neuronenfunktion, Protein- und DNA-Synthese, und es ist keine Beeinträchtigungen durch übermäßige Cobalaminaufnahme in gesunden Personen bekannt.<sup>[10]</sup> Diese Eigenschaften veranlassten uns, das Potenzial von CBDs für im Dunkeln bestehende und durch Grünlicht inhibierte Zellsignalisierung zu untersuchen.

Zunächst verifizierten wir, dass die Supplementierung mit Cobalamin im Modellsystem der humanen embryonalen Nierenzellen (HEK293) gut vertragen wird. Nach Inkubation mit AdoCbl oder Cyanocobalamin (CNCbl, eine weitläufig verfügbare Vorstufe) bei einer Endkonzentration von 10  $\mu\text{M}$  für 24 h vorstufen wir keine nachteiligen Effekte auf die Zellviabilität feststellen (Abbildung S2; 10  $\mu\text{M}$  entspricht einer typischen Konzentration für Kofaktorzugabe<sup>[2b,3a]</sup>). Als Nächstes untersuchten wir, ob CBDs robust und ohne zytotoxische Effekte exprimiert werden können. Hierzu fusionierten wir synthetische Genfragmente der 618 bp langen CBDs von *M. xanthus* (MxCBD) und *T. thermophilus* (TtCBD), Codon-optimiert für die Expression in menschlichen Zellen,<sup>[2b]</sup> mit dem Gelb fluoreszierenden Protein mVenus (mV), um die Expression der Domänen zu quantifizieren.<sup>[11]</sup> CBD-Expressionsmengen erreichen annähernd die robust exprimierende menschliche „FKBP-Domäne (Abbildung 1d) ohne messbare zytotoxische Nebenwirkung oder Proteinaggregation (Abbildung 1e, Abbildung S3).

Als Nächstes testeten wir die lichtinduzierte Dissoziation eines CBD-Fusionsproteinkomplexes. Komplexbildung durch Ligandenbindung ist der funktionelle Mechanismus der Aktivierung von Rezeptor-Tyrosinkinase (RTKs), was unter anderem zur Aktivierung des „Mitogen-activated-protein-kinase/extracellular-signal-regulated-kinase“ (MAPK/ERK)-Signalweges führt.<sup>[12]</sup> Um die Wechselwirkung einer RTK zu kontrollieren, fusionierten wir MxCBD und TtCBD an den C-Terminus der intrazellulären Domäne (ICD) des murinen Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptors 1 (mFGFR1, eine prototypische RTK), wo bereits chemische Oligomerisierungsdomänen und Fluoreszenzproteine ohne Einschränkung



**Abbildung 2.** a) Für Grünlicht-inaktivierte Rezeptoren wurden CBDs mit der ICD von mFGFR1 fusioniert. b) Expression von mFGFR1-MxCBD und mFGFR1-TtCBD in HEK293 Zellen, mit AdoCbl oder CNCbl behandelt. c) Aktivierung des MAPK/ERK-Signalweges (LR: Lumineszenzverhältnis) durch mFGFR1 fusioniert mit CBDs oder der Fc-Domäne von IgG1 (IgG) und nicht transfizierten Zellen (n.t.) als Reaktion auf rotes (R;  $\lambda = 670 \pm 5 \text{ nm}$ ,  $I = 14 \mu\text{Wcm}^{-2}$ ), grünes (G;  $\lambda = 545 \pm 5 \text{ nm}$ ,  $I = 170 \mu\text{Wcm}^{-2}$ ) oder blaues (B;  $\lambda = 470 \pm 5 \text{ nm}$ ,  $I = 200 \mu\text{Wcm}^{-2}$ ) Licht. Gezeigte Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM für drei bis zwölf unabhängige Experimente, jeweils in Triplikaten durchgeführt. d) und e) Phosphorylierung von ERK und mFGFR1-MxCBD oder mFGFR1-TtCBD in Reaktion auf grünes Licht (0 bis 30 min und nach 60 min Regeneration im Dunkeln,  $\lambda = 545 \pm 5 \text{ nm}$ ,  $I = 170 \mu\text{Wcm}^{-2}$ ).

