
Strukturelle und biochemische Einblicke in
Mechanismen des Nukleotidaustauschs von
Rab-Proteinen

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
eines Doktor der Naturwissenschaften
der Fakultät für Chemie der Universität Dortmund

angefertigt am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie
Dortmund

vorgelegt von

Dipl. Biochemiker Aymelt Itzen
Norden

Dezember 2006

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Oktober 2003 bis Dezember 2006 am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie in Dortmund unter der Anleitung von Prof. Dr. Roger S. Goody und Dr. Alexey Rak durchgeführt

1. Gutachter : Prof. Dr. R.S. Goody
2. Gutachter : Prof. Dr. R. Winter

Die Resultate der vorliegenden Arbeit konnten in Form der folgenden Veröffentlichungen publiziert werden:

1. Itzen A, Bleimling N, Ignatev A, Pylypenko O, Rak A: Purification, crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of mammalian MSS4-Rab8 GTPase protein complex; Acta Crystallograph Sect F Struct Biol Cryst Commun. 2006 Feb 1;62(Pt 2):113-6
2. Itzen A, Pylypenko O, Goody RS, Alexandrov K, Rak A: Nucleotide exchange via local protein unfolding - Structure of Rab8 in complex with MSS4; EMBO J. 2006 Apr 5;25(7):1445-55
3. Itzen A, Rak A, Goody RS: Sec2 is an efficient exchange factor for the Rab protein Sec4; J Mol Biol. 2006 Nov 3

DISSERTATION	I
INHALTSVERZEICHNIS	IV
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VII
1. EINLEITUNG	1
1.1. Vesikulärer Transport.....	1
1.2. RabGTPasen regulieren den vesikulären Transports.....	2
1.3. Strukturelle Eigenschaften von RabGTPasen	5
1.4. Mechanismen des Nukleotidaustauschs.....	9
1.4.1. Biophysikalische Eigenschaften von GEFs	9
1.4.2. Strukturelle Grundlagen des GEF-Mechanismus	12
1.5. Rab GEFs: Eine heterogene Gruppe.....	23
1.6. MSS4: Ein ungewöhnlicher Nukleotidaustauschfaktor	24
1.7. Sec2: Ein gewöhnlicher Nukleotidaustauschfaktor	28
2. ZIELSETZUNG DER ARBEIT	30
3. ERGEBNISSE	32
3.1. Der Nukleotidaustauschfaktor MSS4.....	32
3.1.1. Strategie zur Charakterisierung von MSS4	32
3.1.2. Expression und Reinigung der Komponenten MSS4, Rab8:GDP und MSS4:Rab8	34
3.1.3. Thermodynamische Betrachtungen des Nukleotidaustauschs.....	36
3.1.4. Kinetische Charakterisierung der Interaktionen zwischen Rab8, MSS4 und Guaninnukleotiden	37
3.1.5. Die Struktur des MSS4:Rab8-Komplexes.....	44
3.1.6. Die Bindungsregion des MSS4:Rab8-Komplexes	45
3.1.7. Struktureller Vergleich des MSS4:Rab8-Komplexes mit anderen GEF:GTPase- Komplexen	47
3.1.8. Molekularer Mechanismus der MSS4:Rab8-Komplexbildung und Nukleotidfreisetzung	51

3.1.9.	Aminosäuremutationen in MSS4 und Rab8 geben Hinweise auf den Nukleotidaustauschmechanismus	55
3.2.	Der Nukleotidaustauschfaktor Sec2	66
3.2.1.	Strategie der Charakterisierung von Sec2.....	66
3.2.2.	Expression und Reinigung der Komponenten zur Sec2 ₁₋₁₆₅ Charakterisierung.....	67
3.2.3.	Kinetische Untersuchung des Systems aus Sec2, Sec4 und Nukleotiden.....	72
4.	DISKUSSION	81
4.1.	Vergleich der kinetischen Parameter von Sec2 und MSS4 mit anderen GEFs	81
4.2.	Physiologische Funktion von MSS4	83
5.	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	87
6.	MATERIAL UND METHODEN	90
6.1.	Materialien	90
6.1.1.	Chemikalien	90
6.1.2.	Allgemeine Instrumentation	90
6.1.3.	Häufig verwendete Lösungen und Wachstumsmedien	91
6.2.	Analytische Methoden.....	92
6.2.1.	MALDI-TOF-Massenspektrometrie.....	92
6.2.2.	Analytische Umkehrphasenchromatographie	92
6.2.3.	Analytische Größenausschlusschromatographie	93
6.2.4.	Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese	93
6.3.	Biochemische Methoden.....	94
6.3.1.	Reinigung von MSS4, Sec2, Sec4, Rab3A und MSS4:Rab8	94
6.3.2.	Rückfaltung und Reinigung von Rab8 und der Rab8-Mutanten	96
6.3.3.	Präparativer Nukleotidaustausch an RabGTPasen	97
6.3.4.	Herstellung nukleotidfreier RabGTPasen	98
6.3.5.	Fluoreszenzmarkierung von Proteinen mit 1,5-IAEDANS	98
6.3.6.	Fällung von Proteinen	99
6.3.7.	Konzentrationsbestimmung von Proteinen	99
6.4.	Biophysikalische Methoden.....	100
6.4.1.	Bindungsstellentitration.....	100
6.4.2.	Endpunkttitration	100
6.4.3.	Transiente Kinetiken	101

6.5.	Strukturelle Methoden: Röntgenkristallographie	103
6.5.1.	Kristallisation	103
6.5.2.	Röntgenkristallographie	105
6.6.	Molekularbiologische Methoden	107
6.6.1.	Plasmide und bakterielle Stämme	107
6.6.2.	Präparation und Transformation kompetenter Zellen	107
6.6.3.	Reinigung von DNA	109
6.6.4.	PCR.....	110
6.6.5.	Restriktionsverdau von DNA.....	111
6.6.6.	DNA-Ligation.....	111
7.	LITERATURNACHWEISE	112
8.	ANHANG	122
8.1.	Herleitung Bestimmung der Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten	122
8.2.	Herleitung Bestimmung der Assoziationsgeschwindigkeitskonstanten (1-Schritt-Mechanismus)	123
8.3.	Herleitung Bestimmung der Assoziationsgeschwindigkeitskonstanten (2-Schritt-Mechanismus)	124
8.4.	Endpunkttitration: Eingabeskript zur Kurvenanpassung.....	125
9.	DANKSAGUNG.....	126
10.	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG.....	127

Abkürzungsverzeichnis

μg	Mikrogramm
μM	$\mu\text{mol/l}$, mikromolar
1,5-IAEDANS	5(((2-iodoacetyl)amino)ethyl)amino)naphthalene-1-sulfonsäure
Å	Ångstrom, 10^{-10}m
C-Terminus	Carboxyterminus
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSS4	Dominanter Suppressor von Sec4
FRET	Förster Resonanzenergietransfer
g	Erdbeschleunigung
G1-G3	guaninbasebindende Region 1-3
GAP	GTPase aktivierendes Protein
GDI	GDP Dissoziationsinhibitor
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	Guaninnukleotidaustauschfaktor
GMP	Guanosinmonophosphat
GppNHp	nicht hydrolysierbares GTP-Analog
GTP	Guanosintriphosphat
GXP	GDP oder GTP
K	Affinitätsgleichgewichtskonstante
$k_{+/-x}$	Assoziations-/Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante
K_D	Dissoziationsgleichgewichtskonstante
kDa	Kilodalton
k_{obs}	beobachtete Geschwindigkeitskonstante
M	mol/l , molar
Mant	Methylantraniloyl
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	mmol/l , millimolar
MSS4	Säugetier Suppressor von Sec4
nM	nmol/l , nanomolar
nm	Nanometer
NMR	Kernmagnetische Resonanz
N-Terminus	Aminoternus
OD	optische Dichte
PM1-PM3	Phosphat-/magnesiumbindende Region 1-3
RabF/RabSF	Rab-Familie/ Rab-Subfamilie
s	Sekunde
t	Zeit
TEV-Protease	<i>Tobacco Etch Virus Nla</i> Protease
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht (<i>weight</i>) pro Volumen

Ein- und Dreibuchstabencodes wurden gemäß den Empfehlungen der International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) and der International Union of Biochemistry (IUB)¹ als Abkürzungen für Aminosäuren verwendet.

1. EINLEITUNG

1.1. Vesikulärer Transport

Die kleinstmögliche, eigenständig lebensfähige biologische Einheit ist die Zelle. Zellen lassen sich grob in zwei strukturell und evolutionär unterschiedliche Typen einteilen, nämlich in eukaryotisch und prokaryotisch. Diese Einteilung ergibt sich aus dem lichtmikroskopisch sichtbaren Vorhandensein eines Zellkerns (*Karyon*) in den Eukaryoten, der den Prokaryoten fehlt. Neben dem namensgebenden Unterschied eines Zellkerns weisen eukaryotische Zellen weitere charakteristische Merkmale gegenüber den Prokaryoten auf: Der Durchmesser eukaryotischer Zellen liegt zum Teil weit jenseits von zehn Mikrometern, wogegen prokaryotische Organismen maximale Größen von wenigen Mikrometern erreichen. Eine weitere Eigenschaft eukaryotischer Zellen ist das Vorhandensein intrazellulärer Organelle. Diese zeigen sich in elektronenmikroskopischen Aufnahmen in Form deutlich sichtbarer Kompartimentalisierung. Zu den Organellen neben dem Zellkern gehören die Mitochondrien, das endoplasmatische Reticulum (ER), der Golgi-Apparat, Lysosomen, Peroxisomen, Endosomen, sowie in den pflanzlichen Zellen die Vakuole²⁻⁵. Die Organellen sind durch eine biologische Lipiddoppelschicht, auch Membran genannt, von den löslichen Bestandteilen des Zellplasmas (Zytosol) abgetrennt und können dadurch unabhängige Reaktionsräume bilden, deren chemische Charakteristika (wie z.B. pH-Wert, Redoxpotential, Salzkonzentration, Viskosität etc.) sich zum Teil deutlich voneinander und von denen des Zytosols unterscheiden können. Stoffaustausch mit dem extrazellulären Raum geschieht u.a. mittels Vorgängen bezeichnet als Endozytose und Exozytose. Der exozytotische Prozess hat den Transport neu synthetisierter Proteine zu ihrem Bestimmungsort zur Aufgabe, ausgehend vom ER, über den Golgi-Apparat zu Vakuole/Lysosom, Plasmamembran oder extrazellulärem Raum^{4,6}. Die Proteine werden dabei verschieden posttranslational modifiziert (Glykosylierung, Membrananheftung, peptidische Spaltung, etc.) und anschließend in das Lumen des Zielkompartimentes entlassen oder in seine Membran integriert. Die Endozytose hingegen bewerkstelligt die Aufnahme von Nahrung aus dem extrazellulären Raum, Internalisierung von Rezeptoren der Plasmamembran oder Phagozytose von Viren/Bakterien. Internalisiertes Material wird dem Frühen Endosom zugeführt, einem tubulären Netzwerk nahe der Zellperipherie^{4,7}. Mögliche Schicksale des endosomalen Inhalts sind die Wiederverwertung durch das Recycling Endosom mit der Plasmamembran als finales Ziel, oder Degradation nach Transport durch das Späte Endosom zum Lysosom (Vakuole in Pflanzen).

In Exozytose und Endozytose fließt biologisches Material durch unterschiedliche Organellen, wird dabei prozessiert und auf seine finale Funktion an seinem Bestimmungsort vorbereitet⁸

EINLEITUNG

¹⁰. Jedes Organell muss dabei seine biochemische und funktionelle Identität aufrechterhalten und darf im Laufe der Transportprozesse nicht mit dem chemisch unterschiedlichen Milieu des Zytosols in Kontakt treten, um damit undefinierte Nebenreaktionen und Nebenprodukte zu vermeiden. Die Kommunikation und der Materialfluss von Lipiden und Proteinen zwischen den Organellen finden daher über vesikelvermittelte Transportprozesse statt. Vesikel sind von einer Lipiddoppelschicht umhüllte Gebilde mit einem Durchmesser von ungefähr 50nm. Die Membran schließt den Vesikelinhalt ein und schirmt ihn von unerwünschten reaktiven Agenzien des Zytosols ab.

Der vesikelvermittelte Transportprozess kann grob in vier unterschiedliche Schritte unterteilt werden:

1. Freisetzung/Knospen des Vesikels von der Donormembran (*budding*)
2. Gerichteter Transport des Vesikels in Richtung der Akzeptormembran
3. Erkennung der Akzeptormembran und Anheften des Vesikels (*tethering*)
4. Fusion des Vesikels mit der Akzeptormembran unter Freisetzung des Inhalts in das Organellumen bzw. Integration membranständiger Proteine in die Zielmembran

Jeder dieser Schritte erfordert strikte zeitliche und räumliche Regulation, um die Spezifität vesikulärer Transportprozesse, wie z.B. Erkennung von Vesikel und Akzeptormembran, zu gewährleisten und geeignete Reaktionen auf sich wandelnde Umgebungseinflüsse zu erlauben. In der zeitlichen und räumlichen Regulation von *budding*, gerichtetem Transport, *tethering* und Fusion der Vesikel sind die RabGTPasen von großer Bedeutung¹¹⁻¹⁵. RabGTPasen unterliegen wiederum der Regulation durch regulatorische Proteine, die die RabGTPasen aktivieren oder deaktivieren, um spezifische Transportvorgänge einzuleiten bzw. zu terminieren. Da die Untersuchung der RabGTPase Aktivierung einen Hauptaspekt der vorliegenden Arbeit einnimmt, werden im folgenden Abschnitt zunächst die allgemeinen Eigenschaften von RabGTPasen einführend dargelegt.

1.2. RabGTPasen regulieren den vesikulären Transports

RabGTPasen sind guaninnukleotidbindende Proteine, die aufgrund ihrer Sequenzhomologie und strukturellen Verwandtschaft eine Unterfamilie der Superfamilie der Ras-ähnlichen GTPasen darstellen (für Übersichtsartikel siehe¹⁶). Ras-ähnliche GTPasen sind kleine Proteine mit einem Molekulargewicht von 20-30 kDa, die aufgrund ihrer guaninnukleotidbindenden Eigenschaft auch als G-Proteine bezeichnet werden. Die Ras-ähnlichen GTPasen sind im Laufe der Jahre anhand von Homologieuntersuchungen der Aminosäuresequenzen ihrem Verwandtschaftsgrad entsprechend in folgende Familien eingeteilt worden: Ras, Ran, Rac/Rho/Cdc42, Rab, Arf/Sar (für Übersichtsartikel siehe¹⁶). Ras-ähnliche Proteine unterschiedlicher Spezies besitzen in ihrer Primärsequenz von 30-55 % Homologie^{17,18}.

Jede dieser Familien reguliert dabei unterschiedliche zelluläre Prozesse, darauf hindeutend, dass jede Familie evolutionär durch eine Ur-GTPase hervorgegangen und durch Diversifikation vergrößert worden ist.

Die RabGTPasen stellen mit über 72 Mitgliedern in humanen Zellen und 11 Mitgliedern in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* die größte Familie der Ras-ähnlichen GTPasen¹⁹⁻²¹. RabGTPasen sind periphere Membranproteine, die über zumeist zwei, bisweilen einen, C-terminale Isoprenoidanker auf der zytosolischen Seite der Organellen- oder Plasmamembran verankert sind²²⁻²⁶. Das Isoprenoid wird posttranslational durch das Enzym Geranylgeranyltransferase II und das Rab Escort Protein über die Thiole von Cysteinen am C-Terminus kovalent gebunden und anschließend an die Bestimmungsmembran transportiert²⁷⁻³⁰. Nach Vollendung eines vesikulären Transportvorganges werden Rab-Proteine von dem GDP-Dissoziationsinhibitor (GDI), der die hydrophoben Isoprenoidreste von der polaren Umgebung des Zytosols abschirmt, aus der Akzeptormembran extrahiert und zur Donormembran zurück transportiert^{31,32}. Dieser Prozess erfordert wahrscheinlich das Protein GDI-Verdrängungsfaktor (*GDI displacement factor, GDI*), welche als Membranrezeptoren für Rabs dienen und vermutlich für die spezifische Organellenlokalisierung von Rabs mit verantwortlich sind³³. Da die Proteine zwischen Donor- und Akzeptormembran abhängig von ihrem Aktivierungszustand zyklisch lokalisieren und relokalisieren, spricht man bei diesem Prozess auch vom Rabzyklus (siehe Abbildung 1).

Alle Ras-ähnlichen GTPasen, so auch Rab-Proteine, fungieren als molekulare Schalter in zwei interkonvertierbaren Formen^{16,17,34} und sind in unterschiedlichste intrazelluläre Regulationsprozesse, wie z.B. Genexpression, Reorganisation des Zellzytoskellts, intrazellulärer Vesikeltransport und Transport zwischen Zytosol und Zellkern involviert. RabGTPasen sind aktiv, wenn sie das Nukleotid Guanosin triphosphat (GTP) gebunden haben, und interagieren im aktivierten Zustand mit Effektorproteinen, um ihre physiologische Funktion im vesikulären Transport zu erfüllen und den vom jeweiligen Rab-Protein regulierten Prozess zu initiieren³⁵⁻³⁷. Inaktiv sind RabGTPasen dagegen, wenn sie an Stelle von GTP das um eine Phosphatgruppe kleinere Nukleotid Guanosin diphosphat (GDP) gebunden haben; im Komplex mit GDP befindet sich ein Rab-Protein vermutlich ruhend in der für es spezifischen Donormembran^{31,32}.

Die Nukleotidzustände von Ras-ähnlichen GTPasen im Allgemeinen sind interkonvertierbar und werden mit Hilfe akzessorischer Proteine reguliert. Der aktive (GTP-gebundene) Zustand wird zeitlich durch die intrinsische GTPase-Aktivität der Proteine limitiert, wodurch GTP hydrolytisch zu GDP und anorganischem Phosphat gespalten wird. Der inaktive, GDP-gebundene Zustand wird durch die GTPase-Aktivität wiederhergestellt. Diese Aktivität variiert unter Ras-ähnlichen GTPasen sehr, im Allgemeinen ist die Hydrolyserate aber als klein anzusehen (reichend von $2 \cdot 10^{-3} \text{s}^{-1}$ für Rab5 bis $5 \cdot 10^{-6} \text{s}^{-1}$ für Rab6^{38,39}), wodurch zur

EINLEITUNG

effizienten Inaktivierung der Rabs weitere Faktoren notwendig werden. Daher werden GTPase-aktivierende Proteine (GAP) zur Stimulierung der Hydrolysegeschwindigkeit benötigt, um den aktiven Zustand zeitlich zu begrenzen und schädliche Effekte durch dauerhafte Aktivierung einer Ras-ähnlichen GTPase zu verhindern⁴⁰⁻⁴².

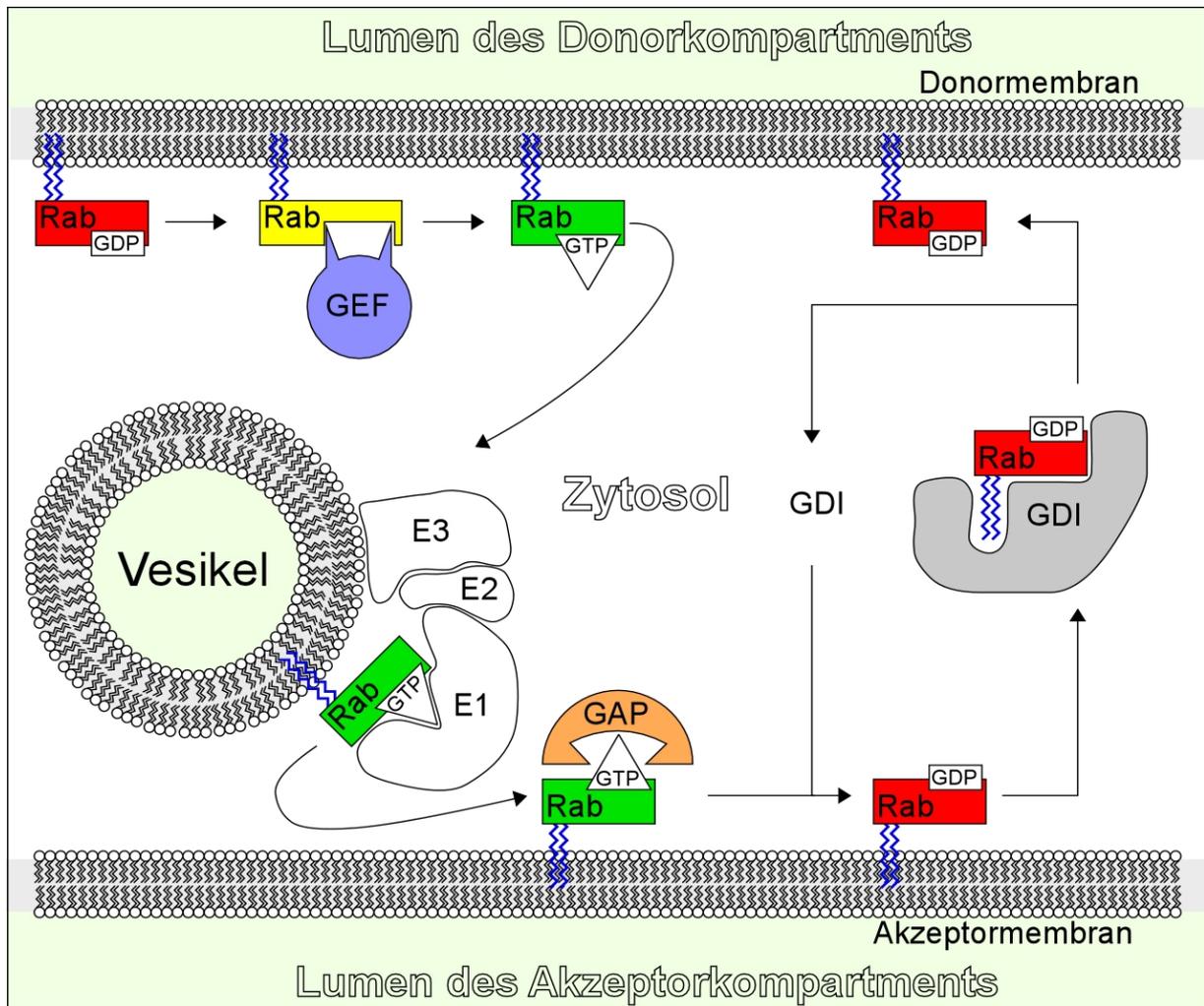


Abbildung 1: Der Rabzyklus. Schematisch dargestellt ist die Interaktion von RabGTPasen mit Effektor- und Regulatorproteinen im intrazellulären, vesikelvermittelten Transportprozess. Inaktives Rab:GDP ist über zwei C-terminale Geranylgeranylreste an der zytoplasmatischen Seite in der Donormembran verankert. Guaninukleotidaustauschfaktoren (GEF) aktivieren Rab-Proteine durch Katalyse des Austausches von GDP gegen GTP. Das aktive, GTP-gebundene Rab initiiert spezifische Prozesse im vesikelvermittelten Transport (direktionaler Transport des Vesikels, *tethering*, Fusion mit der Akzeptormembran) durch Rekrutierung und Bindung spezifischer Effektorproteine (E1, E2, E3). Nach Erfüllung des jeweiligen Transportvorganges wird die Aktivität von Rab:GTP durch GAP-assistierte (GTPase aktivierendes Protein) GTP-Hydrolyse terminiert und inaktives Rab:GDP generiert. Recycling des von Rab:GDP zu seiner spezifischen Donormembran wird vermittelt durch den GDP-Dissoziationsinhibitor (GDI), der Rab:GDP aus der Akzeptormembran extrahiert indem er die apolaren Isoprenoidreste in einer hydrophoben Tasche bindet und vom polaren Zytosol abschirmt. (Rotes Rechteck: inaktives Rab:GDP; grünes Rechteck: gelbes Rechteck: intermediäres, nukleotidfreies Rab im Komplex mit GEF; aktives Rab:GTP; E1, E2, E3: Effektorproteine, blaue Linien: C-terminale Geranylgeranylreste des Rab-Proteins)

Aufgrund ihrer intrinsischen GTPase-Aktivität existieren Rabs intrazellulär vornehmlich im inaktiven (GDP-gebundenen) Zustand. Weiterhin werden Rab-Proteine durch GDI im inaktiven, GDP-gebundenen Zustand im Zytosol gehalten. Nach Ablieferung des Rabs durch GDI an seine spezifische Membran^{31,32} muss daher das fest gebundene GDP zur Aktivierung

gegen GTP ausgetauscht werden. Der Austauschprozess kann *in vitro* mit sehr geringer Geschwindigkeit durch Dissoziation von GDP und Bindung von überschüssigem GTP an das intermediär nukleotidfreie Protein stattfinden³⁹. Da der spontane Austauschprozess aber für eine kontrollierte Aktivierung nach Bedarf zu langsam ist, werden für die Regulation des Nukleotidzustandes weitere Proteine benötigt und die spontane Aktivierung von GTPasen hat wahrscheinlich keine physiologische Relevanz. Zur effizienten und regulierten Aktivierung assistieren Guaninnukleotidaustauschfaktoren (*guanine nucleotide exchange factors*, GEFs). GEFs katalysieren die Freisetzung des gebundenen GDP und ermöglichen damit Bindung von GTP mit einhergehender Aktivierung des Rabs (siehe Abbildung 1). Die Wirkungsweise von GEFs, deren Untersuchung Hauptbestandteil der vorliegenden Arbeit ist, wird ausführlich in Abschnitt 1.4 dargelegt.

Die Komplexität des Rab-kontrollierten molekularen Netzwerkes wird durch die Vielzahl an Effektorproteinen verdeutlicht: Jede der mehr als 70 identifizierten RabGTPasen zeigt Interaktionen zu mehreren Effektorproteinen.⁴³⁻⁴⁵ und ist nicht auf ein einzelnes Effektormolekül limitiert. So konnte z.B. gezeigt werden, dass Rab5 in seiner aktiven GTP-gebundenen Form an mehr als 20 unterschiedlichen Proteinen bindet.⁴⁶ Die Effektoren besitzen dabei Domänen, die zwar für sich genommen für ein bestimmtes Rab spezifisch sind. Allerdings kann ein Effektorprotein mehrere Domänen mit Spezifitäten für unterschiedliche Rabs aufweisen.

Die Grundlage der Effektorerkennung im aktiven, aber nicht im inaktiven Zustand resultiert aus strukturell unterschiedlichen Konformationen und effektorspezifischen Sequenzelementen des Rabs. Die Art des gebundenen Nukleotids bestimmt dabei die Konformation des Rab-Proteins. Zum Verständnis der Wirkung von Austauschfaktoren und Funktion von RabGTPasen als molekulare Schalter ist das Wissen um die strukturellen Eigenschaften von Rab-Proteinen von Bedeutung. Im folgenden Abschnitt erfolgt daher eine eingehende Beschreibung des strukturellen Charakters von RabGTPasen unter Heraushebung funktionell wichtiger Regionen.

1.3. Strukturelle Eigenschaften von RabGTPasen

RabGTPasen enthalten konservierte Sequenzelemente, die für Nukleotidbindung, Effektorerkennung und zelluläre Lokalisation verantwortlich sind. Obwohl alle Ras-ähnliche GTPasen eine allgemein ähnliche Faltung aufweisen, besitzen sie vielfältige Variationen in ihrer molekularen Struktur^{35,47-57}. Eine typische GTPasefaltung enthält ein zentrales sechssträngiges β -Faltblatt, bestehend aus fünf parallelen und einem antiparallelen Strang, umgeben von fünf α -Helices^{37,57,58} (siehe Abbildung 2 und Abbildung 3). Fünf der Schleifen (*loops*), welche die α -Helices und β -Stränge verknüpfen, enthalten die Sequenzelemente, die für Nukleotidaffinität, Magnesiumkoordination und GTP-Hydrolyse verantwortlich sind. Hochkonservierte

EINLEITUNG

Aminosäurereste, die die aktive Bindungstasche bilden, bilden polare und hydrophobe Kontakte mit den Phosphatgruppen und der Guaninbase des Nukleotids, sowie zu einem essentiellen Magnesiumion aus. Das Magnesiumion ist für hohe Nukleotidaffinität und Hydrolyseaktivität notwendig. Es wird koordinativ durch strukturell konservierte Aminosäuren der GTPase und durch Sauerstoffatome des β - und γ -Phosphats des Nukleotids hochaffin gebunden. Rabs besitzen außerdem N- und C-terminale Erweiterungen in ihrer Aminosäuresequenz, welche in Länge und Sequenz stark variieren^{59,60}.