der Rezeptorfunktion inkorporiert wurden (Abbildung 2a).<sup>[13]</sup> Die N-terminale Ligandenbindungsdomäne wurde durch einen Myristoylierungsanker (MYR) ersetzt, um die Domäne ligandenunabhängig allein durch die CBDs zu kontrollieren.<sup>[11,13b]</sup> Zusätzlich wurde ein C-terminales Hämaggglutinin(HA)-Epitop eingebaut. Interessanterweise konnten wir feststellen, dass diese Fusionsproteine effizienter exprimiert wurden, wenn HEK293-Zellen mit AdoCbl supplementiert wurden, im Vergleich zu Zellen supplementiert mit CNCbl oder ohne Supplementierung (Abbildung 2b), da möglicherweise der Kofaktor die Expression unterstützt. Dies wurde mit den mVenus-Fusionsproteinen nicht beobachtet und deutet auf einen Unterschied in Expressionsmenge und Stabilität der Fluoreszenzprotein- und Rezeptorfusionen hin (vergleiche Abbildung S4 mit Abbildung 1d für Fluoreszenzproteinexpression mit und ohne Supplementierung).

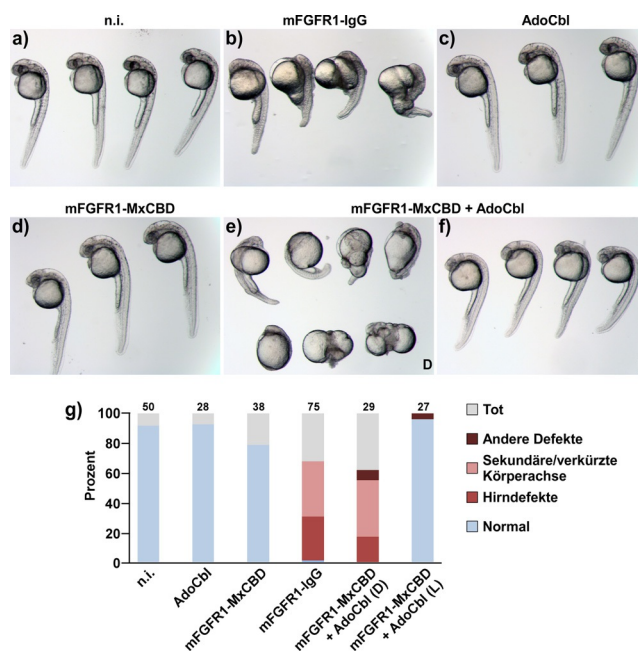
Um die lichtinduzierte Dissoziation von Rezeptorkomplexen zu zeigen, quantifizierten wir zunächst mittels Luciferase-Reporterassay die Regulierung des MAPK/ERK-Signalweges durch mFGFR1-MxCBD und mFGFR1-TtCBD (Abbildung 2c). Für beide Fusionsrezeptoren beobachteten

wir im Dunkeln eine Signalinduktion vergleichbar mit einem konstitutiv dimerisierten Rezeptor (mFGFR1-IgG, siehe Experimentelles in den Hintergrundinformationen). Signalinduktion erfolgte in Abhängigkeit von AdoCbl-Supplementierung, in Übereinstimmung mit Beobachtungen, dass der Kofaktor für die Wechselwirkung der Domänen benötigt wird.<sup>[8c]</sup> Die Signalaktivität wurde durch grüne Beleuchtung auf ein Ausmaß vergleichbar mit nicht supplementierten und nicht transfizierten Zellen reduziert. Generell verhielten sich die beiden Fusionsrezeptoren ähnlich, jedoch stellten wir fest, dass blaues Licht die Aktivität des TtCBD-Fusionsrezeptors, nicht jedoch des MxCBD-Fusionsrezeptors, ähnlich stark vermindert wie Grünlicht. Kontrollexperimente zeigten, dass die Rezeptordimerisierung für Signalaktivität im Dunkeln erforderlich ist, wie eine Ladungsumkehrsubstitution in der Kinasedomäne des Rezeptors zeigt (R195E, siehe Experimentelles). Des Weiteren ermöglichte Beleuchtung mit unterschiedlicher Intensität das Einstellen auf zwischenliegende Signalintensitäten (Abbildung S5). Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass grünes Licht die Aktivität von mFGFR1-CBD-Rezeptoren effektiv inhibiert und dass AdoCbl für die Rezeptorkomplexbildung im Dunkeln erforderlich ist.