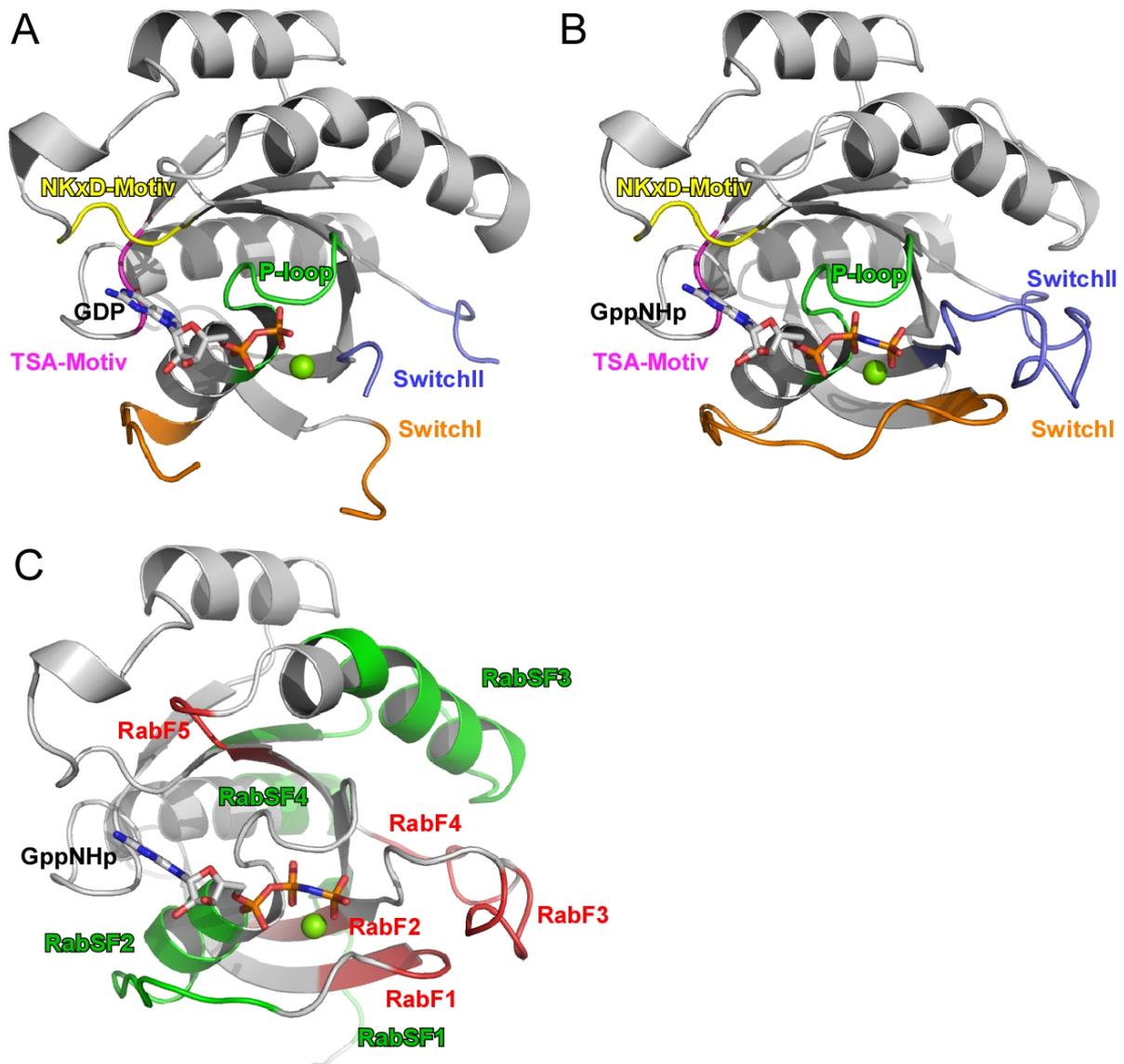


Abbildung 2: Allgemeine strukturelle Charakteristika Ras-ähnlicher GTPasen am Beispiel von Ypt7. (A) und (B): Molekulare Strukturen von Ypt7:GDP (A) und Ypt7:GppNHp (B)³⁵ (Stabmodell: Nukleotid; grüne Kugel: Magnesiumion). Das Proteinrückgrat ist grau dargestellt. Funktionell bedeutende Bereiche sind in Ypt7 farblich hervorgehoben und entsprechend benannt. Die Strukturen von Ypt7 im GDP- und GTP-Zustand unterscheiden sich nur wenig, herauszuheben sind aber die Bereiche *SwitchI* und *SwitchII*, die starke Konformationsunterschiede in den unterschiedlichen Nukleotidzuständen zeigen: Im GTP-Zustand sind diese Bereiche im Gegensatz zum GDP-Zustand vollständig geordnet und befinden sich näher an der Nukleotidbindungstasche. NKxD-Motiv, TSA-Motiv und *P-loop* sind in ihrer Konformation unbeeinflusst. (C) Gleiche Darstellung von Ypt7:GppNHp wie in (B), allerdings unter Heraushebung der Rab-Familie- (RabF, rot) und Rab-Subfamilie-Regionen (RabSF, grün)⁶¹. Die RabF-Regionen befinden sich um die Nukleotidbindungstasche gruppiert; dagegen sind die RabSF3-Regionen über die gesamte Oberfläche von Ypt7 (und anderen RabGTPasen) verteilt.

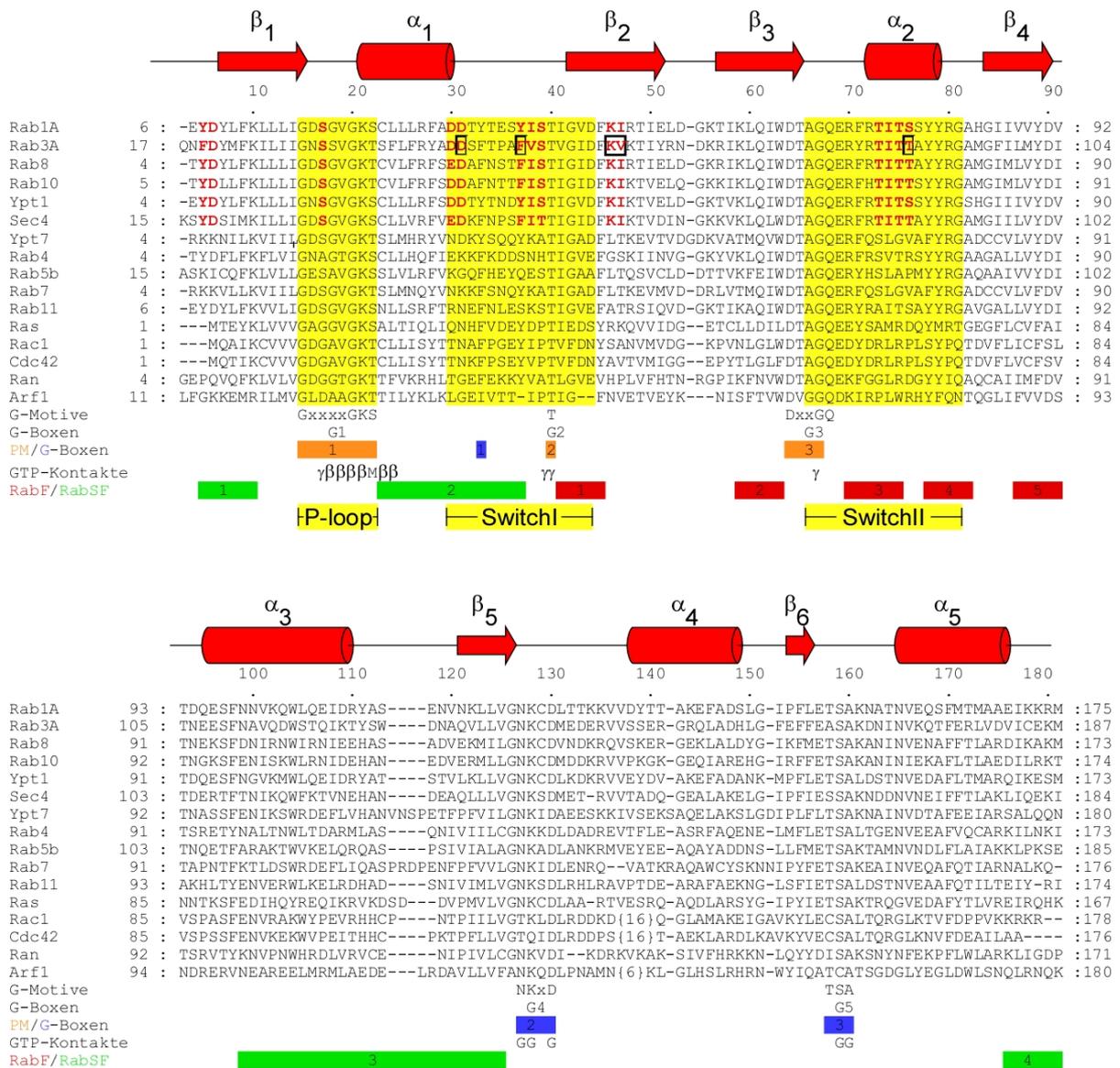


Abbildung 3: Kommentierter strukturbasierter Aminosäuresequenzvergleich ausgewählter RabGTPasen und prominenter Ras-ähnlicher GTPasen. Die Aminosäuresequenzen von strukturell charakterisierter GTPasen (Rab1a⁶², Rab3A⁵⁷, Sec4³⁷, Ypt7³⁵, Rab4⁶³, Rab5b⁶⁴, Rab7⁶⁵, Rab11⁶⁶, Ras⁵⁴, Rac1⁵⁰, Cdc42⁶⁷, Ran⁶⁸, Arf1⁶⁹) und Rab8 werden miteinander verglichen. Die Positionen bekannter Sekundärstrukturelemente sind mit roten Zylindern (α-Helices) und roten Pfeilen (β-Stränge) über dem Sequenzvergleich schematisch angegeben. Die Switchregionen und der P-loop sind gelb hervorgehoben. Konservierte Aminosäuren der G-Motive sind unter dem Sequenzvergleich angegeben (x: beliebige Aminosäure), ebenso wie die G-Boxen (PM1-PM3 und G1-G3) und die RabF- (rot) und RabSF-Regionen (grün). Direkte, bedeutende Kontakte des Proteins mit gebundenen GTP und Magnesium sind durch Angabe der kontaktierten Funktion aufgeführt (β: Polare Interaktion mit dem β-Phosphat; γ: Polare Interaktion mit dem γ-Phosphat; M: Koordination von Magnesium; G: hydrophobe/polare Kontakte zur Guaninbase von GTP). Die in den exozytotischen Rabs (Rab1a, Rab3A, Rab8, Rab10, Ypt1, Sec4), aber nicht in den endozytotischen (Ypt7, Rab4, Rab5b, Rab7, Rab11) konservierten Aminosäurereste sind rot hervorgehoben⁷⁰. Identifizierte Aminosäuren mit Einfluss auf die MSS4-katalysierte Nukleotidaustauschgeschwindigkeit sind durch Rahmen gekennzeichnet. (Abbildung adaptiert nach ⁷⁰)

Die konservierten Elemente in der Primärstruktur von GTPasen wurden zunächst eingeteilt in die Bereiche G1-G3 (guaninbasebindend) und PM1-PM3 (phosphat-/magnesiumbindend)¹⁸ (siehe Abbildung 3). Diese Sequenzen sind für alle Ras-ähnlichen GTPasen hoch konserviert, und mit ihrer Hilfe lässt sich jede GTPase allein aus der Aminosäuresequenz ohne Wissen der molekularen Struktur und ohne biophysikalische Untersuchungen eindeutig *in silico* identifizieren.

EINLEITUNG

Die GTP-Hydrolyse oder der Nukleotidaustausch bewirkt starke strukturelle Änderungen in den als *SwitchI* und *SwitchII* bezeichneten Bereichen der GTPase. Diese Abschnitte befinden sich zwischen den Sekundästrukturelementen $\alpha 1$ und $\beta 2$ (*SwitchI*) und $\beta 3$ und $\alpha 2$ (*SwitchII*) und bilden die Grundlage für die Funktion von Ras-ähnlichen GTPasen als molekulare Schalter. *SwitchI* und *SwitchII* überlappen mit den als phosphat- und magnesiumbindend definierten Bereichen PM2 (*SwitchI*) und PM3 (*SwitchII*). *SwitchI* und *II* sind im GDP-gebundenen (inaktiven) Zustand nur teilweise strukturiert, und erst die Anwesenheit des γ -Phosphats in GTP ordnet diese Bereiche über spezifische Interaktionen zwischen γ -Phosphat und Aminosäuren in den *Switch*regionen^{35,37}. Die *Switch*regionen unterscheiden über Wechselwirkung mit dem γ -Phosphat lediglich zwischen GDP und GTP, tragen selbst allerdings nur zu einem geringen Teil zur Nukleotidaffinität von kleinen GTPasen bei. Die starke Affinität von Ras-ähnlichen GTPasen resultiert zum einen aus der Interaktion des Proteins mit der Guaninbase, zum anderen aus der Koordination des β -Phosphats und des essentiellen Magnesiumions durch Wechselwirkung mit dem *P-loop* (PM1)⁷¹. Der *P-loop* befindet sich zwischen β -Faltblatt 1 und α -Helix1. Seine Konformationen im GDP- und GTP-gebundenen Zustand sind nahezu identisch. Auf die hohe Bedeutung des *P-loop* für die Affinität von Guaninnukleotiden und der daraus resultierenden Relevanz für Nukleotidaustausch und Aktivierung von GTPasen wird in einem späteren Abschnitt vertieft eingegangen (siehe 1.4.2.2).

Extensive Sequenzanalyse ermöglicht die Definition weiterer Strukturelemente in RabGTPasen⁶¹ (siehe Abbildung 2 und Abbildung 3). Das erste dieser Elemente sind die Rab-Familie-Motive (RabF1-RabF5), die sich in und um die *SwitchI*- und *SwitchII*-Bereiche gruppieren. Durch die RabF-Motive lassen sich RabGTPasen von anderen Ras-ähnlichen GTPasen allein auf Grundlage der Primärstruktur identifizieren und unterscheiden. Vier weitere Motive, RabSF1-RabSF4 (Rab-Subfamilie), ermöglichen die Unterteilung der RabGTPasen nach ihrem Verwandtschaftsgrad in zehn Subfamilien^{61,72}. Im Gegensatz zu den RabF-Motiven befinden sie sich auf unterschiedlichen Seiten der RabGTPase-Oberflächen. Betreffend der Bindung interagierender Proteine dienen die RabF-Motive vermutlich der Erkennung genereller Rab-Regulatoren (wie z.B. GDI und REP), die RabSF-Motive stellen dagegen vermutlich die Spezifität für die Interaktion eines distinkten Rabs mit respektiven Effektorproteinen und einigen GEFs und GAPs sicher. Bestätigung dieses Modells stammt von strukturellen und mutagenetischen Studien^{65,73,74}, sowie der Struktur von RabGTPasen im Komplex mit ihren Effektorproteinen^{75,76}. Lediglich die Struktur zwischen Rab5 und dem Effektor Rabaptin5 konnte die Hypothese der Bedeutung der RabSF-Motive für die RabGTPase/Effektorerkenkung nicht bestätigen⁷⁷.

Eine weitere wichtige strukturelle Eigenschaft ist die hypervariable Region, welche sich über ca. 30 Aminosäuren des C-Terminus von RabGTPasen erstreckt^{59,78}. Die Aminosäure-

sequenz dieser Region bestimmt vermutlich die zelluläre Lokalisation von Rab-Proteinen^{59,79}. In zumindest einigen Fällen kann dieser Bereich zusätzlich posttranslational zum Zwecke weiterer Regulation von Rabs modifiziert werden^{80,81}. An die hypervariable Region, direkt am oder nahe dem C-Terminus, werden hydrophobe Geranylgeranylisoprenoide posttranslational an konservierte Cysteinreste kovalent über Thioetherbildung angehängt⁸². Diese Modifikation erlaubt die reversible Bindung von Rab-Proteinen an zelluläre Membranen und ist essentiell für eine korrekte Funktion der Rab-Proteine⁸³.

Im Fokus der vorliegenden Arbeit ist die Wirkungsweise von RabGEFs und der von ihnen angewandte Mechanismus der Nukleotidfreisetzung und des Nukleotidaustauschs sowie der damit verbundenen Rab-Aktivierung. Daher wird im Folgenden auf bekannte Mechanismen des Nukleotidaustauschs im Kontext der strukturellen und biophysikalischen Besonderheiten und Erfordernisse kleiner GTPasen eingegangen.

1.4. Mechanismen des Nukleotidaustauschs

1.4.1. Biophysikalische Eigenschaften von GEFs

Die Rab-Aktivierung ist zeitlich und räumlich auf die funktionelle Wirkungsstätte des jeweiligen Rab-Proteins beschränkt. Viele GEFs sind Bestandteile großer Proteinkomplexe, welche wiederum Rabeffektoren darstellen. Daher kann zum Beispiel die Aktivierung eines GEFs (Klasse C Vps/HOPS-Komplex) durch den Nukleotidzustand eines vorgeschalteten Rabs (Rab5) kontrolliert werden, wobei das GEF selber wiederum die Aktivierung eines nachgeschalteten Rabs kontrolliert (Rab7)⁸⁴.

Ras-ähnliche GTPasen können in der Zelle in löslicher Form (Ran, Ef-Tu) oder aber als periphere Membranproteine (Ras, Rho, Rac Rab) vorliegen. Lösliche GTPasen, wie Ran und Ef-Tu, werden über ebenfalls lösliche Austauschfaktoren aktiviert (z.B. RCC1 bzw. Ef-Ts), membranständige GTPasen werden hingegen überwiegend durch GEFs aktiviert, welche an Membranen lokalisiert sind. Ein Beispiel für membranständige GTPasen sind die heterotrimeren G-Proteine, die durch integrale Membranproteine der Klasse der Sieben-Transmembranhelix-Proteine aktiviert werden (Übersichtsartikel^{56,85,86}). GEFs sind allerdings nicht notwendigerweise permanent membranlokalisiert, sondern können sich unter der Aktivierungskontrolle vorgeschalteter membranständiger Proteine/Proteinkomplexe befinden. Deren Aktivierung führt dann zu nachfolgender Bindung und damit Membranlokalisierung eines entsprechenden GEFs. Ein Beispiel für einen derartigen Aktivierungsprozess ist das System bestehend aus dem Nukleotidaustauschfaktor Son-of-Sevenless (Sos) und der kleinen GTPase Ras⁸⁷. Sos ist ein lösliches, zytosolisches Protein, welches über das Adapterprotein Grb2 (*growth factor receptor-bound protein 2*) an aktivierte, integrale Membranrezeptoren der Klasse der Rezeptortyrosinkinasen rekrutiert und damit membran-

EINLEITUNG

lokalisiert wird. Dort kann Sos das peripher-membrangebundene Ras durch Austausch von GDP zu GTP aktivieren.

Der Mechanismus der GEF-Reaktion umfasst eine Serie von Reaktionsschritten, die von einem binären GTPase:Nukleotid-Komplex über einen instabilen, intermediären ternären GTPase:Nukleotid:GEF-Komplex zu einem binären nukleotidfreien Komplex führen, welcher stabil in Abwesenheit von GDP oder GTP ist. Die Bindung von Nukleotid, vorzugsweise GTP, welches intrazellulär gegenüber GDP im Überschuss vorliegt^{88,89}, kehrt den Reaktionsweg um, resultierend in aktivierter GTPase sowie freigesetztem GEF. In diesem Prozess agiert das GEF lediglich als Katalysator und beschleunigt die Gleichgewichtseinstellung zwischen der GDP- und der GTP-Form der GTPase⁹⁰⁻⁹³. Dabei bestimmt sich die Lage des Gleichgewichtes nach den folgenden Faktoren: Den relativen Affinitäten der GTPase für GDP und GTP, dem intrazellulären Konzentrationsverhältnis zwischen GDP und GTP, sowie der Affinität und der Konzentration zusätzlicher (Effektor-)Proteine, welche das Gleichgewicht in Richtung der GTP-Form verschieben.

Die spontane Guaninnukleotidfreisetzung, und damit die spontane Aktivierung von GTPasen, ist langsam³⁹. GEFs katalysieren die Freisetzung und beschleunigen damit den Austausch, je nach GEF und GTPase, um zwei bis sechs Größenordnungen (siehe Tabelle 1), und regulieren darüber die Aktivierung kleiner GTPasen. Als Beispiele sind die kleinen GTPasen Ran, Ras, Rho und Rac2, die Rabs Ypt1 und Ypt51 aufgeführt, sowie der Translationselongationsfaktor Tu (Ef-Tu), ein Multidomänenprotein, das eine GTPase-Domäne mit starker Sequenzhomologie zu Ras besitzt. Die entsprechenden GEFs für diese GTPasen können Tabelle 1 entnommen werden.

Tabelle 1: Vergleichende Übersicht kinetischer Daten bekannter Nukleotidaustauschfaktoren. Aufgelistet sind die folgenden kinetischen Parameter: k_{-1} : Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante von GDP aus dem GTPase:GDP-Komplex; k_{kat} : maximale Nukleotidaustauschgeschwindigkeit stimuliert durch den GEF; K_M : Michaeliskonstante, Affinität des Austauschfaktors für den GTPase:GDP-Komplex; k_{kat}/k_{-1} : Faktor der Beschleunigung des GEF-katalysierten Nukleotidaustauschs (k_{kat}) gegenüber der spontanen GDP-Dissoziation (k_{-1}) aus dem GTPase:GDP-Komplex; k_{kat}/K_M : katalytische Effizienz des GEFs, die Tabelle ist absteigend nach katalytischer Effizienz der GEFs sortiert.

GTPase	GEF	k_{-1} [s ⁻¹]	k_{kat} [s ⁻¹]	K_M [μM]	k_{kat}/k_{-1}	k_{kat}/K_M [M ⁻¹ s ⁻¹]	Quelle
Ef-Tu	Ef-Ts	$1.8 \cdot 10^{-3}$	85	2	$4.7 \cdot 10^4$	$4 \cdot 10^7$	91,94
Ran	RCC1	$1.5 \cdot 10^{-5}$	20	0.7	$1.3 \cdot 10^6$	$3 \cdot 10^7$	92,95
Ras	Cdc25	$2 \cdot 10^{-5}$	3.9	400	$2 \cdot 10^5$	$4 \cdot 10^4$	93
Rho	RhoGDS	$2 \cdot 10^{-4}$	1.2	75	$6 \cdot 10^3$	$1.6 \cdot 10^3$	96
Ypt1	DSS4	$6 \cdot 10^{-5}$	$1.1 \cdot 10^{-2}$	17	$1.8 \cdot 10^2$	$6.6 \cdot 10^2$	90
Rac2	Tiam1	$1 \cdot 10^{-4}$	$1.3 \cdot 10^{-2}$	20	$1.3 \cdot 10^2$	$6.5 \cdot 10^2$	97
Ypt51	Vps9	$2 \cdot 10^{-5}$	$1.2 \cdot 10^{-2}$	23	$6 \cdot 10^2$	$5.2 \cdot 10^2$	90

Tabelle 1 listet teilweise die in der Vergangenheit bestimmten biophysikalischen Parameter für verschiedene Kombinationen kleiner GTPasen mit einem ihrer respektiven GEFs auf. Die spontane Nukleotidfreisetzung (GDP) liegt dabei zwischen $2 \cdot 10^{-4} \text{s}^{-1}$ (Rho) und $1.5 \cdot 10^{-5} \text{s}^{-1}$ (Ran), Halbwertszeiten von einer Stunde (Rho) bis dreizehn Stunden (Ran) entsprechend (Ef-Tu hat eine im Vergleich ungewöhnlich hohe spontane Nukleotidfreisetzungsrates von $1.8 \cdot 10^{-3} \text{s}^{-1}$ und stellt wahrscheinlich eine obere Grenze für die spontane GDP-Freisetzung an GTPasen dar^{94,98}).

Die Beschleunigung der GEF-unterstützten Rab-Aktivierung wird ausgedrückt durch das Verhältnis von GEF-stimuliertem Nukleotidaustausch k_{kat} zu spontaner GDP-Dissoziation k_{-1} (k_{kat}/k_{-1}): Die minimale bisher bestimmte Beschleunigung liegt bei einem Faktor von 10^2 (im Falle von Tiam1 für Rac2), die maximal berichtete Beschleunigung bei einem Faktor von 10^6 (im Falle von RCC1 für Ran) (siehe Tabelle 1). Neben den Unterschieden in der Beschleunigung des Austausches durch GEFs, haben die Austauschproteine unterschiedliche katalytische Effizienzen (k_{kat}/K_M) entwickelt. In einer bimolekularen Reaktion zweier Proteine gleicher Größe beträgt die theoretisch maximale erreichbare Assoziationsrate (in diesem Fall definiert durch k_{kat}/K_M) 10^8s^{-1} , sofern die Assoziation der Proteine nur durch ihre Diffusionsgeschwindigkeit definiert wird und jedes Zusammentreffen in Lösung zur Reaktion führt⁹⁹. In Tabelle 1 wird ersichtlich, dass Ef-Ts und Ran diese maximal möglich Stimulation des Nukleotidaustauschs nahezu erreichen. Sowohl die GTPase (Ef-Tu bzw. Ran) als auch der GEF (Ef-Ts bzw. Ran) sind intrazellulär lösliche, nicht membran- oder andersartig fixierte, frei diffundierende Proteine. Vermutlich dieser ungebundenen zytosolischen oder nukleären Lokalisation Rechnung tragend sind diese Proteine von der Natur mit hoher katalytischer Effizienz k_{kat}/K_M (repräsentiert durch relativ hohe Affinität von GEF zu GTPase:Nukleotid bei hoher maximaler Austauschrate k_{kat}) ausgestattet worden. Eine geringere Effizienz würde bei löslichen Proteinen wahrscheinlich zu wenig aktive, GTP-gebundene GTPasen pro Zeit generieren um den von ihnen kontrollierten Prozess zu initiieren.

Im Gegensatz zu den löslichen Proteinen Ran, RCC1, Ef-Tu und Ef-Ts besitzen die GEFs für membrangebundene Ras-ähnlichen GTPasen eine wesentlich geringere katalytische Effizienz, reichend von $5 \cdot 10^2$ für Vps9/Ypt51 bis $4 \cdot 10^4$ für Cdc25/Ras^{90,93,96,97}. Die konstitutive Membranlokalisation der GTPasen und die konstitutive oder aktivierungsabhängige Membranlokalisation der GEFs führen zu einer höheren lokalen Konzentration beider Proteine als es für lösliche GTPase/GEF-Systeme (Ran:RCC1, Ef-Tu:Ef-Ts) möglich ist. Die GDP/GTP-Austauschgeschwindigkeit wird durch die Reduzierung der Freiheitsgrade von drei auf zwei Dimensionen in Folge Membranassoziation der beteiligten Partner zusätzlich erhöht. Möglicherweise ist die verringerte Effizienz auch eine der Membranlokalisation Rechnung tragende Notwendigkeit, die die GTPase-Aktivierung reguliert und in ihrem

EINLEITUNG

Ausmaß begrenzt. Höhere Affinitäten, und damit höhere katalytische Effizienz, eines GEFs für den GTPase:Nukleotid-Komplex könnten unter Umständen zu einer spontanen Aktivierung führen oder in geringer Zeit zu viele aktive Moleküle erzeugen, damit deren Inaktivierung und die zeitliche Begrenzung des aktivierten Zustandes problematisieren.

Mit Sicherheit aber sind die Systeme aus GTPase und GEF von der Evolution auf die Regulation der nachgeschalteten Prozesse optimiert worden, was sich in den biophysikalisch bestimmbareren Parametern (Tabelle 1) ausdrücken muss. Die kinetischen Konstanten lassen allerdings die Frage nach dem molekularen Vorgang und der Realisation des Nukleotidaustauschs offen. Im folgenden Abschnitt sollen die Erfordernisse eines beschleunigten Nukleotidaustauschs an GTPasen im Kontext ihrer molekularen Struktur erläutert werden. An bekannten Strukturen aus GEFs und GTPasen wird versucht, einen allgemeinen Mechanismus der GEF-Katalyse abzuleiten.

1.4.2. Strukturelle Grundlagen des GEF-Mechanismus

In der Vergangenheit sind etliche binäre Komplexe zwischen Ras-ähnlichen GTPasen und den respektiven Nukleotidaustauschfaktoren strukturell, biochemisch und biophysikalisch charakterisiert worden, wodurch der allgemeine Mechanismus des GEF-katalysierten GDP/GTP Austausches in Grundzügen gelöst werden konnte. Die zurzeit bekannten Strukturen umfassen die binären Komplexe zwischen Ef-Tu/Ef-Ts^{100,101}, Ras/Sos¹⁰², Arf/Gea2¹⁰³, Rho/Dbp1¹⁰⁴, Cdc42/Dbp1¹⁰⁵, und außerdem Ran/RCC1¹⁰⁶, Rac/Tiam¹⁰⁷, Cdc42:Intersectin und Cdc42:SopE. Letztere zeigen als Besonderheit ein zusätzlich gebundenes Oxyanion (vermutlich ein Sulfation) im *P-loop* der GTPase, was eine mögliche Form des Übergangszustandes der GEF-Katalyse darstellt und den ternären Komplex aus Nukleotid, GTPase und GEF repräsentiert¹⁰⁶.

Zwar weisen die Austauschfaktoren strukturell bekannter GTPase/GEF-Komplexe weder Ähnlichkeit hinsichtlich ihrer Aminosäuresequenz noch in ihrer Tertiärstruktur auf, dennoch lassen sich starke Gemeinsamkeiten in der Realisation der GDP-Freisetzung aus dem Nukleotid/GTPase-Komplex ableiten.

GEFs bewerkstelligen die Katalyse über eine Verringerung der Affinität des Nukleotids für den binären GEF:GTPase-Komplex. Dabei bewirken sie vor allem eine Erhöhung der Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten von GDP aus dem ternären Komplex gegenüber dem binären GTPase:GDP-Komplex (siehe Tabelle 1). Die bisher strukturell charakterisierten Nukleotidaustauschfaktoren nutzen für die Katalyse zwei nukleotidbindende und affinitätsbestimmende Eigenschaften der GTPase aus, indem sie mit ihnen interferieren: Zum einen benötigen GTPasen für die hochaffine Bindung von GDP oder GTP ein zweiwertiges Magnesiumion als essentiellen Kofaktor (siehe Abschnitt 1.4.2.1). Das Magnesiumion wird über Sauerstoffatome des β - und/oder γ -Phosphats sowie direkt und indirekt über Aminosäuren der GTPase koordiniert. Zum anderen hat der *P-loop* der GTPase

einen hohen Beitrag für die Affinität von GDP und GTP zu der GTPase (siehe Abschnitt 1.4.2.2). Die Erhöhung der Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten des Nukleotid für den ternären GTPase:Nukleotid:GEF-Komplex erreichen Nukleotidaustauschfaktoren indem sie sowohl die Magnesiumkoordination als auch die *P-loop*-Konformation stören und beeinflussen. Aufgrund der Bedeutung dieser beiden Elemente für Nukleotidaffinität und den GEF-katalysierten GDP/GTP-Austausch, werden Magnesiumkoordination und *P-loop*-Konformation in den folgenden Abschnitten gesondert diskutiert.

1.4.2.1. Nukleotidaffinität durch Magnesiumkoordination

Der Einfluss von zweiwertigem Magnesium auf die Bindungsaffinität von GDP/GTP und kleinen GTPasen ist in der Vergangenheit vielfach untersucht worden. Mg^{2+} bindet mit mikromolarer Affinität an Ras:GDP¹⁰⁸ und Rac:GDP¹⁰⁹ und verlangsamt die GDP Dissoziationsgeschwindigkeit um vier Größenordnungen¹¹⁰⁻¹¹². Ein ähnlicher, wenn auch weniger ausgeprägter Effekt, ist für die GTPase-Domäne der heterotrimeren G-Proteine $G_{i\alpha}$ und $G_{o\alpha}$ beobachtet worden^{113,114}. In diesen Fällen führt die Anwesenheit geringer Mengen an Mg^{2+} zu einer Dissoziationsgeschwindigkeitsverringerung um den Faktor zehn. Eine starke Abhängigkeit der GDP/GTP-Affinität von der Magnesiumkonzentration konnte auch für den eukaryotischen Initiationsfaktor eIF-2 nachgewiesen werden¹¹⁵. Ebenso hat sich teilweise für RabGTPasen ein Zusammenhang zwischen Magnesiumkonzentration und Nukleotidbindungsverhalten zeigen lassen¹¹⁶.

Sämtliche RabGTPasen weisen die gleichen hoch konservierten Sequenzelemente wie andere Ras-ähnliche G-Proteine auf und die bekannten molekularen Strukturen der Rabs zeigen Unterschiede nur im Detail^{35,37,38,57,58,65,66}, aber nicht in ihrer grundsätzlichen Faltung und der Position essentieller, konservierter Aminosäuren. Dies lässt den Schluss zu, dass auch strukturell und biochemisch bisher nicht charakterisierte RabGTPasen eine ähnliche Nukleotidaffinität in Abhängigkeit von Magnesium zeigen und daher die Abwesenheit von Magnesium die Bindung von GDP und GTP vermindert.

Die Affinität von Magnesium für den Polyphosphatrest von GTP oder ATP hat einen K_D -Wert von ungefähr 0.1mM ¹¹⁷. Dagegen ist die Affinität von Magnesium für den GTPase:GDP-Komplex um drei bis vier Größenordnungen höher (die Affinität liegt im mikromolaren Bereich). Die Gründe für sowohl Magnesium abhängige Nukleotidaffinität der GTPase als auch GTPase-abhängige Magnesiumaffinität des Nukleotids sind in der strukturellen Koordination des Ions im Zentrum des G-Proteins zu finden.

Die Koordination von zweiwertigem Magnesium in Ras-ähnlichen GTPasen ist sehr spezifisch und wird hier an den Strukturen von H-Ras:GDP und H-Ras:GTP beispielhaft verdeutlicht^{54,118} (Abbildung 4). In den beiden Zuständen (GDP und GTP) bindet Ras Mg^{2+} in oktahedraler Koordination. Allerdings unterscheiden sich die Liganden zwischen GDP- und

EINLEITUNG

GTP-Form teilweise. Im GTP-Zustand werden zwei der insgesamt sechs Liganden von Sauerstoffen des β - und γ -Phosphats des Nukleotids bereitgestellt. Der dritte und vierte Ligand kommen aus den Hydroxylfunktionen zweier Aminosäuren: Zum einen koordiniert das Serin17 des *P-loop*, zum anderen das Threonin35 der *SwitchI*-Region das Magnesiumion. Die beiden letzten Liganden des Magnesiumions sind Wassermoleküle, wobei eines durch den Aminosäurerest von Aspartat57 und die Amidfunktion von Threonin58 (beide Bestandteil von *SwitchII*) positioniert wird. Das zweite der beiden Wassermoleküle komplexiert Magnesium dagegen ohne Unterstützung durch Aminosäuren des Proteins. Nach GTP-Hydrolyse verliert die Magnesiumkoordinationssphäre die Liganden des γ -Phosphats und des Threonins35 aus *SwitchI*. Diese Liganden werden durch Wassermoleküle ersetzt, wodurch das die Position von Threonin35 einnehmende Wassermolekül durch die Amidfunktionen von Aspartat33 und Isoleucin36 positioniert wird. Im Detail kann sich die Koordination des Magnesiumions zwischen den einzelnen G-Proteinen und RabGTPasen zwar unterscheiden, invariant sind aber in jedem Fall β - bzw. γ -Phosphat, sowie die zu Ras äquivalenten Aminosäuren Serin17, Threonin35 und Aspartat57.

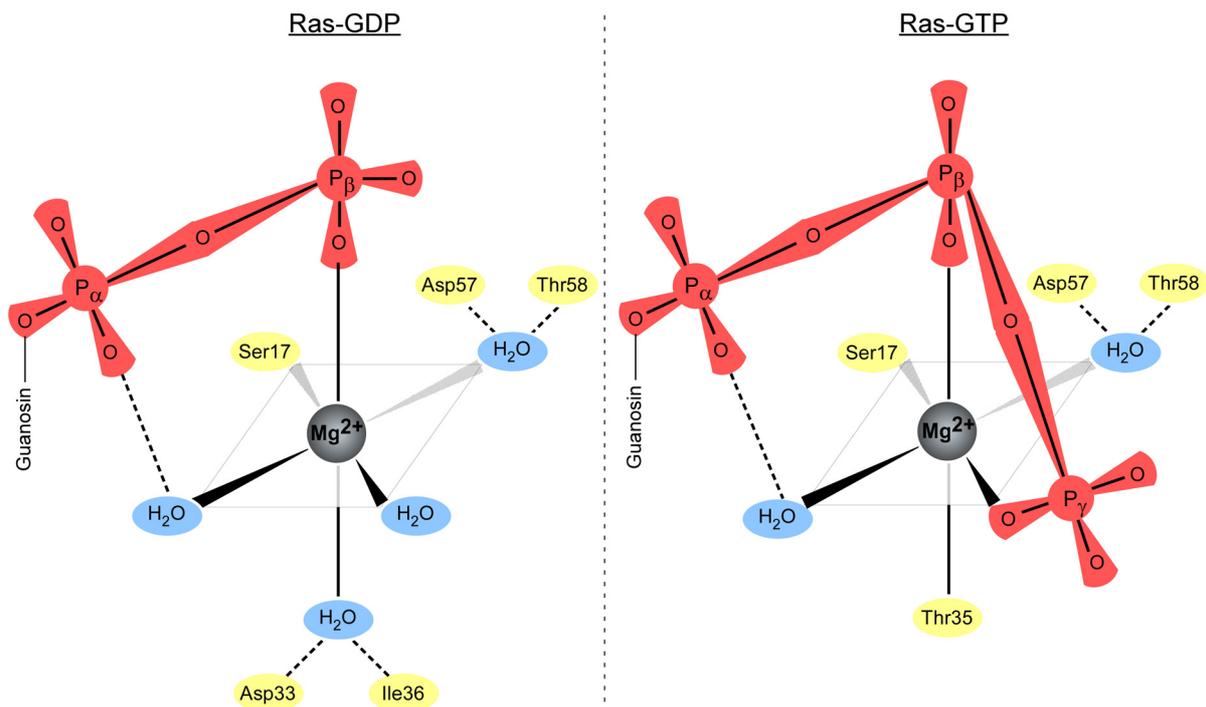


Abbildung 4: Unterschiedliche Magnesiumkoordination in Ras:GDP und Ras:GTP^{54,118}. Die Abbildung zeigt die veränderte Koordination von Magnesium der GTPase Ras im GDP- und GTP-Zustand. In beiden Komplexen koordinieren das β -Phosphat des Nukleotids und Serin17 das Magnesiumion, sowie über Wassermoleküle vermittelt das α -Phosphat und Aspartat57/Threonin58. Zwei weitere Wassermoleküle sind im GDP-Zustand an Magnesium gebunden, eines davon koordiniert durch Aspartat33 und Isoleucin36. Die letzten beiden Wassermoleküle werden im GTP-Zustand durch das γ -Phosphat von GTP und die Hydroxylfunktion von Threonin35 ersetzt. (rot: Phosphatgruppen von GDP bzw. GTP; blau: Wassermoleküle; gelb: Aminosäuren von Ras; gestrichelte Linie: Koordinierende Bindungen. Abbildung nach ¹⁰⁸)

Als Beispiele seien hier Ypt7:GDP³⁵ und Sec4:GDP³⁷ genannt: Aspartat75 (Aspartat57 in Ras entsprechend) koordiniert an Stelle eines Wassermoleküles zwei in Sec4:GDP,

unterstützt von Threonin⁷⁶, Glycin⁷⁸ und Glutamat⁸⁰. In Ypt7:GDP werden drei der vier Wassermoleküle in der Magnesiumkoordinationssphäre, im Gegensatz zu Ras, durch keine Aminosäure, sondern lediglich zum Teil durch die α - und β -Phosphate, koordiniert. Im Gegensatz zu Ras:GDP ist *SwitchI* an der Koordination des Magnesiums oder Positionierung koordinierender Wassermoleküle weder in Sec4:GDP noch in Ypt7:GDP beteiligt und aufgrund erhöhter Flexibilität in der Kristallstruktur nicht sichtbar.

Die besondere Bedeutung der konservierten Aminosäuren wurde in der Vergangenheit durch vielfache Mutagenesestudien an kleinen GTPasen adressiert. So konnte für Rab5 gezeigt werden, dass die Mutation von Serin³⁵ (Serin¹⁷ in Ras entsprechend) zu Asparagin die Nukleotidaffinität dramatisch senkt¹¹⁶: Asparagin kann Magnesium nicht koordinieren. Gleiches gilt für die Rasmutanten S17A und D57A: Die Affinität von Magnesium für den Ras:GDP-Komplex ist in der Mutante S17A um einen Faktor dreißig, für die Mutante D57A um einen Faktor 16 gegenüber dem Wildtypprotein vermindert¹⁰⁸. Die Affinität von Magnesium zu verschiedenen G-Proteinen kann allerdings recht unterschiedlich sein und stark zwischen GDP und GTP gebundener Form variieren. Beispielsweise beträgt die Dissoziationskonstante von Magnesium für den binären Rac:GDP-Komplex 11 μ M. Die Bindung zu Rac:GTP ist dagegen um einen Faktor zweihundert stärker ($K_{D, \text{Rac:GTP}}=61\text{nM}$)¹⁰⁹. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Bindung von Magnesium an den binären GTPase:Nukleotid-Komplex von großer Bedeutung für die Affinität von GDP/GTP für das G-Protein ist. Trotz großer Variation in der Mg^{2+} -Dissoziationskonstanten verschiedener G-Proteine ist die Bindungstasche unter physiologischen Bedingungen mit Magnesium gesättigt und die Nukleotide werden effektiv gebunden. Zum Austausch des GDP in einer inaktiven GTPase bietet sich dem GEF die Möglichkeit, mit der Magnesiumbindung zu interferieren, was zur Verminderung der Nukleotidaffinität und zur Nukleotiddissoziation mit anschließender Bindung von überschüssigem GTP führt. Eine weitere beeinflussbare Determinante eines stabilen G-Protein:Nukleotid-Komplexes ist neben der Magnesiumkoordination die Bindung des β -Phosphats durch Aminosäuren des *P-loop* und seine Beeinflussung stellt eine weitere Möglichkeit für ein GEF für die Realisation des Nukleotidaustauschs dar. Der Einfluss des *P-loop* auf die Stabilität des Komplexes zwischen Nukleotid und GTPase wird im Folgenden dargelegt.

1.4.2.2. Der P-loop: Nukleotidaffinität über Bindung des β -Phosphats

Eine strikt konservierte strukturelle Einheit mit der Konsensussequenz GxxxxGKS/T wird in allen Ras-ähnlichen GTPasen gefunden und wird als *P-loop* bezeichnet. Dieses Motiv befindet sich nahe dem N-Terminus kleiner GTPasen und reicht vom C-terminalen Ende des ersten β -Stranges bis in die erste α -Helix hinein. Im Falle von Ras umfasst der *P-loop* die Aminosäuren zehn bis siebzehn. Die Aminosäuren dieses *P-loop* umgeben die α - und

EINLEITUNG

β -Phosphate der Nukleotide und stellen vier Amidfunktionen des Polypeptidrückgrates als Wasserstoffdonoren an die Phosphatsauerstoffe^{54,118}. Das α -Phosphat des Nukleotids bildet ein oder zwei Wasserstoffbrückenbindungen zum *P-loop* aus, das β -Phosphat dagegen interagiert über vier Wasserstoffbrücken mit dem *P-loop*-Rückgrat, sowie über eine Wasserstoffbrücke mit der ε -Aminofunktion von Lysin16 (Ras). Die stärkere Interaktion des *P-loop* mit dem β -Phosphat des Nukleotids im Vergleich zum α -Phosphat erklärt wahrscheinlich die um einen Faktor 10^5 geringere Affinität von Guanosinmonophosphat für Ras im Vergleich zu GDP¹¹⁹. Die ungewöhnliche und hoch spezialisierte Konformation des *P-loop* wird durch zwei konservierte Glycine (Aminosäuren 10 und 15 in Ras) ermöglicht, die ungewöhnliche, für andere Aminosäuren sterisch ungünstige Torsionswinkel in der Hauptkette einnehmen. Der *P-loop* stellt sowohl in der Kristallstruktur als auch in der durch Kernresonanzspektroskopie bestimmten Struktur in Lösung eine rigide Einheit dar¹²⁰, die keine konformationelle Änderung in Folge von GTP-Hydrolyse eingeht (im Gegensatz zu den konformationell stark nukleotidabhängigen *SwitchI*- und *SwitchII*-Regionen). Viele der Mutationen in Glycin12, die die hydrolytische Aktivität von Ras reduzieren^{121,122}, stören nicht die Konformation des *P-loop*¹²²⁻¹²⁴. Die Lysin- und Serin-(Threonin)seitenketten des *P-loop* sind für die Nukleotidbindung kritisch: Lysin16 (Ras) überbrückt die β - und γ -Phosphate; Abwesenheit dieser Seitenkette in EF-G¹²⁵ ist möglicherweise der Grund für eine relativ geringe Affinität für GDP und GTP⁹⁸. Die Hydroxylfunktionen von Serin oder Threonin helfen bei der Koordination von Magnesium, wie im vorherigen Abschnitt bereits beschrieben.

Die Konformation des *P-loop* wird durch ein verzweigtes Netzwerk polarer Kontakte strukturell definiert. Lysin16 koordiniert direkt das β -Phosphat in GDP und β - und γ -Phosphat in GTP mit seiner ε -Aminofunktion, und wird dabei selber durch polare Interaktion mit dem Rückgrat von Glycin10 und Alanin11 koordiniert. Weiterhin koordiniert Lysin16 über seine α -Aminofunktion das β -Phosphat des Nukleotids, ebenso wie Glycin15. Serin17 bindet direkt an Magnesium, wie im vorherigen Abschnitt beschrieben.

Die strikte Konservierung des *P-loop* und die rigide Struktur im Vergleich Ras-ähnlicher GTPasen untereinander sowie seine intensive Interaktion mit dem β -Phosphat deuten darauf hin, dass eine Störung seiner Konformation oder eine Störung der Interaktion mit den Phosphaten Einfluss auf die Nukleotidaffinität und damit der Freisetzung der Guanin-nukleotide nehmen kann. Somit stehen Nukleotidaustauschfaktoren mindestens zwei Möglichkeiten zur Verfügung, die Freisetzung von GDP oder GTP zu katalysieren: Zum einen die Beeinflussung der *P-loop*-Konformation und/oder Verschiebung der relativen Position des *P-loop* in der GTPase. Zum anderen kann über Interferenz der Magnesiumkoordination der Nukleotidaustausch katalysiert werden. Im Folgenden wird dargelegt, dass eben diese Mechanismen durch GEFs in der Ausführung ihrer Funktion

angewendet werden und die bekannten GEFs trotz ihrer strukturellen Diversität ähnliche Wege zur Katalyse im Laufe der Evolution gefunden haben.

1.4.2.3. Der GEF-katalysierte Nukleotidaustausch

Wie bereits dargelegt, sind verschiedene Sequenz- und Struktur motive einer GTPase an der Erkennung und Bindung von Guaninnukleotiden beteiligt. Die G4- und G5-Motive (NKxD und TSA) der GTPase sind für die spezifische Erkennung der Guaninbase und Unterscheidung des Guaninnukleotids gegenüber anderen in der Zelle vorkommenden Nukleotiden verantwortlich. Die G1-, G2- und G3-Motive (GxxxxGKS/T, Threonin in *SwitchI* und DxxGQE) binden die Phosphate des Nukleotids, G2 (*SwitchI*) und G3 (*SwitchII*) detektieren das γ -Phosphat und unterscheiden darüber zwischen GDP und GTP. In den vorangehenden Betrachtungen über Nukleotidaffinität der GTPasen wurde lediglich der Einfluss von *SwitchI*, *SwitchII* und des *P-loop* betrachtet und diese als Strukturen definiert, die einem GEF als mögliche Angriffspunkte für eine GDP/GTP-Austauschkatalyse zu Verfügung stünden. Theoretisch wäre aber auch Interferenz des GEFs mit den guaninbasebindenden Strukturen der GTPase eine Möglichkeit, den Nukleotidaustausch zu bewirken. GTPasen binden beispielsweise ATP nur mit sehr geringer Affinität^{94,126}, woraus folgt, dass selbst geringe strukturelle Änderungen in den Spezifität bestimmenden NKxD- oder TSA-Motiven eine Freisetzung des Nukleotids bewirken sollten. Für einen solchen Mechanismus ist allerdings kein Beispiel in der Literatur bekannt. Lediglich für den Ras:Sos-Komplex wurde vorgeschlagen, dass die Katalyse über einen sterischen Konflikt eines Isoleucins aus *SwitchI* (Isoleucin33) mit der Ribose des Guaninnukleotids unterstützt wird¹⁰², dieses aber nur einen Teilaspekt der GEF-Katalyse im Falle von Ras:Sos darstellt. Es lässt sich festhalten, dass weder die in die Guaninbasebindung involvierten Motive noch der Ribosezucker selber ein Ziel für Nukleotidaustauschfaktoren im Allgemeinen sind.

Alle bisher strukturell bekannten GTPase:GEF-Komplexe zeigen direkte Kontakte zu *SwitchII* (siehe Tabelle 2). Da *SwitchII* einen großen Beitrag für die Koordination von Mg^{2+} liefert (über das Aspartat von DxxGQE, das G3-Motiv), ist er von besonderer Bedeutung für den GEF-katalysierten Nukleotidaustausch. Dies erklärt seine konservierte Bindung und Kontaktierung durch Aminosäuren unterschiedlicher GEF-Proteine. Außer den Kontakten zu *SwitchII* werden in diesen GTPase:GEF-Komplexen in jedem Fall noch Bindungen zu Regionen außerhalb der G1-G5 Motive eingegangen sowie zu mindestens einem der phosphatbindenden Motive von *SwitchI* und/oder dem *P-loop* (siehe Tabelle 2). Der Komplex aus Ras und Sos ist der einzige, in dem sowohl *SwitchI* als auch *SwitchII* und der *P-loop* vom GEF kontaktiert werden. Dagegen wird in Ef-Tu:Ef-Ts und Ran:RCC1 nur der *P-loop* zusätzlich zu *SwitchII* gebunden, *SwitchI* hat keine Kontakte zum GEF. Die Abwesenheit von Kontakten von *SwitchI* zu RCC1 und das Fehlen eines Nukleotids im Ran:RCC1-Komplex führt daher zu einer Restrukturierung von *SwitchI*.

EINLEITUNG

In den Komplexen Rac:Tiam, Cdc42:DbpA, Cdc42:Intersectin, Cdc42:SopE, Arf1:Gea(Sec7) und RhoA:DbpA werden keine Kontakte zum *P-loop* ausgebildet, sondern stattdessen *SwitchI* durch Bindung des GEFs in seiner Konformation stabilisiert. Als wichtigster Punkt dieser Untersuchungen zwischen GTPasen und ihren GEFs bleibt festzuhalten, dass alle strukturell bekannten Guaninnukleotidaustauschfaktoren in jedem Fall direkte Kontakte zum *SwitchIII*-Bereich der GTPase ausbilden und zusätzlich mindestens ein weiteres der phosphatbindenden Motive (*P-loop* oder *SwitchI*) koordinieren. Interessanterweise zeigen nur solche Austauschfaktoren eine hohe Katalyseeffizienz, die den *P-loop* kontaktieren und damit seine Konformation direkt (und nicht lediglich über *SwitchII* vermittelt) stabilisieren, was für Sos, Ef-Ts und RCC1 der Fall ist. Es bleibt aber unklar, ob die direkte und unvermittelte Bindung des *P-loop* durch den GEF ein genereller Mechanismus zum Erreichen hoher katalytischer Effizienz ist oder ob dieses strukturelle Detail nur einen (zufälligen) Teilaspekt darstellt.

Tabelle 2: Vergleichende numerische Übersicht der Bindungskontakte der Komplexe zwischen GTPasen und GEFs. Angegeben ist die Summe der Anzahl polarer und apolarer Bindungen zwischen einem GEF und dem jeweilig aufgeführten Strukturmotiv der GTPase (*SwitchI*, *SwitchII* oder *P-loop*). *SwitchI*, *SwitchII* oder *P-loop* wurden dabei wie in Abbildung 3 definiert zusammengefasst. Kontakte des GEFs zu Aminosäuren außerhalb dieser Regionen sind unter sonstige Kontakte gelistet. Die Kontakte zwischen den Proteinen wurden mit Hilfe der Internetressource PDBsum¹²⁷ analysiert

GTPase -GEF	<i>SwitchI</i> Kontakte	<i>SwitchII</i> Kontakte	<i>P-loop</i> Kontakte	sonstige Kontakte	PDB ¹²⁸ Zugangsnummer
Ef-Tu:Ef-Ts	-	6	3	34	1EFU
Ras:Sos	7	15	2	6	1BKD
Ran:RCC1	-	6	2	16	1I2M
Arf1:Gea(Sec7)	9	8	-	2	1R8Q
Rac1:Tiam	7	12	-	5	1FOE
Cdc42:DbpA	7	11	-	6	1KZ7
Cdc42_Intersectin	10	11	-	1	1KI1
Cdc42:SopE	7	12	-	5	1GZS
RhoA:DbpA	8	12	-	7	1LB1

Renault et al schlagen einen allgemeinen Mechanismus für die Rolle des *P-loop* im GEF-katalysierten Nukleotidaustausch kleiner GTPasen vor¹⁰⁶: Der *P-loop* wird nach Freisetzung des gebundenen Nukleotids in seiner Konformation durch sein invariantes Lysin stabilisiert, da dieses mit negativ geladenen Aminosäuren des GEFs oder der GTPase selber interagiert und in seiner Position definiert fixiert wird wie im Folgenden für verschiedene GTPase:GEF-Komplexe dargelegt wird: Lysin24 des Ef-Tu *P-loop* bindet Aspartat80 (Aspartat57 in Ras), welches als invariante Aminosäure in der GDP/GTP-gebundenen Form von Ef-Tu in die

Koordination des Magnesiums involviert ist (DxxGQE-Motiv in *SwitchII*)¹⁰⁰. Im Arf:Sec7-Komplex ist die Carbonylfunktion von Alanin27 des *P-loop* in der Position des β -Phosphats lokalisiert und interferiert mit der Nukleotidbindung¹²⁹. Ein invarianter Glutamatrest, Glutamat97 in der Gea2 Sec7-Domäne, befindet sich nahe der Magnesium- und Phosphatbindungsstelle und interagiert mit Lysin30 des *P-loop* (homolog zu Lysin16 in Ras), welches ebenso durch Aspartat67 (homolog zu Aspartat57 in Ras und Aspartat80 in Ef-Tu) stabilisiert wird. Im Ras:Sos-Komplex¹⁰² zeigt Glutamat 942 in Sos in Richtung der β -Phosphatposition und Glycin13 des *P-loop*, analog zu Alanin27 in Arf1, ist in Richtung der β -phosphat Bindungsstelle verschoben. Das konservierte Lysin16 wird durch Glutamat62 von Ras und durch Glutamat62 von Rac im Rac:Tiam-Komplex kontaktiert¹⁰⁷. Diese Glutamate in *SwitchII* sind in vielen Ras-ähnlichen GTPasen (außer Arf) streng konserviert, allerdings ohne einen strukturell erkennbaren Grund. Im Ran:RCC1-Komplex ist Lysin23 von seiner normalen Position gelöst und zeigt in Richtung von Glutamat70 und Aspartat65 (homolog zu Glutamat62 und Aspartat57 in Ras)¹⁰⁶, bindet aber noch an das im Komplex gebundene Oxyanion. Vermutlich stellt der Ran:RCC1:Oxyanion-Komplex einen Übergangszustand in der GEF-Reaktion dar und repräsentiert den intermediären ternären Komplex aus Ran, RCC1 und GXP. Mutagenesestudien zeigen, dass Glutamat70 von starker Bedeutung für den Nukleotidaustausch ist¹⁰⁶, da die Mutation in Alanin die maximale Austauschgeschwindigkeit um einen Faktor von ca. 25 vermindert. Zusammenfassend gesagt belegen diese Untersuchungen kleiner GTPasen und ihrer Nukleotidaustauschfaktoren, dass das *P-loop*-Lysin mit einem negativ geladenen Aminosäurerest eines GEFs oder vom DxxGQE-Motiv Ras-ähnlicher GTPasen interagiert. All diese Ergebnisse sowohl hinsichtlich des GEF-katalysierten Nukleotidaustauschs als auch der Affinität von Guaninnukleotiden für Ras-ähnliche GTPasen betonen damit die hohe Bedeutung des *P-loop* für die Funktion von GTPasen und erklären die hohe evolutionäre und strukturelle Konstanz dieses Motivs.

Die zurzeit publizierten biophysikalischen und strukturellen Daten bezüglich Ras-ähnlicher GTPasen und ihrer Komplexe mit den respektiven Guaninnukleotidaustauschfaktoren geben ein in großen Teilen konsistentes Bild des Nukleotidaustauschs: Zunächst bindet der GEF an den binären GTPase:Nukleotid-Komplex. Wie aus Tabelle 2 ersichtlich werden diese Kontakte mindestens mit *SwitchII* und zu den spezifitätbestimmenden Bereichen der GTPase ausgebildet. Die Bindung bewirkt eine Konformationsänderung in der GTPase, deren bedeutungsvollste Konsequenz in einer Restrukturierung von *SwitchII* liegt und die Dissoziation von Magnesium aus dem Komplex bewirkt. Dieser Effekt ist unmittelbar, und die sterische Interferenz von Aminosäuren mit der Magnesiumbindungsstelle in der GTPase stellt den Grund dafür dar, dass bisher kein Komplex isoliert werden konnte, in dem Magnesium gleichzeitig in einem Komplex aus GEF, GTPase und Nukleotid gebunden wäre. Die Dissoziation von Magnesium verringert die Affinität des Nukleotids im ternären

EINLEITUNG

GTPase:Nukleotid:GEF Komplex dramatisch, und nach weiterer Konformationsänderung der GTPase dissoziiert das Nukleotid; es entsteht der binäre nukleotid- und magnesiumfreie GTPase:GEF-Komplex. In diesem Komplex wird die Konformation des *P-loop* durch Bindung des konservierten Lysins an saure Aminosäurereste des DxxGQE-Motivs von *SwitchII* stabilisiert. Hinweise für die Richtigkeit dieses Mechanismus geben nicht nur die Untersuchungen an Strukturen von binären GTPase:GEF-Komplexen, sondern ebenso die molekularen Strukturen magnesiumfreier GTPase:Nukleotid-Komplexe: In den Strukturen von Sar1:GDP¹³⁰ und RhoA:GDP¹³¹ stabilisieren diese GTPasen das *P-loop*-Lysin in gleicher Art und Weise wie in den beschriebenen GTPase:GEF-Komplexen. In Sar1 kontaktiert Aspartat75 aus dem DxxGQE-Motiv von *SwitchII* das *P-loop*-Lysin und entspricht damit in diesem Detail der Wirkungsweise von Aspartat80 in der Ef-Tu:Ef-Ts-Struktur¹⁰⁰; in RhoA dagegen wird das Lysin durch Glutamat64 aus *SwitchII* gebunden und stabilisiert, womit Glutamat64 analog zu dem konservierten Glutamat des DxxGQE-Motivs von *SwitchII* in den Strukturen von Ras:Sos, Rac:Tiam, RhoA:DbpA, Cdc42:SopE, Cdc42:Intersectin und Cdc42:DbpA fungiert^{102,104,105,107,132}. Daher ist die Stabilisierung der Nukleotidbindungstasche über Interaktion saurer Aminosäuren aus *SwitchII* mit dem *P-loop*-Lysin nicht nur ein von Nukleotidaustauschfaktoren applizierter Mechanismus, sondern ein allgemeiner Übergangszustand der GTPase, wenn Magnesium aus dem GTPase:Nukleotid:Magnesium-Komplex dissoziiert. Das GEF wirkt über die Stabilisierung oder Erkennung dieses Übergangszustandes¹³³ und über die Stabilisierung der anschließend nukleotidfreien GTPase. Die Umkehr der Schritte, mit Bindung von GTP unter physiologischen Bedingungen, führt zur Bildung der aktiven GTPase.