Wir untersuchten auch die zeitliche Präzision der lichtinduzierten Rezeptor- und Signalweginaktivierung (Abbildung 2d und e). Durch Immunblot bestätigten wir, dass Rezeptoren und das im Signalweg nachgeschaltete Protein ERK im Dunkeln bei Zugabe von AdoCbl phosphoryliert sind. Grünlicht reduziert die Phosphorylierung von ERK innerhalb von 5 min, die von mFGFR1 innerhalb von 30 min, bis auf ein Grundniveau, vergleichbar mit nicht supplementierten Zellen. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass dissoziierte Rezeptoren phosphoryliert bleiben, jedoch ohne Signaltransduktionsaktivität verbleiben. Wir untersuchten auch die Wiederherstellung der Signalaktivität nach Unterbrechen der Beleuchtung. Bei einer 30-minütigen Grünlichtexposition gefolgt von 60 min Inkubation im Dunkeln erlangte mFGFR1-MxCBD bis zu 86 % seiner ursprünglichen Aktivität, für mFGFR1-TtCBD wurde keine Regeneration des Signales beobachtet (Abbildung 2d und e, Abbildung S6a und b). Die ERK-Phosphorylierung zeigte zu diesem Zeitpunkt keine Regeneration, möglicherweise aufgrund des komplexen Verhaltens dieses Signalweges.<sup>[14]</sup> Wir untersuchten den molekularen Mechanismus dieses Unterschiedes zwischen den Rezeptoren ausgehend von der Hypothese, dass die Ursache die unterschiedliche Fähigkeit der CBDs, den Kofaktor nach photolytischer Spaltung auszutauschen, sein könnte. Für TtCBD wurde gezeigt, dass der Corrinring des AdoCbl-Moleküls ein stabiles Addukt mit einem Histidinrest (H132; in CarH voller Länge) bildet, was die Freisetzung des verbrauchten Kofaktors aus seiner Bindungstasche verhindert.<sup>[8f]</sup> In der Tat konnte durch eine Substitution dieses Aminosäurerestes (H479A) eine Regeneration der Phosphorylierung erreicht werden (Abbildung S7; die Substitution des entsprechenden Glutamatrestes in mFGFR1-MxCBD durch Histidin (E499H) resultierte in verringerter Rezeptoraktivität und entzog sich detaillierter Analyse). Zusammenfassend ist es somit möglich, mit CBDs eine entweder rever-

sible oder irreversible optische Kontrolle über Proteinkomplexdissoziation zu erzielen.

Um das Potenzial der CBDs für Optogenetik in Wirbeltieren zu beurteilen, wählten wir mFGFR1-MxCBD, um die Embryogenese von Zebrafischen (*Danio rerio*) zu manipulieren, da FGF eine wichtige Signalachse in der Wirbeltierentwicklung darstellt.<sup>[15]</sup> Zunächst untersuchten wir die Funktionalität von mFGFR1 im Zebrafisch. Transiente Überexpression des konstitutiv aktiven mFGFR1-IgG verursachte Missbildungen wie Kaudalisierung des Gehirnes und Ausbildung einer sekundären Körperachse, ähnlich einem zuvor beschriebenen konstitutiv aktivem Zebrafisch-FGFR1<sup>[15a]</sup> (Abbildung 3a und b). Wir bestätigten ebenfalls, dass die Injektion von AdoCbl und mFGFR1-MxCBD alleine keinen negativen Einfluss auf die Embryonalentwicklung hatte (Abbildung 3c und d). Um die Kontrolle über die mFGFR1-MxCBD-Signalaktivität durch Grünlicht zu demonstrieren, wurden Zebrafische mit injiziertem Rezeptor und AdoCbl entweder im Dunkeln oder unter grünem Licht ( $\lambda = 545 \pm 5$  nm,  $I = 180 \mu\text{W cm}^{-2}$ ) gehalten. Im Dunkeln kam es zu Missbildungen, die vergleichbar mit mFGFR1-IgG-injizierten Tieren waren, was auf einen ähnlichen, durch den konstitutiv aktiven Rezeptor verursachten Wirkungsmechanismus hindeutet. Dagegen zeigten Embryonen, die mit Grünlicht behandelt wurden, keine abnormale Entwicklung, was belegt, dass mFGFR1-MxCBD-Signalaktivität durch Grünlicht in vivo abgeschaltet werden kann (Abbildung 3e und f). Diese Ergebnisse zeigen die Funktionalität von