Der detaillierte Reaktionsweg von GDP-gebundener GTPase zu nukleotidfreiem GTPase:GEF-Komplex lässt sich übersichtlich an den Strukturen der GTPase Cdc42 demonstrieren (siehe Abbildung 5). Die Strukturen von Cdc42 in Komplex mit GDP, SopE, Intersectin und DbpA zeigen die detaillierten Umstrukturierungen im *P-loop* und *SwitchII* auf dem Weg vom Cdc42:GDP-Komplex⁶⁷ über magnesiumfreien aber nukleotidgebundene Zwischenzustände (Cdc42:SopE¹³² und Cdc42:Intersectin¹⁰⁴) zum nukleotidfreien Cdc42:GEF-Komplex (Cdc42:DbpA¹⁰⁵). Die Komplexe Cdc42:SopE und Cdc42:Intersectin enthalten zwar kein Nukleotid, jedoch befindet sich ein Oxyanion (vermutlich Sulfat) in nahezu exakter Position des β -Phosphats und wird durch Aminosäuren des *P-loop* analog dem β -Phosphat koordiniert. Die GTPase:GEF-Komplexe mit einem gebundenen Oxyanion im *P-loop* simulieren wahrscheinlich den intermediären und instabilen ternären Komplex aus GTPase, Nukleotid und GEF (Ähnliches gilt für die Strukturen von Rac:Tiam¹⁰⁷ und Ran:RCC1¹⁰⁶).

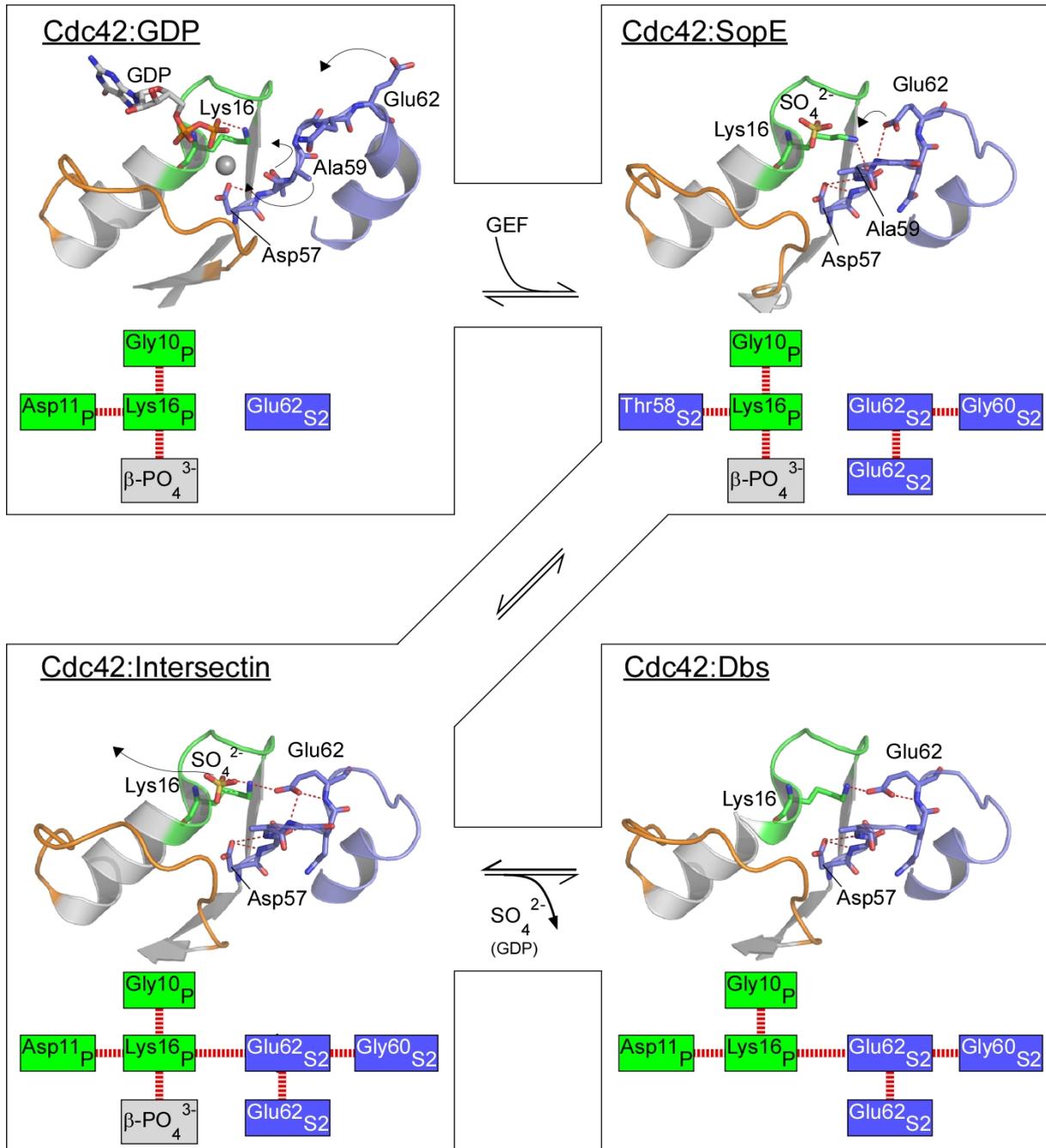


Abbildung 5: Grundzüge des GEF-katalysierten Nucleotidaustauschs verdeutlicht an Cdc42 in Komplex mit GDP, SopE, Intersectin und DbpA. Der Übergang von Cdc42:GDP⁹⁷ über Cdc42:SopE¹³² und Cdc42:Intersectin¹⁰⁴ zu Cdc42:DbpA¹⁰⁵ ist dargestellt. Die Komplexe Cdc42:SopE und Cdc42:Intersectin enthalten ein im *P-loop* gebundenes Sulfat, welches wahrscheinlich das β-Phosphat eines Nucleotids repräsentiert. Die Strukturen mit Sulfat sind mögliche Übergangszustände des GEF-assistierte Nucleotidaustauschs. Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind jeweils nur Strukturelemente der Nucleotidbindungstasche von Cdc42 dargestellt (Aminosäuren 7-42 und 52-72, umfassend *P-loop*, α1-Helix, *Switch I* und *Switch II*), der GEF ist in keinem Fall gezeigt. *Switch I* (orange), *Switch II* (blau) und der *P-loop* (grün) sind in der Struktur farblich hervorgehoben. Aminosäuren in Cdc42 mit Bedeutung für β-Phosphatbindung (Lysin16), Magnesiumkoordination (Aspartat57), Magnesiumverdrängung (Alanin59) und den Nucleotidaustausch (Threonin58, Glutamat62) sind als Stabmodelle abgebildet. Pfeile demonstrieren die Bewegungsrichtung und Umstrukturierung ausgewählter Aminosäuren bei Bindung der GEFs (SopE, Intersectin bzw. DbpA) an Cdc42. Rot gestrichelte Linien stellen polare Bindungen in der Nucleotidbindungstasche von Cdc42 dar (graue Kugel: Magnesium). (Für weitere Einzelheiten siehe Text). Unterhalb der abgebildeten Strukturen werden die während der GEF-Katalyse auftretenden polaren Bindungen (gestrichelte Linien) in Cdc42 schematisch aufgezeigt. Zentrale Elemente sind die Aminosäure Lysin16 des *P-loop* und Glutamat62 aus *Switch II*. In Cdc42:DbpA wird *Switch II* von Cdc42 in so durch DbpA koordiniert, dass Glutamat62 aus *Switch II* die Konformation von Lysin16 stabilisiert. (Kleingestellte Buchstaben indizieren die Position der Aminosäuren in Cdc42; P: *P-loop*; S2: *Switch II*) (SO₄²⁻: Sulfat; β-PO₄³⁻: β-Phosphat von GDP).

EINLEITUNG

Im GDP-gebundenen Zustand wird die ϵ -Aminofunktion des konservierten *P-loop*-Lysin (Lysin16) von Cdc42 durch polare Wechselwirkungen mit den Carbonylfunktionen von Glycin10 und Aspartat11 koordiniert und bindet das β -Phosphat des Nukleotids⁶⁷. Magnesium ist in üblicher oktahedraler Koordination (siehe Abschnitt 1.4.2.1) durch das β -Phosphat, Wassermoleküle und Aminosäurereste von Cdc42 gebunden. *SwitchII* ist geordnet, das für die Stabilisierung im GTPase:GEF-Komplex von Lysin16 notwendige Glutamat62 aus *SwitchII* befindet sich 14Å von der ϵ -Aminofunktion entfernt. Der Komplex aus Cdc42 und SopE stellt vermutlich den ersten Übergangszustand in der Katalyse dar¹³². Bindung von SopE an Cdc42 führt zu einer Restrukturierung von *SwitchII*. Der dramatischste Effekt liegt in der Drehung und Bewegung von Alanin59 in Richtung der Nukleotidbindungstasche, wodurch Magnesium sterisch an der Bindung an den Cdc42:Nukleotid-Komplex gehindert wird und dissoziiert. Glutamat62 bewegt sich um 4Å, seine Säurefunktion um 9.5Å, auf Lysin16 zu, ohne an diesem Punkt bereits mit Lysin16 in direkte Interaktion zu treten, und wird durch polare Wechselwirkung mit Glycin60 und der Amidfunktion von Glutamat62 in seiner Konformation fixiert. Lysin16 wird weiterhin durch Glycin10 koordiniert und bindet an das β -Phosphat (in diesem Fall repräsentiert durch das gebundene Oxyanion), geht aber intermediär eine Wasserstoffbrückenbindung mit der Hydroxylfunktion von Threonin58 ein.

In einem weiteren Übergangszustand, repräsentiert durch den Komplex aus Cdc42 und Intersectin¹⁰⁴, findet keine nennenswerte Restrukturierung des Rückgrates der GTPase mehr statt, jedoch orientieren sich bestimmte Aminosäurereste unter Ausbildung neuer Kontakte um: *P-loop* und *SwitchII* treten durch Lysin16 und Glutamat62 vermittelt in Verbindung, nach dem sich die Säurefunktion von Glutamat62 um weitere 1.5Å in Richtung von Lysin16 bewegt hat. Es bildet sich ein Netzwerk polarer Interaktionen aus, in dem Lysin16 mit Glycin10, Aspartat11, dem β -Phosphat (hier repräsentiert durch ein Oxyanion) und Glutamat62 wechselwirkt, und Glutamat wiederum mit Lysin16, Glycin60 und der Amidfunktion von Glutamat62. In einem letzten Schritt (dargestellt durch den Komplex aus Cdc42 und Dbs¹⁰⁵) dissoziiert das Nukleotid aus dem Komplex, wodurch die Bindung zwischen dem β -Phosphat und Lysin16 zwar unterbrochen wird, das Netzwerk polarer Interaktionen zwischen *P-loop* und *SwitchII* aber ansonsten unbeeinflusst bleibt. Damit hat der GEF die GTPase Cdc42 auf dem Weg vom Nukleotid- und Magnesium-gebundenen und Nukleotid- und magnesiumfreien Zustand in definierter Weise restrukturiert, deren wichtigste Änderungen in einer Umorientierung von *SwitchII* zu Tage treten. Trotz dieser konformationellen Beeinflussungen der GTPase durch den GEF ändert sich die Position und Struktur wichtiger nukleotid- und magnesiumbindender Elemente in der GTPase nur wenig oder gar nicht: Erstens bleibt der *P-loop* in seiner Konformation vollständig ungestört und ist damit in optimaler Konformation für eine erneute schnelle und effiziente Bindung von

GDP/GTP in die Nukleotidbindungstasche der GTPase. Zweitens ändert das für die Bindung des β -Phosphats hoch bedeutende Lysin16 seine Position nicht, lediglich die Ausrichtung der ε -Aminofunktion variiert leicht durch die Bindung an Threonin58 (in Cdc42:SopE) oder Glutamat62 (in Cdc42:Intersectin und Cdc42:DbpA). Drittens wird die Position des für die Magnesiumbindung wichtigen Aspartat57 (DxxGQE-Motiv aus *SwitchII*) während der Katalyse nicht verändert und die Konformation durch Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen mit Threonin58, Alanin60 und Threonin17 in der exakten Position wie im Cdc42:GDP-Komplex gehalten.

Der Guaninnukleotidaustauschfaktor hält die GTPase letztendlich in einer optimalen Konformation für die erneute Bindung von Guaninnukleotiden und beschleunigt den Austauschprozess, indem er die Übergangszustände definiert induziert und stabilisiert. Im Detail unterscheiden sich die von Austauschfaktoren anderer GTPasen angewandten Mechanismen mit Sicherheit (vergleiche Ef-Tu:Ef-Ts¹⁰⁰, Arf1:Gea(Sec7)¹²⁹ und Ras:Sos¹⁰²); dennoch lassen die evolutionär streng konservierten Aminosäuren, wie z.B. Aminosäuren homolog zu Lysin16 und Glutamat62 in Cdc42, sowie die strukturellen Erfordernisse durch die GTPasen darauf hindeuten, dass die Mehrzahl der GEFs einen mindestens in Grundzügen ähnlichen Mechanismus zur Katalyse des Austauschs anwenden.

1.5. Rab GEFs: Eine heterogene Gruppe

Für eine Vielzahl von GEFs Ras-ähnlicher GTPasen sind in der Vergangenheit, wie in den vorherigen Abschnitten dargelegt, umfangreiche biophysikalische und strukturelle Charakterisierungen unternommen worden. Hingegen existieren für RabGEFs nur wenige kinetische und keine strukturellen Daten eines Rab-GEFs im Komplex mit der entsprechenden GTPase, und es ist daher unbekannt, ob RabGEFs auf ähnliche Art katalysieren wie GEFs anderer Ras-ähnlicher GTPasen.

RabGEFs sind eine sehr heterogene Gruppe, die sich grob in verschiedene Untergruppen einteilen lässt. Die erste Gruppe beinhaltet große makromolekulare Komplexe, wie z.B. TRAPP und HOPS, die Guaninnukleotidaustauschaktivitäten für die Hefe-RabGTPasen Ypt1/Ypt3 bzw. Ypt7 zeigen^{134,135}. Die zweite Gruppe umfasst die heterodimeren Proteinkomplexe Rabaptin5-Rabex5, der Austauschaktivität für Rab5 zeigt¹³⁶, und Ric1p-Rigp1p, der Austausch an Ypt6 stimuliert¹³⁷. Die größte Gruppe der RabGEFs besteht aus monomeren Proteinen. Dazu gehören z.B. 18 Proteine mit einer Vps9p-Domäne, die den Nukleotidaustausch für Rab5 und Ypt51 beschleunigen¹³⁸⁻¹⁴⁰. Das Hefe-GEF Sec2 ist ein Austauschfaktor für Sec4¹⁴¹, ebenso wie das in Säugetieren verwandte Rabin8 ein GEF für Rab8 ist¹⁴². Rabin3 ist als GEF für Rab3 identifiziert worden, zeigt aber auch Aktivität für Rab8¹⁴³; ein weiteres GEF für Rab3 ist das Protein Rab3A-GEF¹⁴⁴. Ein anderes Protein mit GEF-Aktivität ist MSS4 und sein Hefehomolog DSS4, die Nukleotidaustausch an den

exozytotischen Rabs/Ypts Rab1, Rab3A, Rab8, Rab10 bzw. Ypt1 und Sec4 beschleunigen können^{90,145-148}.

Biophysikalische Daten für diese GEFs sind nur in Einzelfällen bekannt. Allerdings wurde der Nukleotidaustausch an den Systemen Ypt51-Vps9 und Ypt1-DSS4 kinetisch detailliert untersucht⁹⁰. Da diese GEFs den Nukleotidaustausch aber zu den anderen GEFs Ras-ähnlicher GTPasen vergleichsweise gering beschleunigen und strukturelle Daten für RabGEFs bisher nicht bekannt sind, ist unklar, ob RabGEFs einen Mechanismus anwenden, der dem anderer GEFs gleicht oder in wenigstens in seinen Grundzügen ähnelt. In der vorliegenden Arbeit sind die GEFs MSS4 und Sec2 Gegenstand biophysikalischer und struktureller Charakterisierung, um Einblick in den RabGEF-katalysierten Nukleotidaustausch zu erlangen. Daher wird in den folgenden Abschnitten ein Überblick über die Eigenschaften von MSS4 und Sec2 gegeben.

1.6. MSS4: Ein ungewöhnlicher Nukleotidaustauschfaktor

MSS4 (*mammalian suppressor of Sec4*) kommt in allen Gewebetypen vor, ist aber vor allem in Gehirnzellen in höherer Menge vorhanden¹⁴⁹. Hinweise auf die Stimulierung von Nukleotidaustausch an RabGTPasen kamen zunächst aus Untersuchungen Rab3A-abhängiger Neurotransmitterfreisetzung in Nervenzellen, die durch Überexpression von MSS4 stimuliert werden konnte¹⁴⁹. Auch kann in lebenden Zellen das Ausmaß GTP-gebundener Rab3-Isoformen um einen Faktor drei durch Koexpression mit MSS4 erhöht werden¹⁵⁰. Vermutlich in Zusammenarbeit mit anderen GEFs können MSS4-Proteine Exozytose regulieren^{141,151,152}. Weiterhin ist berichtet worden, dass MSS4 in einer Vielzahl maligner Tumore überexprimiert ist, was auf eine mögliche Funktion in der Krebsprogression durch Freisetzung trophischer Faktoren in Folge gesteigerter Sekretion hindeutet¹⁵³. Eine weitere Funktion von MSS4 mag in der Regulation der Gemütsverfassung liegen, da das MSS4-Gen im Gehirn nach chronischer Behandlung mit Antidepressiva hochreguliert ist¹⁵⁴.

Homologe zu MSS4 finden sich in evolutionär so diversen Spezies wie den Hefen *Saccharomyces cerevisiae* und *Schizosaccharomyces pombe* sowie dem Fadenwurm *Caenorhabditis elegans*, der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster*, Zebrafisch und Säugetieren (siehe Abbildung 6) und weisen damit auf eine hohe Bedeutung von MSS4 für die Lebensfähigkeit der Organismen hin¹⁵⁵. Allerdings scheint DSS4 (*dominant suppressor of Sec4*, das Hefehomolog zu MSS4) nicht essentiell für Hefezellen zu sein, da diese auch ohne das Protein lebensfähig sind¹⁴¹; DSS4 kann aber die Lebensfähigkeit temperatursensitiver dominant-negativer Sec4-Mutanten retten^{145,148}.

Obwohl Nukleotidaustauschaktivität für MSS4/DSS4 an etlichen RabGTPasen gezeigt werden konnte^{90,145,149}, weist es für einen GEF eine Reihe ungewöhnlicher Eigenschaften auf: MSS4/DSS4 ist ein kleines Protein (16kDa), bestehend aus lediglich einer Domäne, die

weder ein Membranlokalisierungssignal noch eine Membranlokalisierungsdomäne enthält und steht damit im Gegensatz zu den nach Aktivierung membranassozierten Multidomänenproteinen Sos, Tiam, Dbs, Intersectin, Gea(Sec7). Dieses relativ kleine Protein MSS4/DSS4 weist zwar Nukleotidaustauschaktivität auf, diese ist aber, verglichen mit vielen anderen Nukleotidaustauschfaktoren, von geringer katalytischer Effizienz^{90,155}. MSS4/DSS4 ist zytosolisch verteilt, zeigt aber auch leichte Membranlokalisierung über die wechselwirkenden RabGTPasen^{145,148,151}; dabei sollte bei einem in vesikelvermittelte Transportprozesse involvierter Faktor eine Membranlokalisierung zu erwarten sein. MSS4/DSS4 wirkt anders als andere GEFs mit geringer Spezifität und erkennt die exozytotischen Rab Proteine Rab1, Rab3A Rab8, Rab10, Sec4, Ypt1, sowie das endozytotische Rab15, das allerdings auffallende Sequenzhomologien zu den exozytotischen Rabs zeigt^{90,145,146,149,156}. Interessanterweise konnten in diesen Rab-Proteinen Aminosäuren identifiziert werden, die nur in exozytotischen Rabs, aber nicht in endozytotischen, streng konserviert sind (rot markierte Aminosäuren in Abbildung 3)⁷⁰. Diese Aminosäuren sind daher möglicherweise in die Bindung von MSS4/DSS4 involviert.

In Folge dieser ungewöhnlichen Eigenschaften und in Folge der geringen katalytischen Aktivität ist die Funktion von MSS4/DSS4 als Nukleotidaustauschfaktor in Frage gestellt und vorgeschlagen worden, dass diese Chaperone darstellen könnten, die den nukleotidfreien Zustand von RabGTPasen stabilisieren, wobei die Nukleotidfreisetzung lediglich eine physiologisch unbedeutende Nebenreaktion darstellt^{141,144}. Daher wurde vermutet, dass MSS4/DSS4 als Chaperon für falsch gefaltete, nukleotidfreie RabGTPasen fungiert, die im Falle von Anhäufung in der Zelle dominant-negative Effekte hervorrufen könnten¹⁵². Die geringe Austauschaktivität ist MSS4/DSS4 allerdings gemeinsam mit Vps9-enthaltenden Proteinen⁹⁰, sowie mit dem GEF Tiam für Rac⁹⁷, und mag eine Eigenart der Regulation von exozytotischen Rab-Proteinen sein. Trotz der geringen katalytischen Aktivität von MSS4/DSS4 beschleunigt es dennoch den Nukleotidaustausch um einen Faktor 100 bis 1000⁹⁰.

Die molekulare Struktur von MSS4 ist sowohl durch röntgenkristallographische Untersuchungen als auch mittels Kernresonanzspektroskopie (NMR) bestimmt worden (siehe Abbildung 6)^{70,157}. MSS4 ist ein dreischichtiges β -Protein, bestehend aus einem zentralen β -Faltblatt (β G- β K), das auf der einen Seite von einem β -*hairpin* (β B- β C) flankiert wird, und von einem dreisträngigen β -Faltblatt (β E, β F, β L) auf der anderen Seite. Des Weiteren enthält es zwei 3_{10} -Helices, 3_{10} A und 3_{10} B. Ein Zinkion, koordiniert durch die Thiolgruppen von Cysteinen aus zwei CxxC-Motiven (lokalisiert in den Schleifen β B- β C und β I- β J), spielt eine wichtige Rolle in der Verstärkung des hydrophoben Proteinkerns, gebildet durch den β B- β C-*hairpin*, der β G- β H-Schleife und dem zentralen β -Faltblatt. Vergleich der

EINLEITUNG

NMR-Struktur und der Röntgenstruktur zeigt einen flexiblen Bereich in der Schleife zwischen βE und βF , der eine hydrophobe Tasche partiell abzudecken vermag.

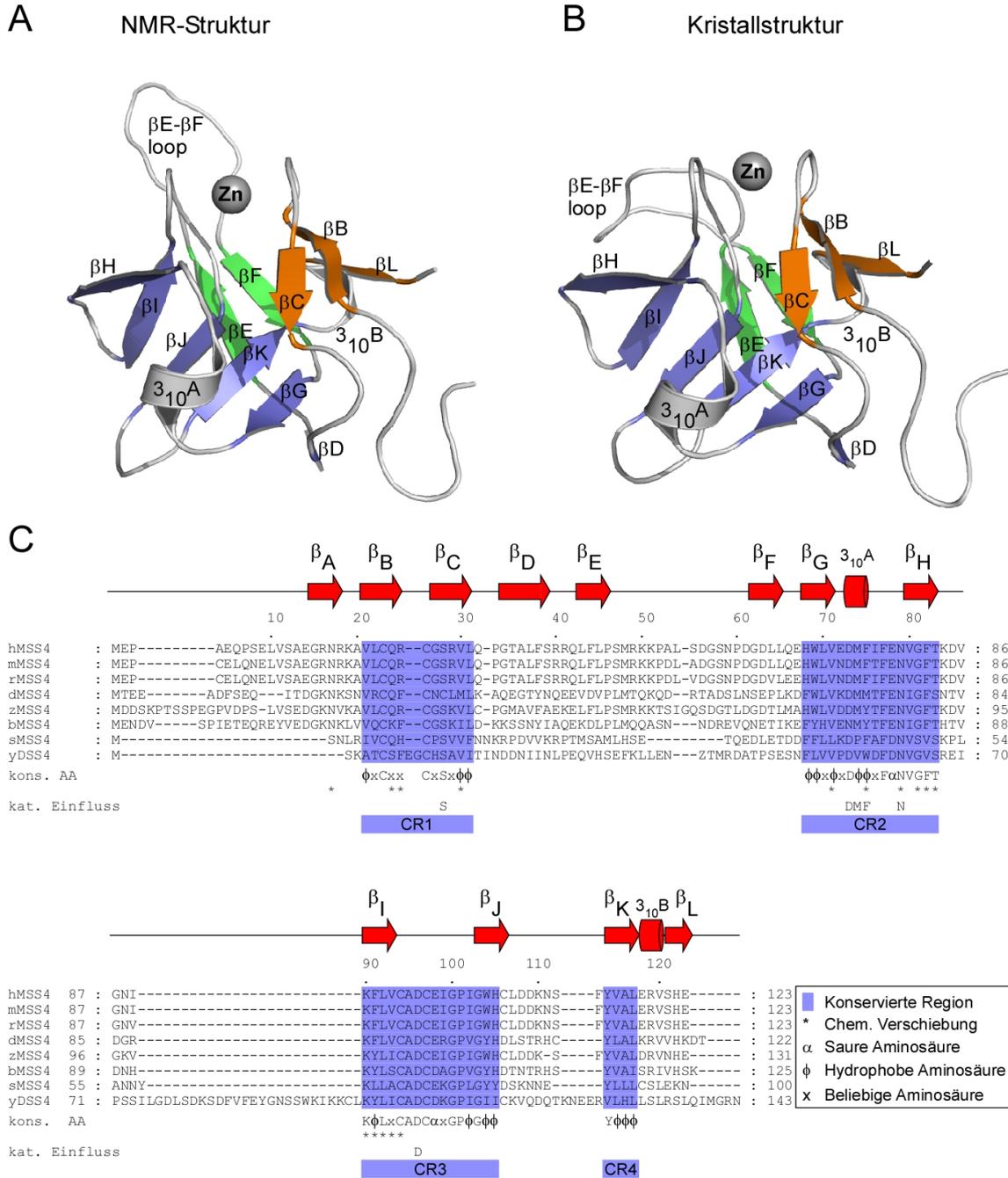


Abbildung 6: Strukturelle Eigenschaften von MSS4. (A) und (B) zeigen die molekulare Struktur von MSS4 aus röntgenkristallographischen⁷⁰ (A) bzw. kernresonanzspektroskopischen¹⁵⁷ (B) Untersuchungen (zentrales β -Faltblatt (βD und βG - βK): blau; flankierenden β -Faltblätter: grün (βE - βF) und orange (βB - βC und βL); essentielles Zinkion: graue Kugel). Zusätzlich aufgeführt sind die Helices $3_{10}A$ und $3_{10}B$. Auffälligster Unterschied zwischen Kristallstruktur und NMR-Struktur ist die unterschiedliche Konformation der βE - βF -Schleife, was auf eine besondere Mobilität dieses Elementes hinweist. (C) Strukturbasierter Aminosäuresequenzvergleich verschiedener MSS4-Proteine. Konservierte Bereiche sind blau unterlegt (CR1-CR4); diese Bereiche bilden die Grundlage für den Sequenzvergleich. In CR1 und CR3 befinden sich die Cysteine, welche das essentielle Zinkion von MSS4 koordinieren. Oberhalb des Sequenzvergleichs sind die Positionen der Sekundärstrukturelemente von MSS4 angegeben (rote Pfeile: β -Stränge; rote Zylinder: Helix $3_{10}A$ und $3_{10}B$). Unterhalb der Sequenzen sind konservierte Aminosäuren (kons. AA) angegeben. Aminosäuren, die in Mutagenesestudien Einfluss auf die GEF-Aktivität an Rab3A zeigen (kat. Einfluss), sind aufgeführt. (Sterne: vermutlich an Sec4-bindende Aminosäuren; hMSS4: humanes MSS4; mMSS4: MSS4 aus *Mus musculus*; rMSS4: MSS4 aus *Rattus norvegicus*; dMSS4: MSS4 aus *Drosophila melanogaster*; zMSS4: MSS4 aus *Danio rerio*; bMSS4: MSS4 aus *Bombyx mori*; sMSS4: MSS4 aus *S.pombe*; yDSS4: DSS4 aus *S.cerevisiae*) (Abbildung (B) nach Zhu et al¹⁵⁵)

In der Vergangenheit ist in mehreren Untersuchungen versucht worden, die Bindungsstelle von Ypt/Rab-GTPasen an MSS4/DSS4 zu identifizieren. In einer kernresonanzspektroskopischen Analyse von humanem MSS4 und der Hefe-GTPase Sec4 konnte gezeigt werden, dass die Wasserstoffatome (^1H) bzw. Stickstoffatome (^{15}N) der Amidgruppen bestimmter Aminosäuren chemische Verschiebungen bei Bindung von MSS4 an Sec4 eingehen (siehe Abbildung 6). Diese chemischen Verschiebungen lassen darauf schließen, dass die entsprechenden Aminosäuren in die Bindung von Sec4 involviert sind¹⁵⁷. Die vermuteten Sec4-bindenden Aminosäuren auf der Oberfläche von MSS4 konzentrieren sich dabei auf die Schleifen βB - βF und βI - βJ , welche das essentielle Zinkion koordinieren, sowie die konservierte Region 2, welche α -Helix 3₁₀A enthält. In weiteren Studien wurde der Einfluss von Aminosäuremutationen in MSS4 und Rab3A auf den katalysierten Nukleotidaustausch untersucht^{70,155}. Verschiedene essentielle Aminosäuren konnten identifiziert werden, die einen verringernden Einfluss auf die Katalysegeschwindigkeit und die Affinität von MSS4 und Rab3A hatten (siehe Abbildung 3 und Abbildung 6) und damit vermutlich in die Ausbildung der Interaktionsfläche zwischen den beiden Proteinen involviert sind. Die in dieser Studie identifizierten Aminosäuren in Rab3A umfassen Aspartat45, Phenylalanin51, Lysin60, Valin61 und Threonin89 (gerahmte Aminosäuren in Abbildung 3)⁷⁰. Interessanterweise sind diese Aminosäuren nur in exozytotischen, aber nicht in endozytotischen Rabs streng konserviert. Die identifizierten Aminosäuren von katalytischer Bedeutung in MSS4 umfassen Serin28, Aspartat73, Methionin74, Phenylalanin75 und Aspartat96¹⁵⁵, und befinden sich in den konservierten Bereichen CR1, CR2 und CR3 in MSS4.

In einer weiteren Untersuchung ist versucht worden, Aminosäuren in der GTPase Ypt1 zu identifizieren, die in die Bindung an DSS4 involviert sind¹⁵⁸. Die Autoren behaupten, eine Reihe von Aminosäuren (Positionen 42, 43, 49, 69, 71, 73, 75, 107, 109 und 115 in Ypt1) identifizieren zu können, die in der Interaktion von DSS4 und Ypt1 von Bedeutung sind. Da sich diese Aminosäuren teilweise in den Bereichen *SwitchI* und *SwitchII* befinden, vermuten die Autoren einen Nukleotidaustauschmechanismus, der dem von Ras und Arf ähnelt.

Alle in der Vergangenheit unternommenen Studien zur Wechselwirkung zwischen MSS4/DSS4 und RabGTPasen konnten die Bindungsoberfläche direkt identifizieren oder den Katalysemechanismus mit Sicherheit aufklären. MSS4 weist keine strukturelle Ähnlichkeit zu anderen bekannten GEFs auf. Eine Vorhersage seiner Wirkungsweise ist kaum möglich und bedarf der molekularen Struktur und der Bestimmung kinetischer Parameter des System Rab-Nukleotid-MSS4/DSS4. Auf diese Details wird im Ergebnisteil der vorliegenden Arbeit eingegangen.

1.7. Sec2: Ein gewöhnlicher Nukleotidaustauschfaktor

In Hefe werden Vesikel des Golgi-Apparates in Richtung polarisierten Zellwachstums transportiert, einschließlich der distalen Knospen und dem Hals zwischen Mutter und Tochterzelle. Dieser Prozess erfordert das Aktinzytoskelett und einen molekularen Motor, das KlasseV Myosin Myo2p¹⁵⁹⁻¹⁶². Die polarisierte Ablieferung der post-Golgi-Vesikel ist zusätzlich abhängig von der Funktion der Proteine Sec4 und Sec2. Sec4 ist ein Rab-Protein, das diesen Schritt des sekretorischen Signalwegs reguliert und Sec2 ist der GEF, welcher die Aktivierung von Sec4 kontrolliert^{141,163}. Sec4GTP assoziiert mit den Membranen sekretorischer Vesikel an der Plasmamembran über die am C-Terminus kovalent verknüpften Geranylgeranylreste^{164,165}. Sec2 ist ein Multidomänenprotein (siehe Abbildung 7) mit einem Molekulargewicht von 85kDa, das unterschiedliche funktionelle Bereiche aufweist¹⁶⁶. Am C-Terminus befindet sich ein Abschnitt von 58 Aminosäuren (Aminosäuren 451-508), der notwendig, aber nicht hinreichend für die Membranassoziation des Proteins ist¹⁶⁷; vermutlich existiert ein Sec2-Rezeptor, über den Sec2 an die Membran binden kann. Über einen N-terminalen Bereich (Aminosäuren 161-374) kann Sec2 an die GTP-gebundene Form der GTPasen Ypt31/Ypt32 binden¹⁶⁸. Ypt31/Ypt32 lokalisieren am *trans*-Golgi und an Recyclingvesikeln¹⁶⁹ und sind in das Proteinrecycling zwischen Plasmamembran, Endosomen und Golgi-Kompartiment involviert¹⁷⁰. Es ist möglich, dass die Interaktion von Ypt31/32 mit Sec2 eine Voraussetzung für Sec4-Aktivierung und damit für die Interaktion mit nachgeschalteten Effektorproteinen ist, wie z.B. für den Exozystkomplex^{168,171-173}. Am N-Terminus (Aminosäuren 1-160) besitzt Sec2 eine Domäne, die unabhängig vom Rest des Proteins den Guaninnukleotidaustausch an Sec4 stimulieren kann¹⁴¹ und damit Sec4 aktiviert und den sekretorischen Signalweg reguliert.

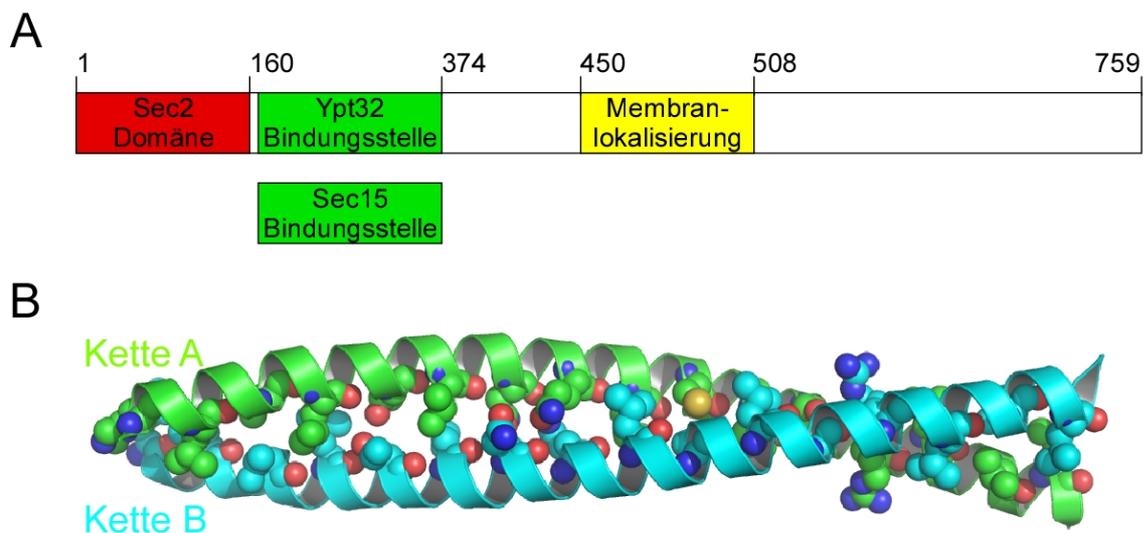


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Domänenstruktur von Sec2. In **(A)** sind die in verschiedenen Studien identifizierte Domänen von Sec2 aufgeführt¹⁷⁴. Die Grenzen der Domänen in der Primärstruktur sind durch Aminosäurepositionen oberhalb der Abbildung angegeben. Da die Sec2-Domäne von Sec2 wahrscheinlich eine parallele *Coiled-Coil*-Struktur einnimmt, ist zur Illustration dieses Strukturmotives in **(B)** die Struktur der *Coiled-Coil*-Domäne von Kinesin (Aminosäuren 292-347, PDB-Zugangsnummer 1N6M¹⁷⁵) exemplarisch gezeigt. (Kugeldarstellung: Kontaktierende Aminosäuren zwischen den Helices)

Die Rolle von Sec2 im vesikelvermittelten Transport in Hefe ist in einem möglichen Model nach dem bisherigen Stand des Wissens zusammengefasst worden¹⁷⁴: Sec2 wird durch Interaktion mit aktivem, GTP-gebundenem Ypt32 an die Membran sekretorischer Vesikel rekrutiert. Dort aktiviert Sec2 die RabGTPase Sec4, indem es GDP gegen GTP austauscht. Das aktive Sec4 interagiert mit nachgeschalteten Effektormolekülen, wie z.B. der Komponente Sec15 des Exozystkomplexes, wodurch Ypt32 aus dem Komplex mit Sec2 verdrängt wird. Die Assoziation von Sec2 (dem Sec4GEF) mit Sec15 (dem Sec4-Effektor) mag dazu dienen, Sec4 in einem hoch aktivierten Zustand zu halten, was eventuell zur effektiven Initiierung dieses Schrittes im exozytotischen Prozess notwendig ist.

Der aminoterminal Bereich von Sec2 (Aminosäuren 1-160), der die Domäne mit identifizierter GEF-Aktivität enthält, hat große Sequenzähnlichkeit zu *Coiled-Coil*-Proteinen¹⁷⁶ wie Myosin, TypII Keratin, Troponin und Tropomyosin. Beispielsweise beträgt die Sequenzhomologie zu der schweren Kette von kardischem Myosin α 24.6%^{166,177}. Dieser Bereich im Myosin ist stabförmig und dies spricht dafür, dass Sec2 ebenfalls in der Region 1-160 ein stabförmiges *Coiled-Coil* ausbildet¹⁶⁶ (Übersichtsartikel zu strukturellen Eigenschaften von *Coiled-Coil*-Proteinen siehe¹⁷⁸). Ein *Coiled-Coil* ist ein verbreitetes strukturelles Motiv in Proteinen, das aus zwei bis fünf α -Helices besteht, die sich umeinander in eine Helix winden und damit eine Art Superspirale bilden (siehe Abbildung 7). *Coiled-Coil*-Proteine sind gewöhnlich leicht anhand ihrer Aminosäuresequenz zu identifizieren, da jede der Helices ein definiertes, mehrfach periodisch aufeinander folgendes Muster aufweist. Die Periodizität beträgt für linksgängige *Coiled-Coils* sieben Aminosäuren, die Aminosäurepositionen werden in der einen Helix mit (a-b-c-d-e-f-g) und in der anderen mit (a'-b'-c'-d'-e'-f'-g') bezeichnet. In diesem Model sind „a“ und „d“ typischerweise apolare Aminosäurereste, die die Berührungsfläche zwischen den kontaktierenden α -Helices bilden. Die Positionen „e“ und „g“ sind polare Aminosäuren, die der umgebenden Lösung zugänglich sind und die Spezifität zwischen den Helices durch elektrostatische Interaktionen vermitteln. Suche nach *Coiled-Coil*-Regionen mit publizierten Algorithmen^{179,180} sagen eine starke Neigung von Sec2 voraus, zwischen den Aminosäuren 1-160 ein *Coiled-Coil* zu bilden und eventuell auch als paralleles *Coiled-Coil* vorzuliegen.

Die wenigen bisher kinetisch charakterisierten RabGEFs, wie DSS4, Vps9 und Rabex5, zeigen nur geringe GEF-Aktivität. In der Hoffnung, ein RabGEF zu finden, das ähnliche Effizienz wie die schnellen Austauschfaktoren Sos, RCC1 und Ef-Tu zeigt, ist die GEF-Domäne von Sec2 (Aminosäuren 1-165) Gegenstand biophysikalischer Untersuchungen der vorliegenden Arbeit gewesen.

2. ZIELSETZUNG DER ARBEIT

Verschiedene Nukleotidaustauschfaktoren kleiner GTPasen sind in der Vergangenheit Gegenstand detaillierter kinetischer und struktureller Untersuchungen gewesen. Die Ergebnisse dieser Analysen haben die Mechanistik des GEF-katalysierten Nukleotidaustauschprozesses teilweise mit atomarer Auflösung beleuchtet und wesentliche Unterschiede, aber auch Gemeinsamkeiten zwischen den verschiedenen Unterfamilien Ras-ähnlicher GTPasen herausarbeiten können. Trotz vielfacher Ähnlichkeiten in der Realisierung der Nukleotidfreisetzung und der Stabilisierung des nukleotidfreien Übergangszustandes der GTPase:GEF-Komplexe, unterscheiden sich die einzelnen GEFs jedoch in ihrer Struktur und damit der Komplexbildung stark untereinander. Daher ist für jedes GEF:GTPase-Paar eine individuelle strukturelle und kinetische Charakterisierung durchzuführen; weder lassen sich aus der Bestimmung der molekularen Komplexstruktur Rückschlüsse auf die kinetischen Eigenschaften des GEFs schließen, noch schafft eine genaue Prüfung der kinetischen Merkmale eine Vorhersage der strukturellen Interaktion. Nur die Verbindung beider analytischen Ansätze ergibt potentiell die Möglichkeit, die individuellen Charakteristika eines GEFs eventuell auch auf seine physiologische Funktion hin diskutieren zu können.

Einleitend wurde bereits darauf hingewiesen, dass in früheren Studien Proteine identifiziert wurden, welche GEF-Aktivität für die GTPase-Unterfamilie der Rab-Proteine aufweisen. So sind kinetische Betrachtungen zu den Proteinen DSS4, Vps9 und Rabex5, aber auch zellbiologische Untersuchungen zu den Proteinen Rabin3, Rabin8, Rabex5 und den Proteinkomplexen TRAPP, HOPS und Ric1p-Rigp1p durchgeführt worden. Im Gegensatz zu nahezu allen anderen Unterfamilien Ras-ähnlicher GTPasen konnte bisher keine molekulare Struktur eines Komplexes aus einem Rab-Protein und einem entsprechenden GEF bestimmt werden, lediglich die Strukturen der Apo-Formen der GEFs MSS4 und Vps9 konnten gelöst werden. Wie aber bereits dargelegt, können, aufgrund der strukturellen und kinetischen Heterogenität der GEFs im Allgemeinen, aus den Strukturen von MSS4 und Vps9 keine Rückschlüsse auf die Details der Rab:GEF-Interaktion gezogen werden. Hierfür ist die Bestimmung der Struktur individueller Rab:GEF-Komplexe notwendig.

Um Einblick in den Nukleotidaustauschprozess an RabGTPasen zu bekommen, wurden in der vorliegenden Arbeit zwei Proteine ausgewählt, die eine bekannte Nukleotidaustauschaktivität besitzen, und es wurde versucht, über Röntgenkristallstrukturanalyse die Struktur dieser Proteine in Komplex mit ihren entsprechenden Rab-Proteinen aufzulösen. Kinetische Untersuchungen des Austauschprozesses sollten dabei die erhaltenen strukturellen Daten interpretierbar machen und eine vergleichende Analyse mit GEFs anderer GTPase-Unterfamilien ermöglichen. Dazu wurden die Proteine MSS4 und Sec2 ausgewählt.

Das Hefehomolog zu MSS4, DSS4, ist kinetisch bereits charakterisiert worden. Es zeigt nur geringe Nukleotidaustauschaktivität an seinem respektiven Rab-Protein Ypt1. Für MSS4 sollten in der vorliegenden Arbeit die Ergebnisse der kinetischen Analyse von DSS4 für das Säugetiersystem bestätigt werden. Zusätzlich, da die Strukturbestimmung von DSS4 in Komplex mit einem Rab-Protein bisher fehlschlug, sollte die Kristallisation und Strukturanalyse von MSS4 in Komplex mit einer RabGTPase versucht werden, um die kinetischen Daten anhand molekularer Details zu reflektieren. Insbesondere sollte geklärt werden, ob für die geringe katalytische Effizienz von DSS4, und damit vermutlich von MSS4, eine rationale Begründung in der Struktur eines MSS4:Rab-Komplexes zu finden ist. Aufgrund verschiedenster Untersuchungen anderer Arbeiten sind für MSS4/DSS4 Zweifel an der Funktion als GEF geäußert worden und es wurde die Vermutung angestellt, MSS4/DSS4 könne in erster Linie Chaperonaktivität für fehlgefaltete Rab-Proteine besitzen, in der die Nukleotidfreisetzung nur ein notwendiges, unvermeidbares Nebenprodukt der eigentlichen Aufgabe des Proteins wäre. Die Ergebnisse der Kombination aus kinetischen und strukturellen Untersuchungen sollen die physiologische Rolle von MSS4/DSS4 näher beleuchten.

Wie bereits mehrfach erwähnt, sind bisher keine molekularen Strukturen von RabGEFs in Komplex mit einem Rab-Protein vorhanden; weiterhin sind ebenso keine RabGEFs bekannt, die einen ähnlich effizienten Nukleotidaustausch zeigen wie etwa die Proteine Ef-Ts, RCC1 oder Sos an ihren entsprechenden GTPasen. Es stellt sich daher die Frage, ob für Rab-Proteine überhaupt effiziente GEFs existieren, oder ob für RabGTPasen die Effizienz des Nukleotidaustauschs weniger bis gar nicht entscheidend ist. Zur Klärung dieser Frage wurde als weiteres Protein mit berichteter GEF-Aktivität Sec2 für kinetische und strukturelle Charakterisierungen gewählt worden. Zwar sind die Parameter wie Effizienz und Geschwindigkeit des Nukleotidaustauschs von Sec2 unbekannt, allerdings lässt sich folgende Überlegung anstellen, welche die Vermutung stützt, Sec2 könnte distinkte GEF-Eigenschaften aufweisen: Sowohl MSS4/DSS4 als auch Sec2 wurden als Proteine mit GEF-Aktivität für das Rab-Protein Sec4 identifiziert. Es ist nun unwahrscheinlich, dass beide Proteine eine redundante Funktion in der Sec4-Aktivierung ausüben und vermutlich haben diese beiden Proteine unterschiedliche physiologische Aufgaben. Wie einleitend geschildert weist Sec2 als Multidomänenprotein klare strukturelle Unterschiede zu dem kleinen, globulären MSS4/DSS4-Molekül auf und lässt daher unterschiedliche Regulation der Proteine vermuten. Für die Austauschdomäne von Sec2 (Aminosäuren 1-160) wird eine ausgedehnte *Coiled-Coil*-Struktur angenommen, damit im Gegensatz stehend zu der globulären Form von MSS4/DSS4. Daher müssen diese beiden GEFs (MSS4 und Sec2) auf unterschiedliche Weise den Nukleotidaustausch an Sec4 katalysieren, was sich voraussichtlich auch in den kinetischen Parametern der Interaktion und der Nukleotidfreisetzung äußern wird.

3. ERGEBNISSE

Die biophysikalische Untersuchung von Nukleotidaustauschfaktoren für RabGTPasen ist Bestandteil der vorliegenden Arbeit und soll dem Vergleich von Proteinen dieser GEF-Klasse untereinander und zu bekannten GEFs anderer GTPasen dienen. Zu diesem Zweck wurden zwei Proteine mit bekannter Nukleotidaustauschaktivität gewählt: MSS4 und Sec2. Die Ergebnisse der Analysen beider Proteine werden getrennt aufgeführt. Abschnitt 3.1 widmet sich der Analyse der biophysikalischen Parameter und der strukturellen Charakterisierung der Interaktion von MSS4 mit der RabGTPase Rab8. Abschnitt 3.2 fasst die Ergebnisse aus der biophysikalischen Untersuchung von Sec2 mit seinem Interaktionspartner Sec4 zusammen.

3.1. Der Nukleotidaustauschfaktor MSS4

3.1.1. Strategie zur Charakterisierung von MSS4

Wie bereits dargelegt sind MSS4 und DSS4 Proteine, die ein breites Interaktionsspektrum zeigen und an folgende exozytotische Rabs binden: Das Protein MSS4 interagiert mit Rab1a, Rab3A, Rab8, Rab10, sowie eventuell mit Rab15; für DSS4 ist gezeigt worden, dass es mit Sec4 und Ypt1 Komplexe bilden kann. Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist die strukturelle und biophysikalische Charakterisierung von MSS4 bzw. DSS4 und die Untersuchung des durch MSS4/DSS4-katalysierten Nukleotidaustauschs. Die strukturelle Untersuchung sollte mit Hilfe kristallographischer Methoden erfolgen und erforderte dafür die Isolierung eines stabilen MSS4/DSS4:Rab-Komplexes. Um die Wahrscheinlichkeit zur Reinigung eines stabilen Komplexes sowie der erfolgreichen Kristallisation und des Erfolges der nachfolgenden Untersuchungen zu erhöhen, wurde von der Eigenschaft von DSS4/MSS4 Gebrauch gemacht, mit mehreren Rabs Komplexe bilden zu können: MSS4 und DSS4 wurden mit den entsprechenden Rabs kombiniert und zur Komplexbildung eingesetzt, wobei auch versucht wurde heterologe Komplexe zu bilden (siehe Abbildung 8A). Flexible, ungeordnete oder strukturell wenig definierte Bereiche in Proteinen sind für die Kristallisation von Biomolekülen hinderlich. Daher wurden möglichst kompakte Moleküle konstruiert und potentiell flexible Abschnitte des Proteins, welche die Kristallisation des Proteins negativ beeinflussen könnten, mit Hilfe molekularbiologischer Techniken entfernt. Abschnitte, die selten die Gesamtfaltung von Proteinen verändern, befinden sich normalerweise in den terminalen Bereichen des Proteins, namentlich dem N- und C-Terminus. Sowohl MSS4, als auch die RabGTPasen besitzen in den terminalen Bereichen flexible Elemente, welche für die Faltung des Proteins nicht von Bedeutung sind und die leicht durch Sequenzhomologievergleiche identifiziert werden können (siehe Abbildung 8B).

Mit Hilfe der bekannten Strukturen von RabGTPasen und von MSS4 lassen sich die molekularbiologisch zu eliminierenden Abschnitte ausmachen um die Proteine so zu modifizieren, dass die Struktur möglichst kompakt wird, ohne dabei die Tertiärstruktur zu stören.

Die Analyse des strukturbasierten Sequenzhomologievergleichs der RabGTPasen führte zur Konstruktion folgender molekularbiologisch verkürzter Proteine: Rab1A₁₋₁₈₃, Rab3A₁₄₋₁₈₄, Rab8₁₋₁₈₃, Rab10₁₋₁₈₁, Rab15₁₋₁₈₂, Ypt1₁₋₁₇₇ und Sec4₁₉₋₁₈₆. Für die vorliegende Arbeit wurden ausschließlich diese verkürzten Konstrukte verwendet, weswegen im Folgenden auf die Angabe der Verkürzungen verzichtet wird. Das Protein MSS4 wurde ebenfalls in verkürzter Form konstruiert; basierend auf der bekannten Struktur von MSS4 wurde der N-terminale Bereich um neun Aminosäuren verkürzt. Dem Protein DSS4 fehlt ein solcher Überhang (vergleiche Abbildung 6), und daher ist das Protein in voller Länge hergestellt worden.

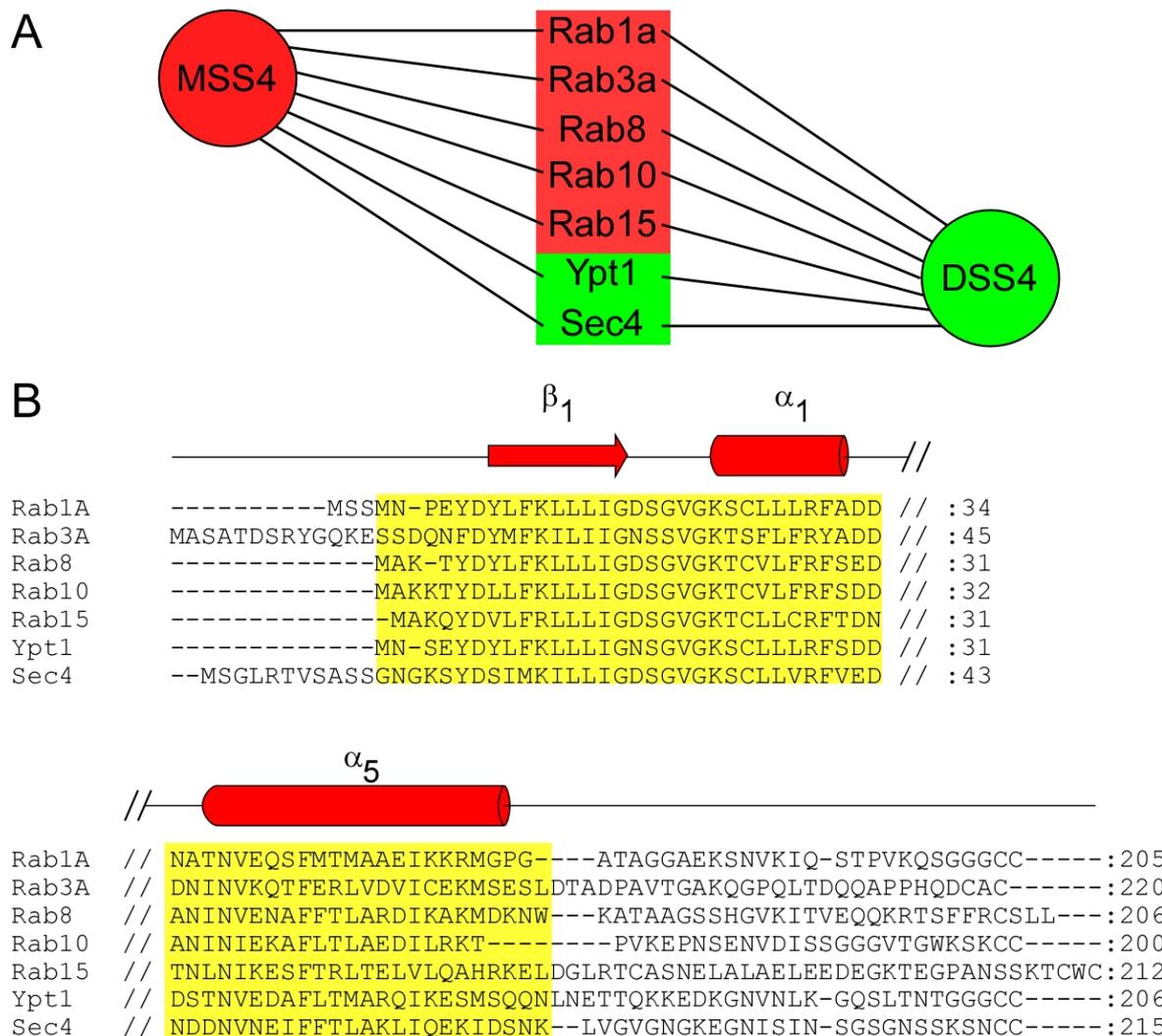


Abbildung 8: Strategie der MSS4/DSS4:Rab-Komplexerzeugung. **(A)** Schematische Darstellung der möglichen Interaktionen zur Komplexbildung (natürlichen Interaktionspartner von MSS4: rot, von DSS4: grün). Verbindungen geben an, welche Komplexe für eine mögliche strukturelle Untersuchung gebildet werden könnten. **(B)** Strukturbasierter Sequenzhomologievergleich der unter (A) aufgeführten RabGTPasen zur Identifizierung flexibler N- und C-terminaler Überhänge (Gelb unterlegte Bereiche: konservierte strukturelle Elemente der GTPase-Domäne). Oberhalb des Sequenzvergleichs sind die Sekundärstrukturelemente der GTPase angegeben. (Übersprungene Bereiche sind durch „//“ angedeutet). (Sequenzen: Humanes Rab1A und Rab10, Rab3A und Rab8 aus Maus (*Mus musculus*), Rab15 aus Ratte (*Rattus norvegicus*), Ypt1 und Sec4 aus Hefe (*S. cerevisiae*))

Verschiedene Kombinationen zwischen Rab-Proteinen und MSS4 sind zur Reinigung und Komplexbildung eingesetzt worden. Eine erfolgreiche Kristallisation und Strukturbestimmung wurde letztlich mit dem Komplex aus MSS4 und Rab8 erreicht. Daher wurde im Laufe der vorliegenden Arbeit ausschließlich die biophysikalische Charakterisierung des Systems aus Rab8, MSS4 und Guaninnukleotiden durchgeführt, um die erhaltenen Daten im Kontext der kinetischen Parameter diskutieren zu können. Auf die Herstellung und Reinigung der erforderlichen Komponenten für die Strukturbestimmung und kinetische Analyse soll im Folgenden kurz eingegangen werden.