**Abbildung 3.** a) Nicht injizierte (n.i.) oder im Einzellstadium injizierte Embryonen mit b) konstitutiv aktivem mFGFR1-IgG (13 pg Plasmid), c) AdoCbl (50 fmol), d) mFGFR1-MxCBD (13 pg Plasmid), e) mFGFR1-MxCBD (13 pg Plasmid) und AdoCbl (25 fmol) im Dunkeln gehalten (D) oder e) mFGFR1 (13 pg Plasmid) und AdoCbl (25 fmol) unter Grünlicht gehalten (L,  $545 \pm 5$  nm,  $I = 180 \mu\text{W cm}^{-2}$  von 1 bis 24 hpf). Bilder wurden bei 24 (a, c, d) und 30 hpf (b, e, f) aufgenommen. g) Quantifizierung der Phänotypen (Zahlen kennzeichnen die Anzahl der Embryonen).



MxCBD in einem Modellwirbeltier und deuten darauf hin, dass mFGFR1-MxCBD es in Zukunft ermöglichen kann, durch zeitliche Kontrolle die Konsequenzen von abnormaler Signalaktivität in unterschiedlichen Entwicklungsphasen zu untersuchen.

Optogenetische Methoden zur Induktion von Protein-komplexen durch blaues und rotes Licht haben einen hohen Stellenwert in der Forschung erreicht. Die hier beschriebenen CBDs ermöglichen die Dissoziation von Proteinkomplexen durch grünes Licht. Im Dunkeln ist die Aktivierung von mFGFR1-CBDs in humanen Zellen und Zebrafischembryonen mit einem konstitutiv aktiven Signal vergleichbar. Dieses führte im Fischmodell zu abnormalen Phänotypen, deren Entstehung durch Grünlicht verhindert werden konnte. Um derartige Signale mit konventionellen optogenetischen Methoden zu erzeugen, wäre eine ständige Beleuchtung notwendig, die ein Risiko des Ausbleichens, der Phototoxizität und möglicherweise die Notwendigkeit, die Tiere ständig zu beobachten, mit sich bringen würde. Die hier gezeigten Fusionsrezeptoren können durch Grünlicht reversibel oder irreversibel inhibiert werden und haben Potenzial für Mehrfarbexperimente. CBDs erweitern das Repertoire der Photorezeptordomänen in der Optogenetik und werden in Zukunft neue Herangehensweisen für zell- und tierbasierte Studien ermöglichen.

### Danksagung

Wir danken M. Spanova und K. Kolev für technische Hilfe, Susana Pascoal für Fischpflege, R. Y. Tsien für mVenus, und M. Grusch für Diskussionen. Diese Studie wurde durch eine Förderung des Siebten Forschungsrahmenprogramms der Europäischen Union (CIG-303564) unterstützt. E.R. wurde vom Doktoratsprogramm MolecularDrugTargets (Austrian Science Fund (FWF): W1232) und einem FemTech Fellowship (Österreichische Forschungsförderungsgesellschaft: 3580812) unterstützt.

### Interessenkonflikt

Die Autoren erklären, dass keine Interessenkonflikte vorliegen.

**Stichwörter:** Cobalamine · Optogenetik · Photochromie · Rezeptoren

**Zitierweise:** *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 4608–4611  
*Angew. Chem.* **2017**, *129*, 4679–4682

[1] K. Müller, W. Weber, *Mol. Biosyst.* **2013**, *9*, 596–608.