3.1.2. Expression und Reinigung der Komponenten MSS4, Rab8:GDP und MSS4:Rab8

Die Proteine MSS4 und Rab8:GDP, sowie der nukleotidfreie Komplex MSS4:Rab8 sind zur strukturellen und kinetischen Untersuchung des MSS4-katalysierten Nukleotidaustauschs erforderlich und mussten daher produziert und gereinigt werden. Zu diesem Zweck wurden bakterielle Expressionsvektoren konstruiert, welche die genetischen Information für MSS4₁₀₋₁₂₃ oder Rab8₁₋₁₈₃ enthalten, und im Falle von MSS4 die nachfolgende Reinigung über Metallaffinitätschromatographie erlaubten. Das Protein MSS4 konnte nach etablierten Protokollen problemlos in ausreichenden Mengen gereinigt werden¹⁸¹. Dagegen kann die GTPase Rab8 durch den bakteriellen Wirt nicht in löslicher Form hergestellt werden¹⁴². Aus diesem Grunde ist versucht worden, durch gemeinsame Expression von MSS4 und Rab8 die Löslichkeit von Rab8 mit Hilfe der berichteten solubilisierenden Effekte von MSS4 zu erhöhen^{151,158} und somit bereits *in vivo* den Komplex der beiden Proteine zu generieren. Dafür wurde MSS4 in einem modifizierten pET19-Vektor in den bakteriellen Wirt transformiert und konnte als Fusionsprotein mit einem N-terminalen Affinitätsanker für Metallaffinitätschromatographie exprimiert werden, der durch Katalyse der Protease TEV (*Tobacco Etch Virus Nla* Protease) im weiteren Verlauf des Proteinreinigung vom Protein abgetrennt werden konnte. Das Protein Rab8 wurde in einem pET30a-Expressionplasmid zusammen mit MSS4-Vektor in bakterielle Zellen transformiert und gemeinsam exprimiert. Zwar resultierte die gemeinsame Expression von MSS4 (in pET19mod) und Rab8 (in pET30a) in einem geringen Expressionsniveau beider Proteine, ergab aber den erwünschten löslichen MSS4:Rab8-Komplex. Dieser ist durch nachfolgenden Verdau mit der TEV-Protease von seinem an MSS4 befindlichen Affinitätsanker befreit und in sehr guter Reinheit, überprüft durch denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese, erfolgreich in der Kristallisation eingesetzt worden (siehe Abbildung 9). Größenausschlusschromatographie konnte zeigen, dass MSS4 und Rab8 als monomere Proteine vorliegen, die einen heterodimeren, stöchiometrischen Komplex bilden können.

Der konzentrierte MSS4:Rab8-Komplex wurde zur Kristallisation eingesetzt. Ausgehend von einem Hochdurchsatzverfahren konnten bereits nach wenigen Tagen kleine, nadelförmige Kristalle beobachtet werden (siehe Abbildung 9). Die Kristallisationsbedingungen konnten durch Variation der Proteinkonzentration, des pH-Wertes, der Salzkonzentration, Zugabe des Additivs 1,2,3-Heptantriol und Animpfen frischer Kristallansätze mit bereits gewachsenen Kristallen so optimiert werden, dass aus kleinen, nadelförmigen Kristallen plattenförmige, vereinzelt wachsende Kristalle ausreichender Größe erzeugt werden konnten, welche die zur Strukturaufklärung notwendige Qualität besaßen.

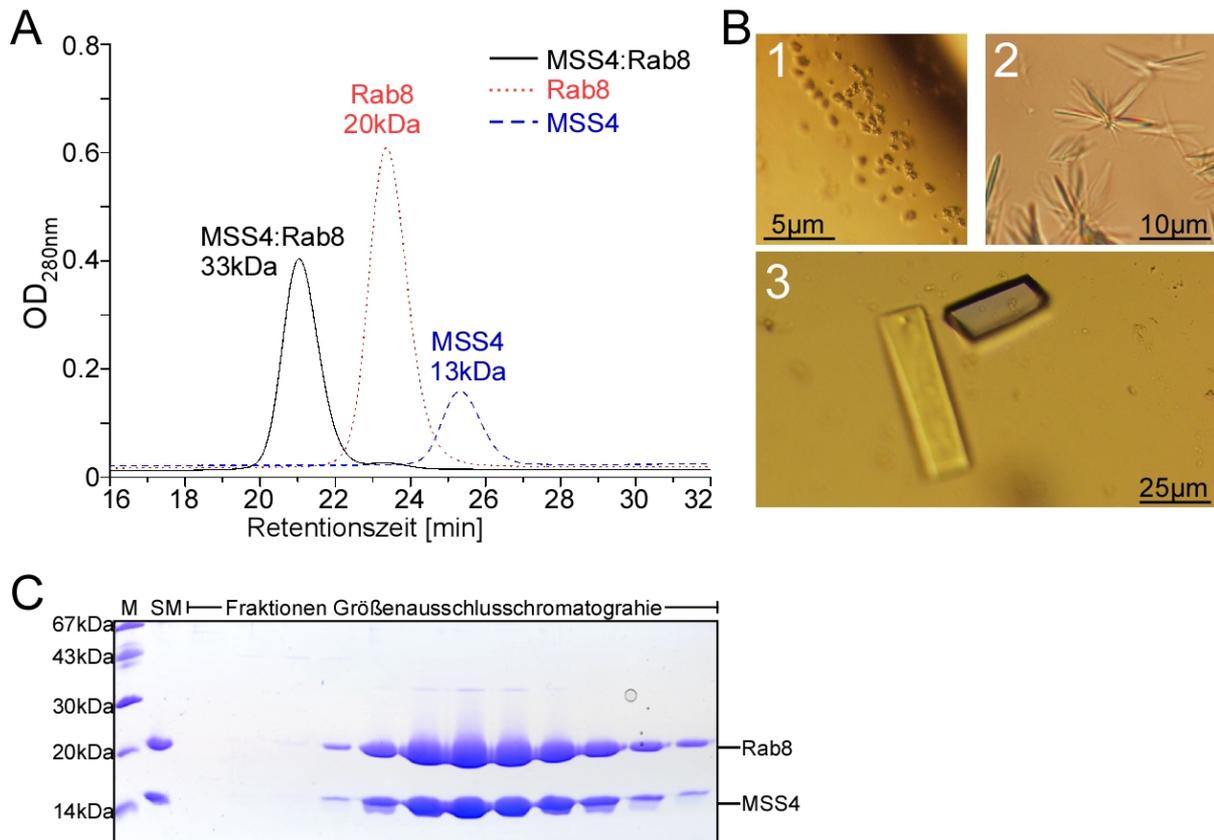


Abbildung 9: Komplexförmung und Kristallisation von MSS4:Rab8. **(A)** Vergleichende Darstellung der Größenausschlusschromatographie von MSS4, Rab8 und des MSS4:Rab8-Komplexes. Deutlich erkennbar ist die Verschiebung zu geringeren Retentionszeiten bei der Bildung der MSS4:Rab8-Komplexes (33kDa) aus den Komponenten Rab8 (20kDa) und MSS4 (13 kDa). Die Chromatographiesäule wurde zuvor mit gängigen Proteinstandards kalibriert, um die angegebenen Molekulargewichte experimentell zu bestätigen. **(B)** Optimierung der Kristallisation von MSS4:Rab8. Zunächst wurden kleine nadelförmige Kristalle erhalten (1), die durch Variation der Proteinkonzentration, des pH-Wertes, der Salzkonzentration sowie durch Zugabe des Additivs 1,2,3-Heptantriol und Animpfen frischer Kristallansätze mit bereits gewachsenen Kristallen über größere Nadeln (2) bis hin zu größeren plattenförmigen Kristallen (3) hin optimiert werden konnten (optimale Bedingungen siehe Abschnitt 6.5.1.1). **(C)** Reinheit des isolierten MSS4:Rab8, demonstriert an Größenausschlusschromatographie des Komplexes. Das Ergebnis der Polyacrylamidgelelektrophorese zeigt die exzellente Reinheit des MSS4:Rab8-Komplexes im letzten Schritt seiner Reinigung. (M: Standardproteinmarker mit angegebenen Molekulargewichten (links); SM: Startmaterial vor der Chromatographie)

Zur kinetischen Charakterisierung des GTPase:Nukleotid:GEF-Systems war die Herstellung von isoliertem, monomeren Rab8:GDP von Bedeutung. Da Rab8 aber nicht über bakterielle Expression in ausreichender Menge löslich hergestellt werden konnte, wurde als Strategie die Denaturierung gefolgt von Renaturierung angewendet. Dazu wurde Rab8 zunächst in unlöslicher Form mit maximaler Produktionsrate durch den bakteriellen Wirt exprimiert, das

ERGEBNISSE

unlösliche Rab8 dann durch fraktionierende Zentrifugation partiell gereinigt und mit Hilfe denaturierenden Guanidiniumhydrochlorids (GdnHCl) vollständig entfaltet und in Lösung gebracht. Über Rückfaltung von Rab8 durch plötzliche Verdünnung des denaturierten Proteins in großes Volumen an Renaturierungspuffer konnte das native Protein mit sehr guter Löslichkeit gereinigt werden. Da das Protein sich problemlos auf mindestens 1mM konzentrieren ließ, liegt der Grund für die bakterielle Unlöslichkeit von Rab8 offensichtlich in dem gewählten Expressionssystem und nicht in einer Unlöslichkeit von Rab8 *per se*. Die Funktionalität des Proteins wurde durch Analyse des Nukleotidbindungsverhaltens und der GTPase-Aktivität von Rab8 überprüft.

3.1.3. Thermodynamische Betrachtungen des Nukleotidaustauschs

Kinetische Studien des MSS4-katalysierten Nukleotidaustauschs an der RabGTPase Rab3A lassen vermuten, dass MSS4 ähnlich seinem Hefehomolog DSS4 eine vergleichsweise geringe Austauschaktivität gegenüber den klassischen GEFs RCC1, Sos oder Ef-Ts zeigt^{70,90}. Detaillierte Untersuchungen der Reaktionsgleichgewichte zwischen Rab8, MSS4 und den Guaninnukleotiden GDP/GTP wurden bisher allerdings nicht publiziert. Daher wurden in der vorliegenden Arbeit Kombinationen spektroskopischer Methoden zur Analyse des kinetischen Systems der beteiligten Reaktionspartner angewendet und die kinetischen Parameter für die MSS4:Rab8:Nukleotid Interaktionen bestimmt. Das allgemeine Reaktionsschema ist in Abbildung 10 zusammengefasst:

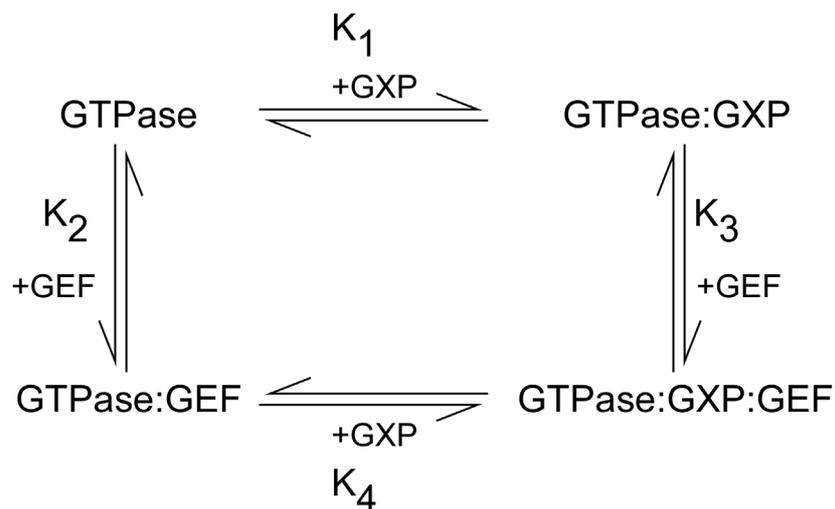


Abbildung 10: Interaktionsschema von GEFs, GTPasen und Nukleotiden. Das Schema zeigt die möglichen Interaktionen zwischen GTPasen (z.B. Rab8 und Sec4), Nukleotidaustauschfaktoren (z.B. die GEFs MSS4 und Sec2) und Nukleotiden (GXP, wie z.B. GDP und GTP) auf. K_1 , K_2 , K_3 und K_4 bezeichnen die Affinitätskonstanten der entsprechenden Gleichgewichte.

Die Gleichgewichtskonstante K_1 beschreibt die Assoziation zwischen nukleotidfreier Rab8 und den Nukleotiden GDP oder GTP. Die Bildung des ternären Komplexes aus den Komponenten Rab8:GDP und MSS4 zu Rab8:GDP:MSS4 wird durch K_3 ausgedrückt, die Bildung des Komplexes aus den Komponenten GDP/GTP und dem nukleotidfreiem binären

MSS4:Rab8-Komplex dagegen durch die Gleichgewichtskonstante K_4 . Ein letztes Gleichgewicht in diesem Schema ist die Assoziation von nukleotidfreiem Rab8 mit MSS4 unter Bildung von nukleotidfreiem MSS4:Rab8-Komplex, repräsentiert durch K_2 . Einfache thermodynamische Überlegungen erfordern, dass das Produkt der Affinitäten K_1 und K_3 gleich dem Produkt der Konstanten K_2 und K_4 ist. In nützlicherer Form fasst Gleichung 1 diesen Sachverhalt zusammen.

$$\frac{K_1(R8 + GXP \rightarrow R8 : GXP)}{K_4(R8 : M4 + GXP \rightarrow R8 : GXP : M4)} = \frac{K_2(R8 + M4 \rightarrow R8 : M4)}{K_3(R8 : GXP + M4 \rightarrow R8 : GXP : M4)}$$

Gleichung 1: Thermodynamische Voraussetzung für die Interaktionen des System zwischen Rab8 (R8), Nukleotiden (GXP) und MSS4 (M4)

Aus Gleichung 1 kann ein wichtiger Schluss für die katalytische Aktivität von GEFs im Allgemeinen gezogen werden: Wenn ein GEF (hier MSS4) die Affinität der nukleotidfreien GTPase (hier Rab8) für das Nukleotid schwächt (d.h. K_4 ist kleiner als K_1), so muss das Nukleotid die Affinität der nukleotidfreien GTPase für den GEF in gleichem Maße schwächen (d.h. K_3 ist kleiner als K_2). Der grundsätzliche Mechanismus von GEFs basiert auf diesem Effekt und belegt die katalytische Wirkung von GEFs im Nukleotidaustausch an Ras-ähnlichen GTPasen.

3.1.4. Kinetische Charakterisierung der Interaktionen zwischen Rab8, MSS4 und Guaninnukleotiden

Zunächst wurde die Interaktion zwischen nukleotidfreiem Rab8 mit Nukleotiden untersucht. Die Affinität der Nukleotide GDP und GTP für kleine GTPasen ist erfahrungsgemäß relativ hoch; der Wert der Dissoziationskonstanten K_D liegt gewöhnlich im niedrigen nanomolaren oder subnanomolaren Bereich^{90,97,182,183}. Aus diesem Grunde gestaltet sich die Bestimmung der Gleichgewichtskonstanten mit Hilfe von Gleichgewichtskonzentrationen schwierig, da die Konzentration der Reaktionspartner in einem solchen Experiment zur exakten Kalkulation der Dissoziationskonstanten im Bereich des K_D -Wertes, d.h. also im nanomolaren Bereich, liegen sollten. In diesem niedrigen Konzentrationsbereich ist es allerdings problematisch, ein stabiles und ausreichend starkes Signal und Signaländerungen zu erhalten, gleich welche Methoden angewendet werden. Weiterhin negativ wirkt sich in Gleichgewichtsexperimenten mit nukleotidfreien GTPasen der Faktor Zeit aus, da die GTPasen ohne ihr gebundenes GDP oder GTP instabil sind und zu Aggregation neigen^{111,182}, was wiederum einer genauen Bestimmung der Gleichgewichtskonstante entgegenläuft. Daher wurden die Gleichgewichtskonstanten in der folgenden Arbeit indirekt über die Bestimmung der kinetischen Parameter der entsprechenden Reaktionen berechnet: Der Quotient aus Assoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{on} und Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{off} ergibt die Affinitätskonstante K der Reaktion, sein Kehrwert die Dissoziationskonstante K_D .

ERGEBNISSE

Zur Untersuchung der Interaktion von Nukleotiden mit nukleotidfreiem Rab8 wurden fluoreszente Derivate von GDP und GTP verwendet. Der Fluoreszenzmarker Methylanthraniloyl (Mant)^{95,119} ist dabei kovalent an die 2'- oder 3'-Hydroxyposition der Ribosegruppe des Nukleotids gebunden, und in der Vergangenheit ist gezeigt worden, dass die Modifikation in dieser Position keinen, oder nur einen sehr geringen Effekt, auf die Wechselwirkung der Reaktionspartner hat¹⁸⁴.

Die Abhängigkeit der beobachteten pseudo-erster Ordnungsreaktionsgeschwindigkeitskonstanten k_{obs} der Assoziation zwischen MantGDP oder MantGTP mit nukleotidfreiem Rab8 von der Nukleotidkonzentration zeigt ein hyperbolisches Verhalten (siehe Abbildung 11A). Diese Abweichung von der erwarteten Linearität für eine binäre Assoziationsreaktion hin zu einem hyperbolischen Verlauf der Reaktionsgeschwindigkeiten bei Erhöhung der Nukleotidkonzentration ist kennzeichnend für einen Zwei-Schritt-Bindungsmechanismus: Anfänglich wird ein schwacher binärer Rab8:Nukleotid-Komplex gebildet, der in einem schnellen Gleichgewicht zwischen Komplex und den Komponenten freiem Rab8 und ungebundenem MantGDP/MantGTP steht. In einem zweiten langsamen Isomerisierungsschritt wird der binäre Rab8:Nukleotid-Komplex in einen hoch affinen Komplex überführt. Dieser Isomerisierungsschritt stellt wahrscheinlich eine strukturelle Veränderung in Rab8 dar, in der die finale Koordination des Guaninnukleotids und des Magnesiums erreicht werden. Mathematische Kurvenanpassung an einen hyperbolen Kurvenverlauf ergibt Dissoziationskonstanten K'_{D1} für den ersten Schritt der Rab8:Nukleotid-Assoziation von $4\mu\text{M}$ für MantGTP und $9.5\mu\text{M}$ für MantGDP. Die Geschwindigkeit der geschwindigkeitsbestimmenden Isomerisierungsreaktion k'_{+1} zum hochaffinen Komplex beträgt 55s^{-1} für MantGTP und 76s^{-1} für MantGDP. Die effektive Assoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{+1} bei niedriger Nukleotidkonzentration ergibt sich aus dem Produkt der Assoziationskonstanten des ersten Gleichgewichtes K'_1 ($1/K'_{D1}$) und der Isomerisierungsreaktion k'_{+1} zu $14 \cdot 10^6 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ für MantGTP und $8 \cdot 10^6 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ für MantGDP. Die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{-1} wurde im Fluoreszenzspektrometer mittels Messung der intrinsischen MantGDP-Freisetzung aus dem Rab8:MantGDP-Komplex bestimmt und beträgt $k_{-1} = 7.2 \cdot 10^{-4} \text{s}^{-1}$. Basierend auf den erhaltenen Reaktionsgeschwindigkeiten der Assoziation (k_{+1}) und Dissoziation (k_{-1}) wird die Dissoziationskonstante K_{D1} des Gleichgewichtes zwischen Rab8 und MantGDP durch den Quotienten k_{-1}/k_{+1} bestimmt und beträgt $K_{D1} = 0.1 \text{nM}$. Dieser Wert befindet sich an der oberen Grenze der früher bestimmten Affinitäten von Guaninnukleotiden für RabGTPasen^{39,90}. Die intrinsische Nukleotidfreisetzungsrates von Rab8 ist zwölfmal schneller als die von Ypt1 und ca. hundertmal schneller als von Rab7 und Rab5, wird aber kompensiert durch die ca. zehnfache schnellere Assoziation von Rab8 mit Nukleotiden.

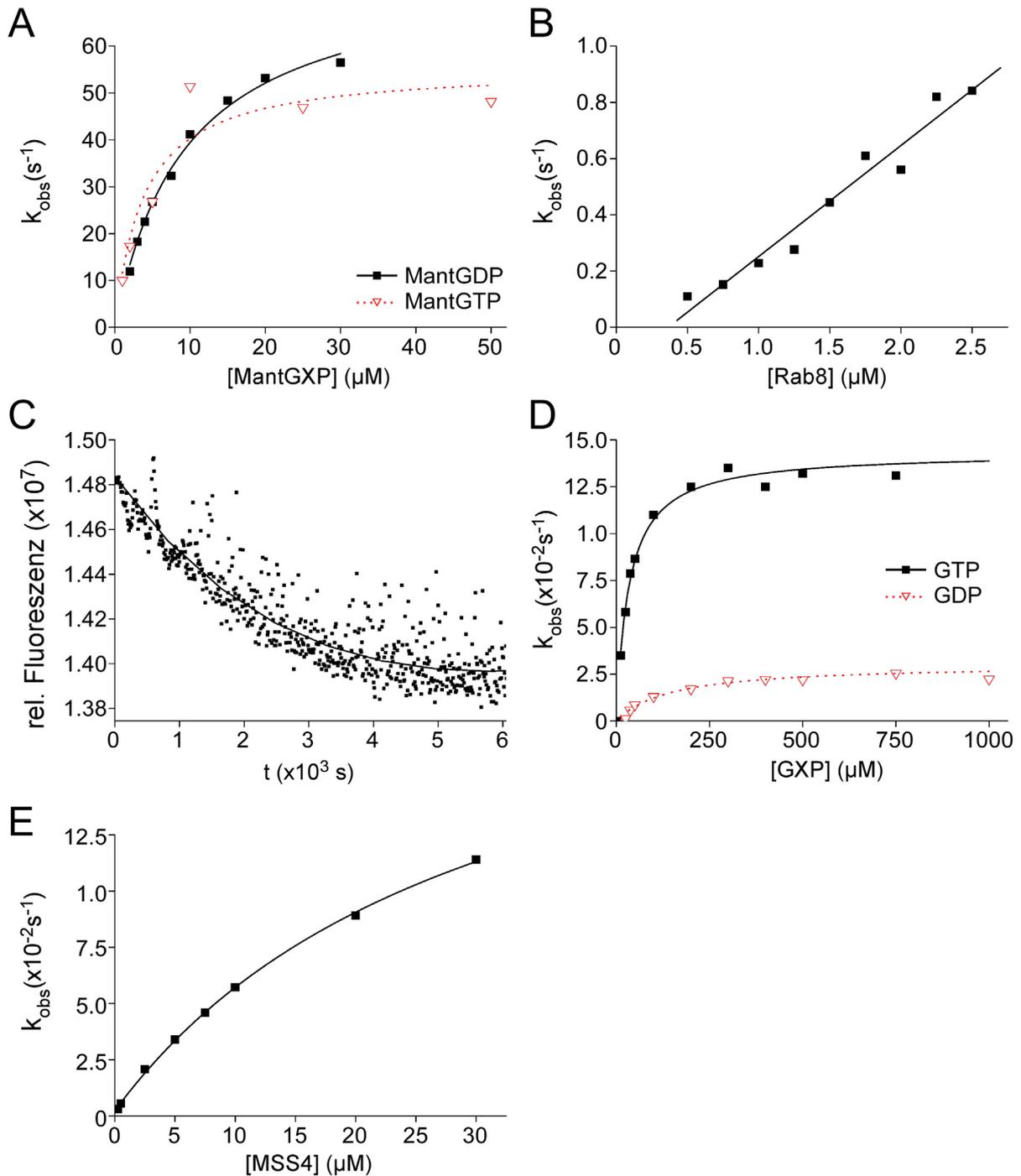


Abbildung 11: Kinetische Untersuchung der Wechselwirkungen zwischen MSS4, Rab8 und Nucleotiden. **(A)** Assoziationskinetik von nukleotidfreiem Rab8 (0.5 μM) mit unterschiedlichen Konzentrationen von MantGDP und MantGTP. Die Bildung des Rab8:MantGXP-Komplexes wurde durch das FRET-Signal von Tryptophan auf die Mant-Gruppe mit einem *Stopped-Flow*-Gerät beobachtet. Die Geschwindigkeitskonstanten pseudo-erster Ordnung wurden durch Kurvenanpassung an eine einfach exponentielle Gleichung erhalten. **(B)** Abhängigkeit der beobachteten Geschwindigkeitskonstanten für die Assoziation von Dansyl-MSS4 (0.25 μM) von der Konzentrationen an nukleotidfreien Rab8. **(C)** Dissoziationskinetik des nukleotidfreien Dansyl-MSS4:Rab8-Komplexes (1 μM) nach Zugabe von einem zehnfachen Überschuss von unmarkiertem MSS4. **(D)** Konzentrationsabhängigkeit der Interaktion des nukleotidfreien MSS4:Rab8-Komplexes (0.4 μM) mit den Nucleotiden GDP und GTP. Die Reaktion wurde durch Änderung der Tryptophanfluoreszenz bei Bindung des Nucleotids beobachtet. **(E)** Hyperbolische Kurvenanpassung des MSS4-katalysierten Nucleotidaustauschs an Rab8:GDP (0.4 μM) in Abhängigkeit von der MSS4-Konzentration. Der Austausch wurde durch Änderung des FRET-Signals (von Tryptophan auf die Mant-Gruppe) in Gegenwart von 200 μM MantGTP verfolgt.

ERGEBNISSE

Zur Bestimmung der kinetischen und thermodynamischen Parameter der Wechselwirkung zwischen MSS4 und Rab8 wurde MSS4 zunächst mit einer fluoreszenten Reportergruppe durch kovalente Bindung an die Thiolfunktion von zugänglichen Cysteinen modifiziert. Das Protein MSS4 besitzt fünf Cysteine, von denen allerdings nur C106 frei zugänglich ist; die vier restlichen Cysteine sind in die Koordination des essentiellen Zinkions einbezogen und im Inneren des Proteins verborgen. Modifikation mit dem Fluoreszenzfarbstoff 5-(((2-Iodoacetyl)Amino)Ethyl)Amino)Naphthalene-1-Sulfonsäure (Dansyl) in Position C106 war spezifisch möglich. Die Assoziationsreaktion zwischen Dansyl-MSS4 und nukleotidfreiem Rab8 ist schnell und musste mit Techniken zur Messung schneller Kinetiken erfasst werden, in diesem Fall mit Hilfe der *Stopped-Flow*-Technik. Die zeitaufgelöste Interaktion zwischen Dansyl-MSS4 und Rab8 wurde anhand der Änderung des Förster-Resonanz-Energietransfers von Tryptophan auf die Dansylgruppe bei Bindung der Komponenten verfolgt. Die Assoziationsgeschwindigkeit k_{obs} der Proteine zeigt eine lineare Abhängigkeit von der Konzentration an nukleotidfreien Rab8 (siehe Abbildung 11B). Die Steigung der Ausgleichgeraden der Auftragung von k_{obs} gegen die Rab8-Konzentration ergibt die Assoziationsgeschwindigkeitskonstante der Reaktion k_{+2} und beträgt $4 \cdot 10^5 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$. Die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{-2} des Dansyl-MSS4:Rab8-Komplexes wurde durch Verdrängung von Dansyl-MSS4 mit einem Überschuss an unmarkiertem MSS4 bestimmt und ergibt einen Wert von $k_{-2} = 2.6 \cdot 10^{-4} \text{s}^{-1}$ (siehe Abbildung 11C). Die Geschwindigkeitskonstanten der Hinreaktion k_{+2} und der Rückreaktion k_{-2} ergeben die Dissoziationskonstante K_{D2} des Gleichgewichtes zwischen Dansyl-MSS4 und nukleotidfreiem Rab8, $K_{D2} = 0.7 \text{nM}$. Demzufolge ist die Affinität zwischen Rab8 und MSS4 relativ hoch und befindet sich in der gleichen Größenordnung wie die Affinität von nukleotidfreiem Rab8 für MantGDP (vgl. oben, $K_{D1} = 0.1 \text{nM}$).

Die Interaktion von GDP und GTP mit dem nukleotidfreien MSS4:Rab8-Komplex wurde mit Hilfe der intrinsischen Fluoreszenzänderung der Tryptophane in den Proteinen bei Bindung der Nukleotide untersucht. Die Abhängigkeit der beobachteten Geschwindigkeitskonstanten zeigte ähnlich der Interaktion von nukleotidfreiem Rab8 mit Mant-Nukleotiden ein hyperbolisches Verhalten bei Variation der Nukleotidkonzentration (siehe Abbildung 11D). Wie bereits für das Gleichgewicht K_{D1} beschrieben wird der hyperbolische Verlauf mit einem Zwei-Schritt-Mechanismus für die Bindung von GDP und GTP an den MSS4Rab8-Komplex interpretiert. Nichtlineare Anpassung der bestimmten Werte an ein hyperbolisches Modell lässt die Berechnung der Dissoziationskonstanten K'_{D4} für den ersten, schwachen Bindungsschritt und für die Geschwindigkeit der Isomerisierungsreaktion k'_{+4} zu. Die Dissoziationskonstante K'_{D4} beträgt $130 \mu\text{M}$ für GDP und $32 \mu\text{M}$ für GTP, die Geschwindigkeitskonstante der Isomerisierung k'_{+4} ist $2.8 \cdot 10^{-2} \text{s}^{-1}$ für GDP und $14 \cdot 10^{-2} \text{s}^{-1}$ für GTP. Das Produkt aus K'_{D4} und k'_{+4} ergibt die effektive Assoziationsgeschwindigkeits-

konstante k_{+4} der Reaktion von GDP/GTP mit MSS4:Rab8 und ist $220\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ für GDP und $440\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ für GTP. Diese Daten lassen eine offensichtliche Bevorzugung der Bindung von GTP gegenüber GDP an den MSS4:Rab8-Komplex erkennen: GDP wird um einen Faktor vier schwächer gebunden als GTP, und die effektive Assoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{+4} ist zwanzigfach höher für GTP. Die maximale Geschwindigkeitskonstante k_{obs} ist bei hoher Nukleotidkonzentration fünffach höher für GTP als für GDP.

Obwohl die Geschwindigkeit der Assoziation zwischen GDP/GTP mit MSS4:Rab8 gering ist, ist sie doch um zwei bis drei Größenordnungen größer als die Geschwindigkeit der spontanen MSS4-Freisetzung k_{-2} aus dem Rab8:MSS4-Komplex ($k_{-2}=2.6 \cdot 10^{-4}\text{s}^{-1}$). Diese Beobachtungen belegen, dass GDP und GTP mit dem MSS4:Rab8-Komplex assoziieren können, ohne dass der binäre Proteinkomplex in MSS4 und nukleotidfreies Rab8 mit seiner intrinsischen Dissoziationsgeschwindigkeit zerfallen müsste. Die Geschwindigkeitskonstanten k'_{+4} und k_{-4} stellen eigentlich die Geschwindigkeit der Isomerisierung im ternären MSS4:Rab8:GXP-Komplex dar. Dennoch, da die Isomerisierungsraten geschwindigkeitsbestimmend sind, werden die Raten der Assoziation mit und Dissoziation vom Komplex als Assoziations- und Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten bezeichnet⁹⁰.

Die Bestimmung der Dissoziationsgeschwindigkeit k_{-4} von Nukleotid aus dem MSS4:Rab8:GXP-Komplex kann nicht analog der Bestimmung von k_{-1} oder k_{-2} durchgeführt werden, da der ternäre Komplex instabil ist und nicht isoliert werden kann. In einem weiteren Experiment wurden daher die Parameter $K_{\text{D}3}$ und k_{-4} bestimmt: Die Verdrängung von GDP aus dem Rab8:GDP-Komplex katalysiert durch MSS4 in Gegenwart von $200\mu\text{M}$ MantGTP wurde mit Hilfe der *Stopped-Flow*-Technik gemessen und die FRET-Signaländerung bei Bindung von MantGTP an den intermediären MSS4:Rab8-Komplex beobachtet. Es wurde angenommen, dass die Verdrängung von GDP aus dem Rab8:GDP-Komplex den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Reaktion darstellt, da die Assoziationsgeschwindigkeit k_{+4} als relativ schnell bestimmt worden ist. Die Geschwindigkeitskonstante der Nukleotidverdrängung an Rab8:GDP durch MSS4 zeigt eine hyperbolische Abhängigkeit von der MSS4-Konzentration (siehe Abbildung 11E), wiederum kennzeichnend für einen Zwei-Schritt-Mechanismus. Im ersten Schritt, repräsentiert durch die Dissoziationskonstante des Gleichgewichtes $K_{\text{D}3}$, bindet MSS4 an Rab8:GDP und formiert den intermediär ternären Protein:Protein:Nukleotid-Komplex. In einem zweiten, geschwindigkeitsbestimmenden Schritt folgt die Freisetzung von GDP (k_{-4}), worauf nachfolgend MantGTP an den nukleotidfreien MSS4:Rab8-Komplex bindet und die zu beobachtende Fluoreszenzänderung bewirkt. Die maximal stimulierbare Nukleotidfreisetzungsgeschwindigkeitskonstante k_{-4} wurde durch nichtlineare Anpassung an den hyperbolischen Kurvenverlauf der bestimmten Geschwindigkeiten k_{obs} berechnet und beträgt $k_{-4}=0.23\text{s}^{-1}$. Die Dissoziationskonstante $K_{\text{D}3}$ lässt sich analog zu der Bestimmung von $K'_{\text{D}1}$ und $K'_{\text{D}4}$ berechnen und beträgt ca. $27\mu\text{M}$.

ERGEBNISSE

Beide Werte können allerdings nur als Schätzwerte angesehen werden, da es aus technischen Gründen nicht möglich war, das Experiment unter sättigenden Konzentrationen an MSS4 durchzuführen und daher die k_{obs} -Werte nicht in eine Sättigung laufen: Die maximal erreichbare Konzentration von MSS4 lag bei ca. $100\mu\text{M}$, was bedeutet, dass die Konzentration im *Stopped-Flow*-Experiment $50\mu\text{M}$ nicht überschreiten konnte. Die erhaltenen kinetischen und thermodynamischen Parameter der MSS4:Rab8:Nukleotid-Interaktionen lassen sich übersichtlich in dem folgenden Schema zusammenfassen (siehe Abbildung 12).

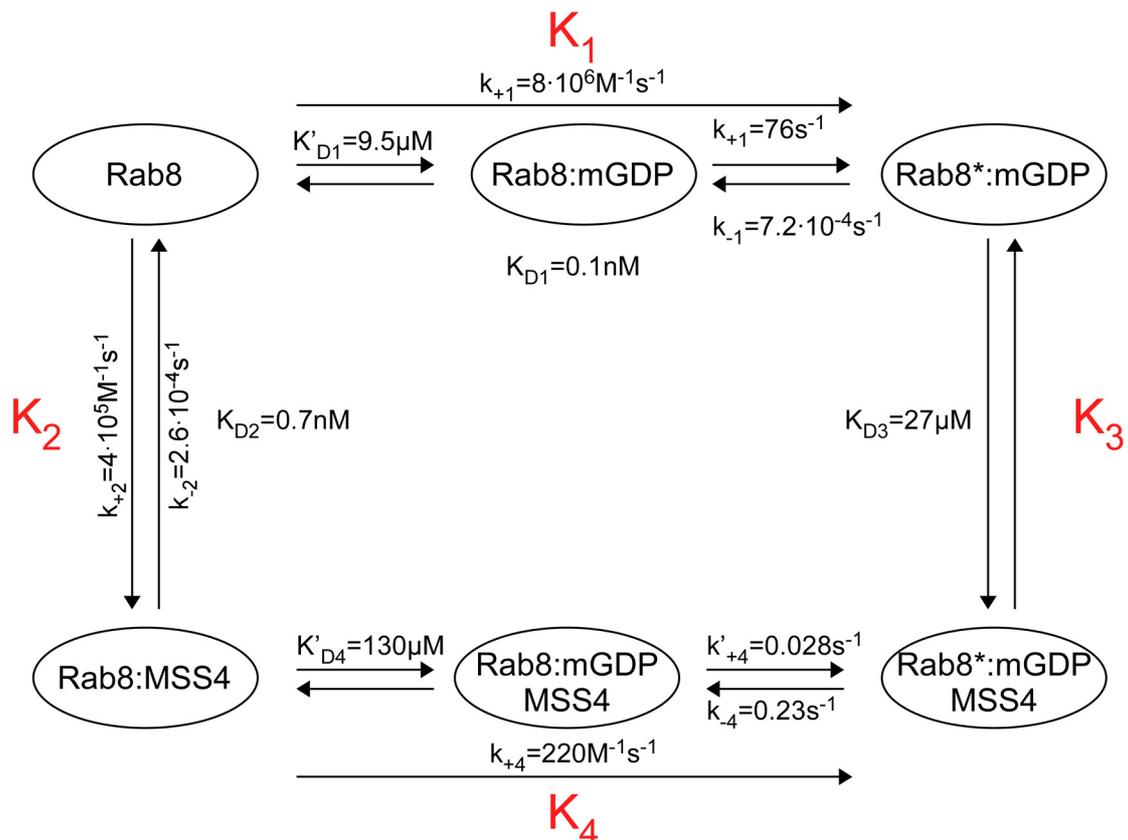


Abbildung 12: Schematische Zusammenfassung der Interaktionen zwischen Rab8, MSS4 und unterschiedlichen Nukleotiden mit den kinetischen Parametern. K_D bezeichnet die Dissoziationskonstante des entsprechenden Gleichgewichtes, wogegen K_D' sich auf schwache Vorgleichgewichte bezieht. Assoziations- und Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten werden durch k_{+x} bzw. k_{-x} angezeigt. Im Fall der Assoziationsreaktion von nukleotidfreiem Rab8 mit Nukleotiden und nukleotidfreiem MSS4:Rab8-Komplex mit Nukleotiden wurde eine effektive Assoziationsgeschwindigkeitskonstante bei niedriger Nukleotidkonzentration ($c(\text{GXP}) \gg K_D$) durch Multiplikation von $1/K_D'$ mit maximalen Rate der Assoziation k'_{+x} berechnet. Der Stern (*) markiert einen anderen Zustand des Rab8-Moleküls, vermutlich eine unterschiedliche Konformation.

Die hier ermittelte Austauschgeschwindigkeit von MSS4 an Rab8:GDP ist zwei Größenordnungen geringer als die von schnellen GEFs, wie z.B. RCC1, welcher GDP aus dem Ran:GDP-Komplex mit einer Geschwindigkeit von 20s^{-1} verdrängt⁹². Die Austauschgeschwindigkeit von MSS4 an Rab3A:GDP hingegen ist mit 0.0077s^{-1} um einen Faktor dreißig geringer als für Rab8⁷⁰. Trotz dieser recht geringen Werte für die GEF-Aktivität stimuliert die Präsenz von MSS4 den Nukleotidaustausch dreihundertfach an Rab8 und ca. hundertfach an Rab3A gegenüber der spontanen Nukleotidfreisetzung dieser Rab-Proteine

$(k_{-1}(\text{Rab8:GDP})=7.2 \cdot 10^{-4} \text{s}^{-1}, k_{-1}(\text{Rab3A:GDP})=7.5 \cdot 10^{-5} \text{s}^{-1})^{70}$ und hat somit einen ausgeprägten Effekt auf die Geschwindigkeit des Nukleotidaustauschs.

Bei näherer Betrachtung der bestimmten Werte in diesem System aus Nukleotid, der RabGTPase Rab und dem GEF MSS4 fällt auf, dass die Dissoziationskonstante, die die Interaktion zwischen Rab8:GDP und MSS4 reflektiert, unter Gleichgewichtsbedingungen als geringer anzunehmen ist: Der ternäre Komplex kann in zwei unterschiedlichen Zuständen, Rab8*:GDP:MSS4 und Rab8:GDP:MSS4, vorliegen, wie aus dem Schema in Abbildung 12 ersichtlich ist. Die Verteilung zwischen diesen Zuständen wird durch k_{-4} und k'_{-4} bestimmt und lässt die Berechnung einer Gleichgewichtskonstante zwischen den beiden Zuständen zu. Der Wert des Quotienten k_{-4}/k'_{-4} beträgt 8.2, womit das Gleichgewicht bei Bindung von MSS4 an Rab8:GDP in Richtung des Rab8:GDP:MSS4 Zustandes (und nicht des Rab8*:GDP:MSS4-Zustandes) gezogen wird. Die effektive Dissoziationskonstante $K_{D3\text{eff}}$ für die Bindung von MSS4 an Rab8:GDP ist daher höher als der berechnete Wert und kann zu ca. $3 \mu\text{M}$ abgeschätzt werden ($K_{D3\text{eff}}=K_{D3}/(1+8.2)=3 \mu\text{M}$). Diese relativ hohe Affinität zwischen den beiden Proteinen selbst in der Gegenwart von GDP ist vermutlich die Grundlage für die Beobachtung, dass MSS4 und Rab8 sogar in der Gegenwart von GDP einen recht stabilen Komplex bilden, der durch Zugabe von GDP in Größenausschlusschromatographie nicht aufgelöst wird.

Der signifikanteste Unterschied zwischen den Kinetiken von MSS4:Rab8 und dem Rab:GEF-System Ypt51:Vps9 liegt in den Geschwindigkeitskonstanten k'_{+4} und k_{-4} ⁽⁹⁰⁾. Im Gegensatz zu der hier beschriebenen Situation, in der GDP mit einer maximalen Rate von 0.23s^{-1} freigesetzt und mit einer Rate von 0.14s^{-1} (k'_{+4} für GTP) wieder gebunden werden kann, katalysiert Vps9 die Freisetzung von GDP aus Ypt51:GDP mit maximal 0.012s^{-1} , ersetzt aber gegen GTP mit 20s^{-1} , d.h. effektiv sofort nach GDP-Freisetzung. Obwohl die biologische Signifikanz dieses Effektes für den MSS4:Rab8-Komplex (langsame Bindung von GTP und damit einhergehend langsame Dissoziation des binären Proteinkomplexes) unklar ist, lässt sich vermuten, dass MSS4 wahrscheinlich einen unterschiedlichen Mechanismus für den Nukleotidaustausch anwendet verglichen zu den klassischen GEFs, die eine schnelle Rückbindung von GTP erlauben.

Die Vermutung eines unterschiedlichen Katalysemechanismus von MSS4 im Vergleich zu den klassischen GEFs konnte anhand der Kristallstruktur des nukleotidfreien MSS4:Rab8-Komplexes bestätigt werden. Dessen molekulare Struktur wurde im Laufe der vorliegenden Arbeit bestimmt und die strukturellen Details der MSS4:Rab8-Interaktion, die Analyse der MSS4-katalysierten Nukleotidfreisetzung und der Interpretation der kinetischen Resultate sollen im Folgenden an der Struktur des MSS4:Rab8-Komplexes untersucht und diskutiert werden.

3.1.5. Die Struktur des MSS4:Rab8-Komplexes

Die relative hohe Ausbeute aus der Reinigung durch Kombination von Affinitäts- und Gelpermeationschromatographie erlaubte die Kristallisation des MSS4:Rab8-Komplexes. Die Kristalle des Komplexes streuten bis zu einer maximalen Auflösung von 2.0Å, und die Struktur des Komplexes wurde durch molekularen Ersatz mit MSS4 als Suchmodell ermittelt. Der Komplex hat eine sichelförmige Struktur (siehe Abbildung 13), in der die beiden Moleküle nur eine geringe Bindungsfläche ausbilden. Die allgemeine Struktur von MSS4 ist sehr ähnlich zu den in der Vergangenheit bestimmten Strukturen von MSS4^{155,157}. Das MSS4-Molekül besteht aus drei β -Faltblättern, aufgebaut aus dem β -Strängen β A bis β L, sowie zwei 3_{10} Helices (3_{10} A und 3_{10} B). Ein einzelnes zweiwertiges Zinkion wird durch die Thiolgruppen von vier Cysteinen koordiniert, die sich in den CxxC-Motiven der β B- β C und β I- β J Schleifen befinden. Die Superposition der unkomplexierten MSS4 Kristallstruktur mit MSS4 des MSS4:Rab8-Komplexes ergibt eine Standardabweichung von 0.47Å für die C_{α} -Atome. Der größte Teil dieser Unterschiede entspringt den flexiblen β E- β F- und β H- β I-Schleifen, wobei erstere hauptsächlich ungeordnet und letztere in die Bindung von Rab8-Bindung involviert ist^{155,157}.

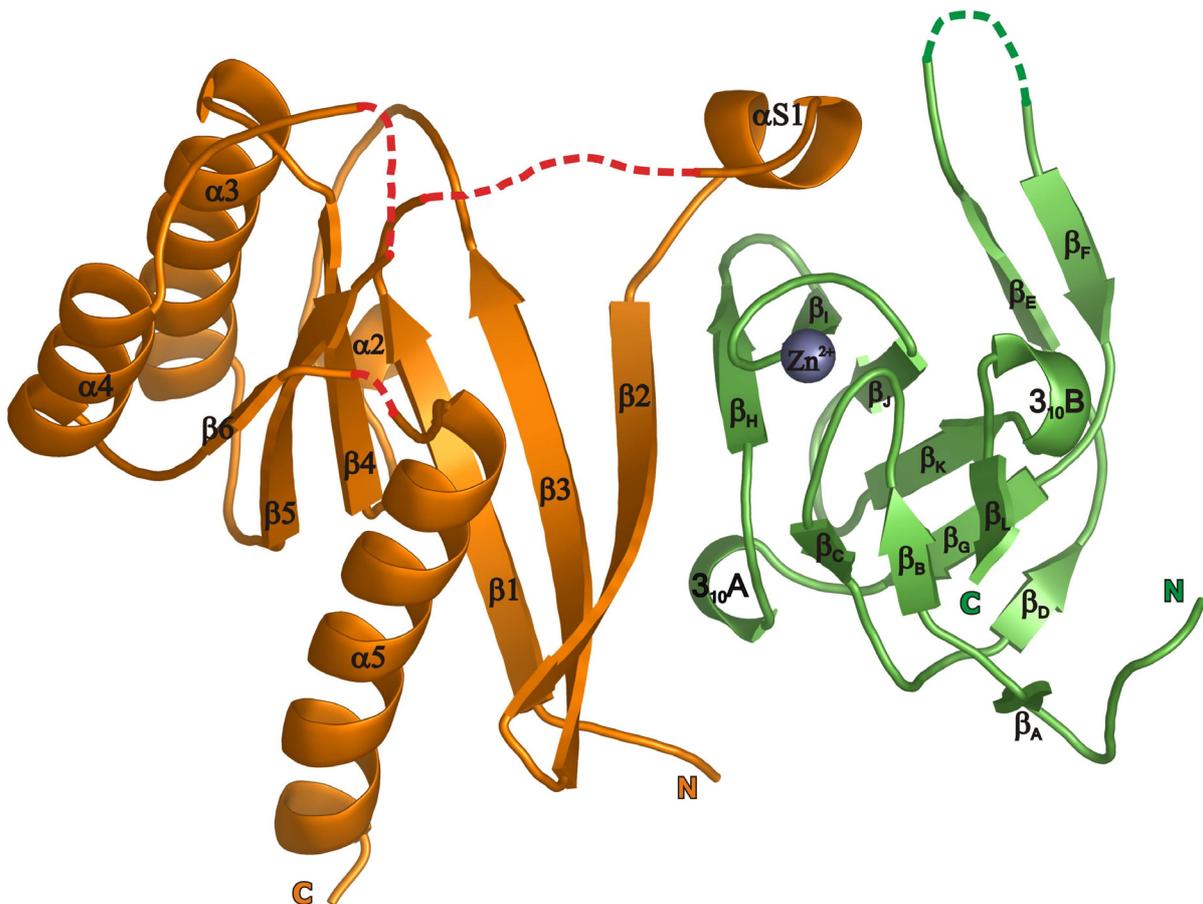


Abbildung 13: Die Gesamtstruktur des MSS4:Rab8-Komplexes. Schleifendarstellung der MSS4:Rab8-Komplexstruktur als Bändermodell. Rab8 ist in orange gezeigt, MSS4 in grün und das MSS4-gebundene Zinkion als graue Kugel. Die gestrichelten Linien repräsentieren fehlende Regionen der Komplexstruktur, die aufgrund hoher Flexibilität keine Elektronendichte aufweisen. N- und C-Terminus von Rab8 und MSS4, sowie die Sekundärstrukturelemente sind gekennzeichnet.

Obwohl die allgemeine Struktur von Rab8 im Komplex mit MSS4 typische Merkmale der Faltung kleiner GTPasen zeigt (fünf α -Helices, sechs β -Stränge, fünf konservierte Schleifen G1-G5), offenbart sie signifikante Unterschiede im Vergleich zu anderen bekannten Strukturen von Rab-Proteinen. Die Standardabweichung in den C_{α} -Atomen zwischen Rab8 und Strukturen anderer exozytischer Rabs, wie Sec4:GDP³⁷, Sec4:GppNHp³⁷ und Rab3A:GppNHp⁵⁷ beträgt ca. 2.9Å, bzw. 1.9Å sofern die Nukleotidbindungstasche von Rab8 aus der Analyse der Standardabweichung ausgeschlossen wird. Die wichtigsten strukturellen Abweichungen konzentrieren sich auf fünf Regionen, die in die Bindung von Nukleotid und Magnesium einbezogen und als die am höchsten konservierten Regionen Ras-ähnlicher GTPasen bekannt sind^{16,185}. In der Struktur zwischen Rab8 und MSS4 (siehe Abbildung 13) fehlen die G1-, G4- und G5-Bereiche in Rab8 ebenso wie die gesamte α 1-Helix, welche den *P-loop* (G1) und *SwitchII* (G2) verbindet. Diese fehlende Elektronendichte in dem beschriebenen Bereich weist auf hohe strukturelle Flexibilität der Regionen hin. Daraus resultierend ist die Nukleotidbindungstasche von Rab8 zum größten Teil ungeordnet und die Aminosäuren, die normalerweise verantwortlich für die Bindung von Nukleotid sind, sind weit aus ihrer ursprünglichen Position verdrängt. Die nukleotidfreie Rab8-Struktur im Komplex mit MSS4 weist lokale Proteinfaltung auf. Die vergleichsweise schwache Ordnung der Struktur spiegelt sich in ihrem B-Faktor wider, der im Mittel anderthalb mal höher ist als der von MSS4.

3.1.6. Die Bindungsregion des MSS4:Rab8-Komplexes

Die interagierende Region zwischen MSS4 und Rab8 ist klein: Die Bindung von MSS4 an Rab8 führt zu einer Verringerung der lösungsmittelzugänglichen Oberfläche von 1057Å² an MSS4 (gesamte Kontaktfläche 2196Å²). Die Bindungsoberfläche wird durch die 3₁₀A-Helix, β H, β I und die zinkkoordinierende Schleife β I- β J von MSS4, sowie den N-Terminus, die β 2- β 3-Schleife und einen Teil von *SwitchI* von Rab8 gebildet. Die meisten der in exozytischen aber nicht in endozytischen Rabs konservierten Aminosäuren (siehe Abbildung 3), die in der Vergangenheit als bedeutend für die MSS4-Bindung identifiziert wurden^{147,155,156}, befinden sich in der N-terminalen Hälfte von Rab8. Einige der Aminosäurereste bilden multiple hydrophobe und polare intermolekulare Kontakte aus.

MSS4 und Rab8 formieren mittels eines Wasserstoffbrückennetzwerks des Rückgrats der Peptidkette von β 2 von Rab8 (G42_{Rab}-I47_{Rab}) und β H von MSS4 (V80_{MSS4}-T83_{MSS4}) ein gemeinsames, intermolekulares β -Faltblatt (siehe Abbildung 14). Die Seitenketten der Aminosäuren sind an der Ausbildung eines ausgedehnten Netzwerkes polarer Interaktionen beteiligt, das die gesamte Bindungsregion durchzieht. Die dicht angeordneten Seitenketten F82_{MSS4} und V80_{MSS4} des MSS4 β H-Stranges und I47_{Rab8} und F45_{Rab8} des Rab8 β 2-Stranges ziehen an M74_{MSS4} und F75_{MSS4} der MSS4 3₁₀A-Helix von MSS4, welche gleichzeitig mit den

ERGEBNISSE

N-terminalen Resten $Y5_{\text{Rab8}}$ und $L8_{\text{Rab8}}$ interagieren. (siehe Abbildung 14A). Aminosäure $I47_{\text{Rab8}}$ befindet sich im Kern einer hydrophoben Gruppe auf der konvexen Seite des gemeinsamen β -Faltblatts von MSS4 und Rab8 und ist als kritische Aminosäure für die Bildung des Komplexes bekannt (siehe Abbildung 3)⁷⁰. Ein Netzwerk aus Wasserstoffbrückenbindungen umschließt diesen hydrophoben Kern, beginnend am Anfang der Rab8 $\beta2$ - $\beta3$ -Schleife (Aminosäuren $T49_{\text{Rab8}}$, $R56_{\text{Rab8}}$ und $K58_{\text{Rab8}}$) und wechselwirkend mit der N-terminalen Region des β H-Stranges von MSS4 (Aminosäuren $F77_{\text{MSS4}}$, $E78_{\text{MSS4}}$ und $N19_{\text{MSS4}}$). Diese Anhäufung von Wasserstoffbrückenbindungen geht von der konkaven Seite des gemeinsamen β -Faltblatts aus und umfasst die Aminosäuren $R48_{\text{Rab8}}$ und $K46_{\text{Rab8}}$ der $\beta2$ - $\beta3$ -Schleife von Rab8 und $D96_{\text{MSS4}}$, $A95_{\text{MSS4}}$ und $E98_{\text{MSS4}}$ der zinkkoordinierenden β J- β I-Schleife von MSS4. Dieses Netzwerk aus Wasserstoffbrückenbindungen endet am N-terminalen Ende des $\beta2$ -Stranges von Rab8 (Aminosäuren $D44_{\text{Rab8}}$ und $I43_{\text{Rab8}}$), wo es mit der β H- β J-Schleife von MSS4 interagiert ($K90_{\text{MSS4}}$ und $K84_{\text{MSS4}}$) (siehe Abbildung 14B).

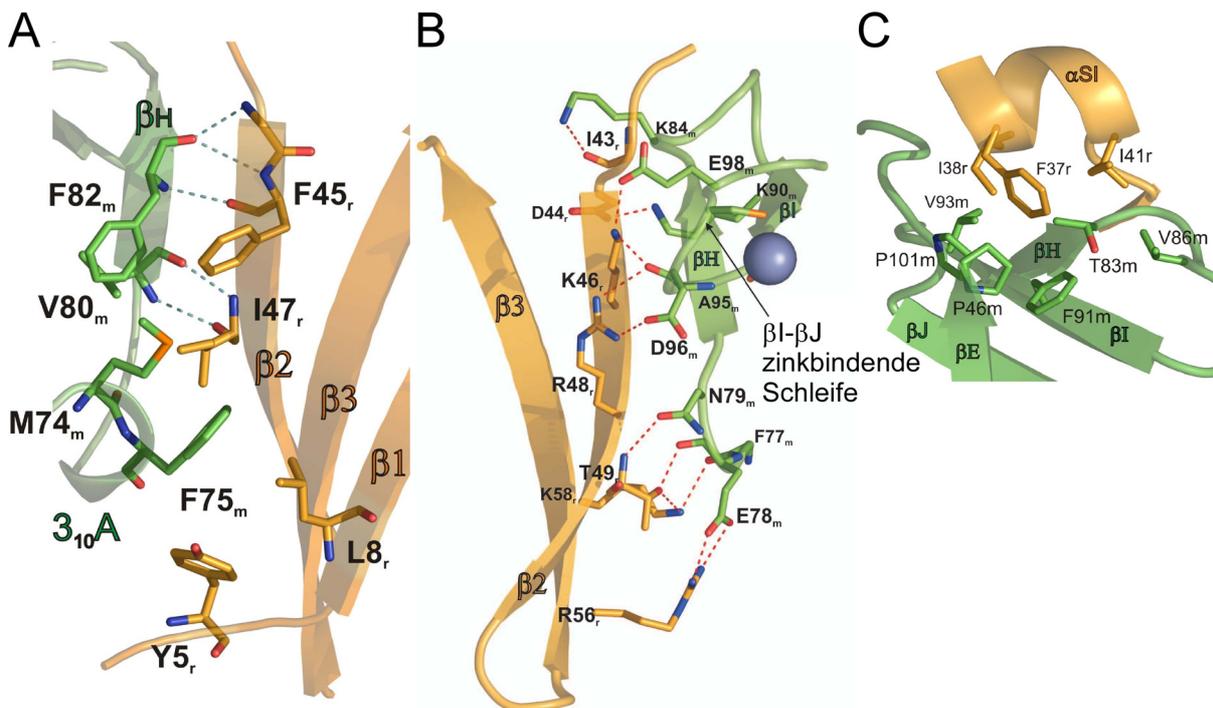


Abbildung 14: Bindungsregion des MSS4:Rab8-Komplexes. Kontaktierende Sekundärstrukturelemente sind entsprechend beschriftet. Interagierende Aminosäurereste sind als Stabmodell dargestellt und namentlich gekennzeichnet (Reste von Rab8 sind mit dem Suffix „r“ markiert, solche von MSS4 mit „m“; graue Kugel: Zinkion in MSS4; gestrichelte Linien: Wasserstoffbrückenbindungen). **(A)** Intermolekulares β -Faltblatt zwischen MSS4 und Rab8. Gezeigt ist die Gruppe hydrophober Aminosäurereste auf der konvexen Seite des gemeinsamen β -Faltblatts unter Einbeziehung der MSS4 3_{10} A-Helix. **(B)** Netzwerk der Wasserstoffbrückenbindungen in der Bindungsregion des MSS4:Rab8-Komplexes. **(C)** Darstellung der hydrophoben Oberfläche der α S1-Helix von Rab8, die durch die hydrophobe Oberfläche der konkaven Seite von MSS4 vor dem Lösungsmittel geschützt wird.