- [2] a) X. Wang, X. Chen, Y. Yang, *Nat. Methods* **2012**, *9*, 266–269; b) E. Reichhart, A. Ingles-Prieto, A. M. Tichy, C. McKenzie, H. Janovjak, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 6339–6342; *Angew. Chem.* **2016**, *128*, 6447–6450.
- [3] a) A. Levsikaya, O. D. Weiner, W. A. Lim, C. A. Voigt, *Nature* **2009**, *461*, 997–1001; b) M. J. Kennedy, R. M. Hughes, L. A. Peteya, J. W. Schwartz, M. D. Ehlers, C. L. Tucker, *Nat. Methods* **2010**, *7*, 973–975.
- [4] L. J. Bugaj, A. T. Choksi, C. K. Mesuda, R. S. Kane, D. V. Schaffer, *Nat. Methods* **2013**, *10*, 249–252.
- [5] K. S. Conrad, A. M. Bilwes, B. R. Crane, *Biochemistry* **2013**, *52*, 378–391.
- [6] R. M. Hughes, J. D. Vrana, J. Song, C. L. Tucker, *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 22165–22172.
- [7] a) H. Wang, M. Vilela, A. Winkler, M. Tarnawski, I. Schlichting, H. Yumerefendi, B. Kuhlman, R. Liu, G. Danuser, K. M. Hahn, *Nat. Methods* **2016**, *13*, 755–758; b) X. X. Zhou, H. K. Chung, A. J. Lam, M. Z. Lin, *Science* **2012**, *338*, 810–814.
- [8] a) H. Takano, S. Obitsu, T. Beppu, K. Ueda, *J. Bacteriol.* **2005**, *187*, 1825–1832; b) M. C. Pérez-Marín, S. Padmanabhan, M. C. Polanco, F. J. Murillo, M. Elías-Arnanz, *Mol. Microbiol.* **2008**, *67*, 804–819; c) J. M. Ortiz-Guerrero, M. C. Polanco, F. J. Murillo, S. Padmanabhan, M. Elías-Arnanz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 7565–7570; d) A. I. Díez, J. M. Ortiz-Guerrero, A. Ortega, M. Elías-Arnanz, S. Padmanabhan, J. García de la Torre, *Eur. Biophys. J.* **2013**, *42*, 463–476; e) R. J. Kutta, S. J. Hardman, L. O. Johannissen, B. Bellina, H. L. Messiha, J. M. Ortiz-Guerrero, M. Elías-Arnanz, S. Padmanabhan, P. Barran, N. S. Scrutton, A. R. Jones, *Nat. Commun.* **2015**, *6*, 7907; f) M. Jost, J. Fernandez-Zapata, M. C. Polanco, J. M. Ortiz-Guerrero, P. Y. Chen, G. Kang, S. Padmanabhan, M. Elías-Arnanz, C. L. Drennan, *Nature* **2015**, *526*, 536–541; g) M. Jost, J. H. Simpson, C. L. Drennan, *Biochemistry* **2015**, *54*, 3231–3234; h) H. Takano, K. Mise, K. Hagiwara, N. Hirata, S. Watanabe, M. Toriyabe, H. Shiratori-Takano, K. Ueda, *J. Bacteriol.* **2015**, *197*, 2301–2315.
- [9] R. Banerjee, *ACS Chem. Biol.* **2006**, *1*, 149–159.
- [10] a) J. Zittoun, R. Zittoun, *Semin. Hematol.* **1999**, *36*, 35–46; b) R. Carmel, *Annu. Rev. Med.* **2000**, *51*, 357–375; c) in *Dietary Reference Intakes for Thiamin, Riboflavin, Niacin, Vitamin B6, Folate, Vitamin B12, Pantothenic Acid, Biotin, and Choline*, Washington (DC), **1998**.
- [11] M. Grusch, K. Schelch, R. Riedler, E. Reichhart, C. Differ, W. Berger, A. Ingles-Prieto, H. Janovjak, *EMBO J.* **2014**, *33*, 1713–1726.
- [12] J. Schlessinger, *Cell* **2000**, *103*, 211–225.
- [13] a) D. M. Bryant, F. G. Wylie, J. L. Stow, *Mol. Biol. Cell* **2005**, *16*, 14–23; b) B. E. Welm, K. W. Freeman, M. Chen, A. Contreras, D. M. Spencer, J. M. Rosen, *J. Cell Biol.* **2002**, *157*, 703–714.
- [14] a) H. Shankaran, D. L. Ippolito, W. B. Chrisler, H. Resat, N. Bollinger, L. K. Opresko, H. S. Wiley, *Mol. Syst. Biol.* **2009**, *5*, 332; b) B. N. Kholodenko, *Eur. J. Biochem.* **2000**, *267*, 1583–1588.
- [15] a) S. Ota, N. Tonou-Fujimori, K. Yamasu, *Mech. Dev.* **2009**, *126*, 1–17; b) N. Turner, R. Grose, *Nat. Rev. Cancer* **2010**, *10*, 116–129.

Eingegangen am 9. Dezember 2016  
endgültige Fassung veröffentlicht am 20. März 2017