Die Rab8 *Switch1* α -Helix (α S1) hat eine wohl definierte hydrophobe Oberfläche (siehe Abbildung 14C), die aus den Aminosäuren $F37_{\text{Rab8}}$, $I38_{\text{Rab8}}$ und $I41_{\text{Rab8}}$ gebildet wird. MSS4 offenbart eine konservierte hydrophobe, konkave Oberfläche aus $V86_{\text{MSS4}}$, $P101_{\text{MSS4}}$, $P46_{\text{MSS4}}$, $F91_{\text{MSS4}}$, $T83_{\text{MSS4}}$ und $V93_{\text{MSS4}}$, und schirmt damit die hydrophobe Seite der α -Helix

α SI vom polaren umgebenden Medium ab. Der Aminosäurerest F37_{Rab8} aus Rab8 ist evolutionär konserviert und für die Bindung von MSS4 an exozytotische Rabs essentiell⁷⁰. Er scheint außerdem einen bedeutenden Beitrag für die Bildung der zweiten intramolekularen Anbannung hydrophober Reste in Rab8 zu liefern. In der unkomplexierten MSS4 Kristallstruktur ist die hydrophobe, konkave Oberfläche von MSS4 teilweise durch die flexible β E- β F-Schleife bedeckt und von der umgebenden Flüssigkeit abgeschirmt (siehe Abbildung 6B). Diese β E- β F-Schleife stellt möglicherweise eine Art Deckel dar, der die Rab-Bindungsstelle von MSS4 vom hydrophilen Umfeld in Abwesenheit eines Bindungspartners schützt.

3.1.7. Struktureller Vergleich des MSS4:Rab8-Komplexes mit anderen GEF:GTPase-Komplexen

Obwohl die molekularen Strukturen von Nukleotidaustauschfaktoren untereinander keine strukturellen Ähnlichkeiten aufweisen, zeigen die Komplexstrukturen aus GTPasen und ihrem entsprechenden GEF auffällige Gemeinsamkeiten (Ras:Sos¹⁰², Rac1:Tiam¹⁰⁷, Cdc42:Intersectin¹⁰⁴, RhoA:DbpA¹⁰⁴, Cdc42:SopE,¹³² Arf1:Sec7¹²⁹, Ef-Tu:Ef-Ts¹⁰⁰, eEF1B:eEF1A¹⁸⁶, Ran:RCC1¹⁰⁶). Nukleotidaustausch findet unter zwei anscheinend widersprüchlichen Erfordernissen statt. Zum einen muss die Interaktion zwischen GEF und GTPase stark genug sein, um das fest gebundene Nukleotid verdrängen zu können. Zum anderen muss der GEF:GTPase-Komplex durch nachfolgende Bindung von Nukleotid trennbar sein, um den freien GEF und die nukleotidgebundene GTPase zu generieren. Die bekannten Strukturen von GEF:GTPase-Komplexen zeigen, dass GEFs und GTPasen die Anforderungen durch Bildung fester Komplexe erfüllen, deren Bindungsstelle sich nahe der Nukleotidbindungstasche befindet und die phosphat- und magnesiumbindenden Regionen beeinflusst. Diese Bindung wird durch direkte Wechselwirkungen zwischen GEF und GTPase oder durch vermittelte Interaktionen unterstützt, welche *SwitchI* und *SwitchII* umfassen. Dadurch werden die nukleotidbindenden Regionen Positionen gebracht, die nicht alle gleichzeitig mit Nukleotiden wechselwirken können. Die Gesamtkonformation der Phosphat/Magnesiumbindungstelle wird im nukleotidfreien GEF:GTPase-Komplex zwar gestört, die einzelnen Elemente sind aber verglichen mit der nukleotidgebundenen GTPase nicht drastisch unterschiedlich. Speziell der *P-loop* und das magnesiumkoordinierende Aspartat des DxxGQE-Motivs (G3-Motiv) sind in ihrer Konformation dem Zustand der GTPase im Komplex mit GDP oder GTP nahezu identisch (siehe Abschnitt 1.4.2.3). In Ran:RCC1, Rac1:Tiam, Cdc42:SopE und Cdc42:Intersectin bindet der *P-loop* der GTPase ein Oxyanion, das das β -Phosphat des Nukleotids imitiert. Dies lässt vermuten, dass der *P-loop* im nukleotidfreien GEF:GTPase-Komplex in einer Konformation existiert, die sich leicht der erneuten Bindung eines Nukleotids anpassen kann.

ERGEBNISSE

Wie in anderen GEF:GTPase-Komplexen bindet MSS4 Rab8 mit hoher Affinität, aber *SwitchII* von Rab8, normalerweise eine Region, die multiple Kontakte mit entsprechenden GEFs eingeht, ist nicht Teil der MSS4:Rab8-Bindungsregion. Im Gegensatz zu anderen GEF:GTPase-Strukturen ist die nukleotidbindende Region von Rab8 im MSS4:Rab8-Komplex signifikant ungeordnet. Die Nukleotidfreisetzung durch MSS4 wird bewirkt durch eine Zerstörung und Entfaltung der Nukleotidbindungstasche von Rab8: Wie bereits in Abschnitt 3.1.5 beschrieben, sind Teile des *P-loop* und von *SwitchII* sowie die gesamte Helix $\alpha 1$ aus ihrer normalen Position verdrängt, und diese Regionen sind, da keine Elektronendichte in der Kristallstruktur erkennbar ist, flexibel. Dies bedeutet umgekehrt, dass das Rab8-Molekül für eine erneute Bindung von Guanosinnukleotid signifikante strukturelle Reorganisationen eingehen muss, einschließlich lokaler Faltung zur Wiederherstellung der Nukleotidbindungstasche. Dieser Faltungsprozess ist möglicherweise ein Grund für die dramatisch geringe Assoziationsgeschwindigkeit von Nukleotid mit dem MSS4:Rab8-Komplex und die damit verbundene geringe Nukleotidaustauschgeschwindigkeit. Die Verringerung der Nukleotidassoziationsgeschwindigkeit um 3-4 Größenordnungen im Vergleich mit der Assoziationsgeschwindigkeit zwischen nukleotidfreiem Rab8 mit MSS4 steht in krassem Gegensatz zu den Reaktionen anderer Nukleotidaustauschfaktoren. Die Nukleotidassoziationsrate für den Ran:RCC1-Komplex ist entweder ungefähr die gleiche wie für Ran mit GDP, oder wesentlich schneller für Ran mit GTP⁹². Im Fall von Ras:Cdc25 haben GEFs keinen Einfluss auf die Nukleotidassoziationsgeschwindigkeit⁹³.

Bemerkenswerterweise besitzen sowohl Ef-Ts als auch MSS4 eine 3_{10} -Helix mit ähnlicher Sequenz, die im Falle von Ef-Ts direkt in den Nukleotidaustausch an Ef-Tu beteiligt ist. Im Ef-Tu:Ef-Ts-Komplex inseriert der GEF Ef-Ts diese 3_{10} -Helix (Aminosäuren ₈₀DFV₈₂) in die Magnesiumbindungsstelle von Ef-Tu¹⁰⁰. Die 3_{10} A-Helix in MSS4 (₇₃DMF₇₅), bestehend aus einem invarianten Aspartat gefolgt von zwei hydrophoben Aminosäuren, ist als eine Hauptdeterminante für Rab-Bindung und Nukleotidfreisetzung durch MSS4 identifiziert worden¹⁵⁵. Aufgrund der Ähnlichkeit dieser Helix 3_{10} A in Struktur und Sequenz zu der 3_{10} -Helix in Ef-Ts wurde für den MSS4-katalysierten Nukleotidaustausch ein ähnlicher Mechanismus vermutet wie für die Katalyse von Ef-Ts an Ef-Tu:Nukleotid¹⁵⁵. Jedoch spielt die 3_{10} A-Helix im MSS4:Rab8-Komplex eine andere mechanistische Rolle als die 3_{10} -Helix von Ef-Ts im Ef-Tu:Ef-Ts-Komplex. Die 3_{10} A-Helix von MSS4 bindet an Rab8 von der konvexen Seite der $\beta 2$ - $\beta 3$ -Schleife (das Nukleotid bindet von der gegenüberliegenden Seite) und kann daher die Magnesiumbindung nicht direkt stören. Die hydrophoben Aminosäurereste M74_{MSS4} und F75_{MSS4} befinden sich im Zentrum des hydrophoben intermolekularen Kerns des MSS4:Rab8-Komplexes und sind vermutlich essentiell für die Formierung dieses Kerns (siehe Abbildung 14A). Dagegen interagiert das invariante D73_{MSS4}

nicht direkt mit Rab8, sondern seine Seitenkette bildet eine Wasserstoffbrückenbindung zu Hauptkettenstickstoffen der 3_{10} A-Helix aus und stabilisiert damit ihre Konformation.

Ein weiterer Punkt fällt bei Vergleich der MSS4:Rab8-Struktur mit anderen GEFs auf: Wie in Tabelle 2 dargelegt binden alle bisher bekannten GEFs in jedem Fall die *SwitchII*-Region der entsprechenden GTPase. Der Austauschfaktor MSS4 hingegen kontaktiert *SwitchII* nicht, sondern geht stattdessen spezifische Bindungen zu *SwitchI* (sieben Kontakte) und anderen Aminosäuren außerhalb der G-Motive (zwölf Kontakte) ein. Weder G1 noch G3-G5 werden von MSS4 gebunden. Diese Beobachtung steht in starkem Gegensatz zu allen anderen charakterisierten Nukleotidaustauschfaktoren. Die Restrukturierung von *SwitchII* über direkte und spezifische Kontakte mit dem GEF hat grundlegende Bedeutung für den Nukleotidaustausch (vergleiche Abschnitt 1.4.2.3 und Abbildung 5), da dieser Bereich essentielle Aminosäuren für die Magnesiumkoordination (z.B. Asp57 in Ras, Rac, Cdc42) und Magnesiumverdrängung (z.B. Ala59 in Cdc42) zur Verfügung stellt. Die Konformation von *SwitchII* hat daher nicht nur einen starken Effekt auf die Nukleotidfreisetzung, sondern auch auf die erneute Bindung von Nukleotid, weil das wichtige magnesiumkoordinierende Aspartat aus G3 (DxxGQE-Motiv) vermittelt durch den GEF in einer optimalen Position für die Bindung von Magnesium im nukleotidfreien Zustand gehalten wird. Da MSS4 nur *SwitchI* und nicht *SwitchII* bindet und weiterhin Reste von Rab8 nicht in einer Weise konformationell arrangiert, dass *SwitchII* über Aminosäuren durch MSS4 vermittelt stabilisiert werden würde, ist die Konformation von *SwitchII* von MSS4 unabhängig.

Zusätzlich zu den oben beschriebenen Besonderheiten des MSS4:Rab8-Komplexes im Vergleich zu anderen strukturell charakterisierten GTPase:GEF-Komplexen fällt ein weiteres Merkmal der MSS4:Rab8-Interaktion auf: Die Kontaktfläche zwischen MSS4 und Rab8 ist vergleichsweise klein (siehe Tabelle 3). Die Gesamtkontaktfläche, die in Folge Komplexbildung dem Lösungsmittel entzogen wird, beträgt für den MSS4:Rab8-Komplex lediglich ca. 2200 \AA^2 , wogegen die Bindungsfläche für die anderen GTPase:GEF-Komplexe im Bereich zwischen ca. 2700 \AA^2 (Cdc42:Intersectin) bis ca. 3300 \AA^2 liegen. Trotz dieser kleinen Bindungsfläche liegt die Affinität von MSS4 für nukleotidfreies Rab8 im niedrigen nanomolaren Bereich ($K_{D2}=0.7\text{nM}$). MSS4 scheint diese recht hohe Affinitätskonstante durch optimale und effiziente Ausbildung von spezifischen polaren und unpolaren Kontakten zu Rab8 zu erreichen, indem es nahezu jede Aminosäure von Rab8 im Kontaktbereich zur Bindung ausnutzt. Im Abschnitt F33_{Rab8}-T49_{Rab8} von Rab8 werden von diesen 17 Aminosäuren lediglich vier nicht zur Bindung an MSS4 herangezogen; dabei befinden sich von diesen vier Aminosäuren drei auf der MSS4-abgewandten Seite der Helix α S1 von Rab8. Demzufolge lässt sich festhalten, dass in dem erwähnten Abschnitt jede der in der Bindungsfläche befindlichen Aminosäure von Rab8 in die Komplexbildung

ERGEBNISSE

involviert ist und dadurch einen hohen Beitrag zur Bindungsstärke des Komplexes trotz der vergleichsweise geringen Interaktionsfläche liefert.

Tabelle 3: Vergleich der Bindungsoberflächen verschiedener GTPase:GEF-Komplexe. Die Bindungsfläche ist ausgedrückt als Lösungsmittel-zugängliche Oberfläche, die durch Komplexbildung verborgen wird. Aufgeführt sind die sowohl die Kontaktfläche von Seite der GTPase, als auch von der Seite des GEFs, sowie die Summe aus beiden als totale Kontaktfläche, die durch Komplexbildung dem Lösungsmittel entzogen wird. Die PDB-Zugangsnummer (PDB-ID) ist angegeben. In Klammern befindet sich die zur Berechnung der Kontaktfläche verwendete Kette der jeweiligen Proteinkristallstruktur. Die Werte wurden der Internetresource PDBsum entnommen¹²⁷.

GTPase:GEF-Komplex	GTPase- Oberfläche (Å ²)	GEF- Oberfläche (Å ²)	Totale Kontaktfläche (Å ²)	PDB-ID
Rab8(D):MSS4(A)	1139	1057	2196	2FU5
Cdc42(A):Intersectin(A)	1397	1310	2707	1KI1
Arf(A):Sec7(E)	1497	1222	2719	1R8Q
Ran(A):RCC1(B)	1471	1373	2844	1I2M
Cdc42(A):SopE(B)	1500	1400	2900	1GZS
Rac(A):Tiam(B)	1494	1627	3121	1FOE
Ras(R):Sos(S)	1655	1508	3163	1BKD
RhoA(B):DbpA(A)	1731	1532	3263	1LB1
Cdc42(B):DbpA(A)	1720	1554	3274	1KZ7
Ef-Tu(A):Ef-Ts(B)	1775	1921	3696	1EFU

Die Bindungsoberfläche zwischen MSS4 und Rab8 ist klein, dennoch bewirkt die Komplexbildung eine starke Konformationsänderung und partielle Entfaltung des Rab8-Moleküls. Es wäre interessant zu wissen, wie groß die durch Bindung von MSS4 neu geschaffene lösungsmittelzugängliche Oberfläche von Rab8 durch die partielle Entfaltung ist, um diese dann mit anderen GTPase:GEF-Systemen vergleichen zu können. So bewirken z.B. Sos und RCC1 starke strukturelle Änderungen in den GTPasen Ras bzw. Ran, wodurch neue lösungsmittelzugängliche Strukturen entstehen. Eine solche Berechnung fällt allerdings schwer, da Rab8 einige Bereiche aufweist (G18-D31, C123-N126, S151-K153), die durch die Entfaltung flexibel geworden sind und daher keine Elektronendichte in der Röntgenkristallstruktur besitzen. Die Betrachtung der MSS4:Rab8-Struktur unter Beachtung der nicht sichtbaren, aber vorhandenen ausgedehnten flexiblen Abschnitte in Rab8 lässt allerdings den Schluss zu, dass die neu entstandene lösungsmittelzugängliche Oberfläche im MSS4:Rab8-Komplex in Relation zu anderen GTPase:GEF-Komplexen sehr groß ist, insbesondere im Bereich der Nukleotidbindungstasche (vergleiche Abbildung 15). Somit bewirkt die Bindung von MSS4 die Freisetzung von Aminosäureresten von Rab8 und die

Zugänglichkeit gegenüber dem umgebenden Wasser, trotz einer nur sehr geringen Interaktionsfläche zwischen den beiden Proteinen.

All diese Beobachtungen weisen darauf hin, dass die MSS4 vermittelte Nukleotidfreisetzung an RabGTPasen einen unterschiedlichen Mechanismus anwendet als andere charakterisierte GEFs und führt zu der berechtigten Vermutung, diese strukturellen Unterschiede könnten Ursache für die ungewöhnlichen biochemischen Eigenschaften von MSS4 sein. Im folgenden Abschnitt soll daher auf den vermuteten Mechanismus der MSS4-katalysierten Nukleotidfreisetzung eingegangen werden.

3.1.8. Molekularer Mechanismus der MSS4:Rab8-Komplexbildung und Nukleotidfreisetzung

MSS4 bindet bevorzugt an nukleotidfreie RabGTPasen, es muss aber auch an die GDP-Form der GTPasen binden können, um die Nukleotidfreisetzung einzuleiten. Könnte MSS4 nur mit der nukleotidfreien Form von Rabs interagieren, wäre die Assoziationsgeschwindigkeit zwischen MSS4 und Rabs durch die intrinsische Nukleotidfreisetzungsrates limitiert. Da die MSS4-katalysierte Nukleotidfreisetzung um ca. einen Faktor von 300 schneller ist als die spontane Dissoziation von Nukleotid aus dem Rab8:GDP Komplex, bindet MSS4 folglich auch an die GDP-Form von Rab8. Zurzeit ist die molekulare Struktur eines Rab8:GXP-Komplexes nicht bekannt; daher werden zur Verdeutlichung der strukturellen Reorganisation von Rab8 bei Bindung von MSS4 die Strukturen eines anderen MSS4/DSS4-Substrats, Sec4:GDP und Sec4:GTP, mit herangezogen. Die nukleotidfreie Struktur von Rab8 und Sec4:GDP werden nachfolgend verglichen.

Aus der Superposition der Rab8-Struktur des MSS4:Rab8-Komplexes und der Struktur von Sec4:GDP wird ersichtlich, dass die β 2- β 3-Schleife und der N-terminale Bereich des β 1-Stranges keine signifikante strukturelle Konformationsänderung eingehen (siehe Abbildung 15). Die Aminosäurereste von Sec4 korrespondierend zu Rab8 Y5_{Rab8}, L8_{Rab8}, I47_{Rab8} und F45_{Rab8} sind wasserzugänglich und befinden sich in der gleichen Position wie in Rab8. Die Aminosäuren K58_{Rab8}, R56_{Rab8} und T49_{Rab8} sind ebenfalls in exponierten Positionen, und Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen wie im MSS4:Rab8-Komplex wären daher möglich. Diese Aminosäuren sind in endozytotischen, aber nicht in endozytotischen Rabs mit Ausnahme von R56_{Rab8} konserviert (siehe Abbildung 3), welches in manchen Rabs durch Threonin ersetzt ist. Der beschriebene Abschnitt befindet sich auf der konvexen Seite des GTPase β -Faltblatts und repräsentiert wahrscheinlich die primäre MSS4 Erkennungsregion, komplementär zur 3_{10} A-Helix und den carboxyterminal benachbarten Aminosäuren von MSS4. Die Bindung des primären Kontaktbereichs von MSS4 und Rab8 führt die Hauptkettenatome des Polypeptides des β 2-Stranges von Rab8:Nukleotid und des

ERGEBNISSE

β H-Stranges von MSS4 reißverschlussartig zusammen, wodurch sich das intermolekulare β -Faltblatt zwischen den beiden Molekülen ausbildet. Aus dieser Zusammenführung der beiden Proteine resultiert ein sterischer und elektrostatischer Konflikt zwischen dem negativ geladenen Ende der α 1-Helix ($_{42}\text{E}/\text{DD}_{43}$ -Motiv in Sec4), das in exozytotischen Rabs konserviert ist, und dem negativ geladenen Asp96_{MSS4} der zinkkoordinierenden Schleife aus MSS4. Der Konflikt der elektrostatischen und sterischen Abstoßung kann durch Verdrängung der Rab8 α 1-Helix aufgelöst werden (siehe Abbildung 15). Diese Verdrängung wird durch die Freisetzung der Aminosäurereste von R48_{Rab8} und K46_{Rab8} aus intramolekularen Interaktionen begleitet und bewirkt Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen mit D96_{MSS4}, wodurch die Rückkehr von R48_{Rab8} und K46_{Rab8} in die ursprüngliche Position unterbunden wird. Die Verdrängung und der Verlust der Struktur von α 1 zerstört die gesamte Nukleotidbindungstasche und bewirkt die Freisetzung des Nukleotids aus dem Komplex.

Mit Hilfe unterschiedlicher Mutationen konnte die Bedeutung des Aspartats D96_{MSS4} für die Affinität von MSS4 für exozytotische RabGTPasen und die Nukleotidaustauschkatalyse durch MSS4 gezeigt werden. So stört die D96H_{MSS4}-Mutante sowohl Rab-Bindung als auch katalytische Aktivität von MSS4^{147,149,157,187}. Die Mutation D96A_{MSS4} verringert die katalytische Effizienz von MSS4 für Rab3A um einen Faktor 33 durch Verminderung der Affinität zwischen den beiden Proteinen um 90%. Diese Beobachtungen deuten auf die zentrale Funktion von D96_{MSS4} in der Nukleotidaustauschkatalyse von MSS4 hin: Die Verringerung der Affinität von MSS4 für Rab8 bei Mutation von D96_{MSS4} zu Histidin oder Alanin lässt vermuten, dass die Verdrängung von Helix α 1 die Voraussetzung für eine effektive Bindung, und damit für die effiziente Katalyse ist. Die Zerstörung der Nukleotidbindungstasche durch Verdrängung der α 1-Helix in Rab8 mit gleichzeitiger Dislokalisierung von *SwitchI* und dem *P-loop* fängt die GTPase in einem partiell entfaltenen Zustand.

Die Verdrängung von α 1 führt zu einer Entspannung des N-terminalen Bereiches von *SwitchI*, wogegen die reißverschlussartige Zusammenführung der β -Stränge β 2_{Rab8} und β H_{MSS4} in einer Verdrehung von I43_{Rab8} und D44_{Rab8} resultiert (siehe Abbildung 14B). Dieses ist möglicherweise das initiierte Ereignis für die Bildung von α -Helix α SI in Rab8. Die hydrophobe Oberfläche der neu geformten Helix α SI (F37_{Rab8}, I38_{Rab8} und I41_{Rab8}) kann von der hydrophoben Tasche in MSS4, die in der Kristallstruktur durch β E- β F abgeschirmt wird, aufgenommen werden. Interessanterweise wurde F37_{Rab8} als eine Hauptdeterminante für die Assoziation von exozytotischen Rabs mit MSS4 identifiziert (siehe Abbildung 3), wogegen I41_{Rab8} in sowohl exozytotischen als auch in endozytotischen Rabs konserviert ist⁷⁰. Diese Tatsache lässt vermuten, dass nur exozytotische RabGTPasen durch ihre spezifische Aminosäurezusammensetzung in *SwitchI* die Bildung einer α -Helix α SI mit ausgeprägter hydrophober Oberfläche erlauben.

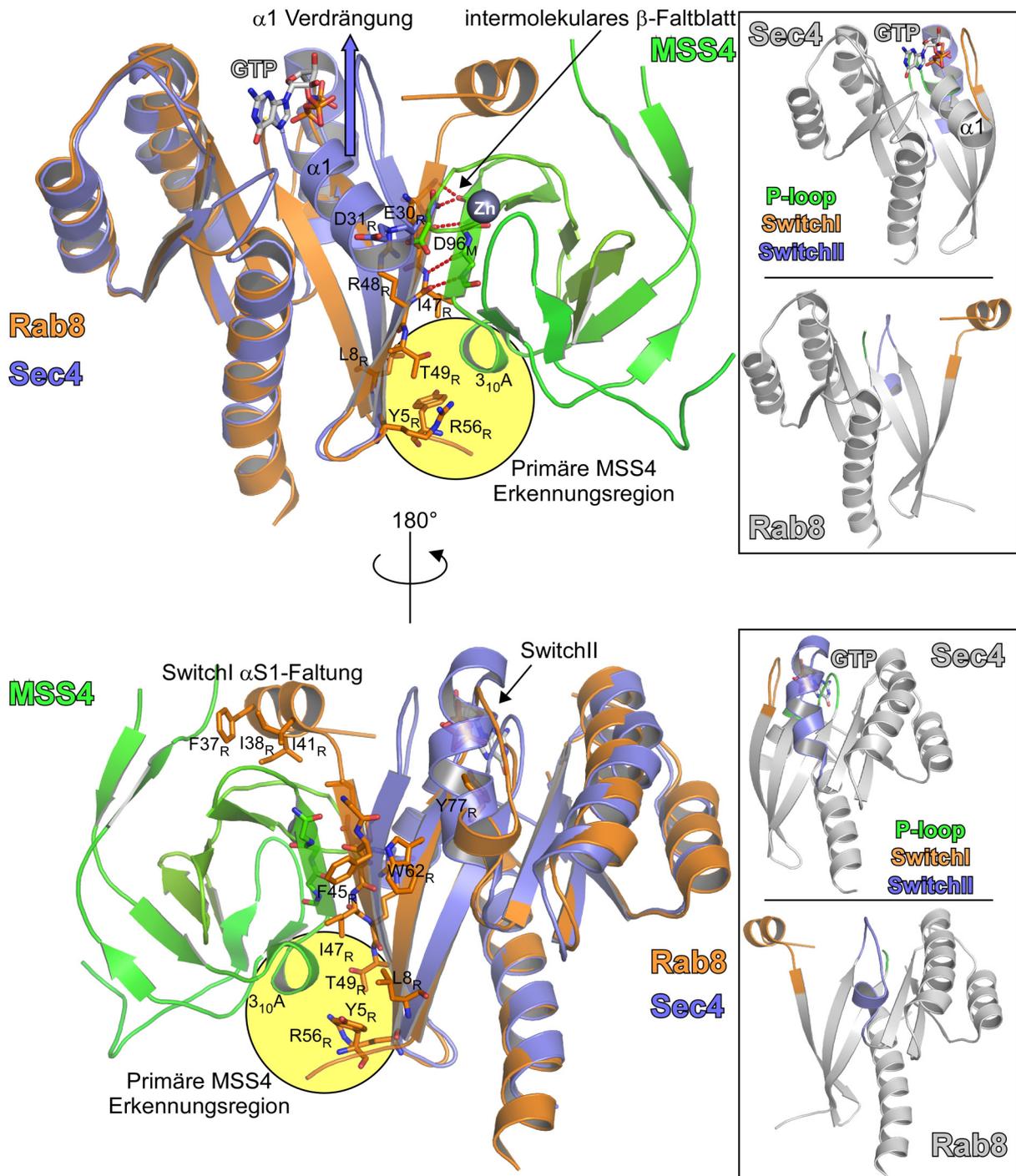


Abbildung 15: Strukturelle Reorganisation der Rab-Struktur bei Bindung von MSS4. Die Kristallstruktur aus MSS4 (grün) und Rab8 (orange) ist mit der GTP-Form von Sec4 (blau) überlagert (Stabmodell: GTP-Analog GppNHp). Die Abbildung des Komplexes ist in zwei um 180° rotierten Ansichten gegeben. Die Darstellung verdeutlicht die strukturellen Änderungen von Rab-Proteinen bei Bindung an MSS4; Sec4 und Rab8 sind separat verkleinert mit der Angabe nukleotidbindender Regionen aufgeführt. Deutlich erkennbar ist die Verlagerung und veränderte Faltung von *SwitchI*, die Verdrängung von Helix $\alpha 1$ von Rab8 bzw. Sec4, sowie die Formierung des intermolekularen β -Faltblatts (Rot gestrichelte Linien: H-Bindungen zwischen $\beta 2_{Rab8}$ und βH_{MSS4}). Die primäre Erkennungsregion zwischen MSS4 und Rab8 ist gelb unterlegt hervorgehoben ($T 5_{Rab8}$, $L 8_{Rab8}$, $F 45_{Rab8}$, $I 47_{Rab8}$ und $K 58_{Rab8}$, sowie Helix 3_{10A} von MSS4). Ausgewählte Aminosäuren mit starker Bedeutung für die Komplexbildung, Nukleotidfreisetzung oder spezielle Konformation der GTPase sind als Stabmodell dargestellt. Die Aminosäure $D 96_{MSS4}$ des Zinkfingers aus MSS4 behindert sterisch und elektrostatisch die Aminosäuren $E 30_{Rab8}$ ($D 44_{Sec4}$) und $D 31_{Rab8}$ ($D 45_{Sec4}$) und verdrängt darüber Helix $\alpha 1$ von Rab8. Die Position des Zinkfingers ist durch die Position des Zinkions (graue Kugel) in der Abbildung markiert. (Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind die Schleifen, welche die β -Stränge und α -Helices in den Strukturen verbinden, stark geglättet worden und geben nur ungefähr den Verlauf der Polypeptidkette wieder)

ERGEBNISSE

Die Mutation des zu F37_{Rab8} homologen Aminosäurerestes in Rab3A (F51_{Rab3A}) zu Alanin bewirkt eine fünfzigfach verringerte MSS4-Katalyseeffizienz und eine fünfzehnfach verminderte Affinität zwischen den Proteinen⁷⁰. Die zu I38_{Rab8} homologe Position ist in endozytotischen Rab-Proteinen im Gegensatz zu den exozytotischen Pendanten keine hydrophobe, sondern meist eine geladene (Ytp7, Rab5b, Rab7, Rab11) oder polare Aminosäure (Rab4) (siehe Abbildung 3).

Die Präsenz eines polaren oder geladenen Aminosäurerestes in der Position von I38_{Rab8} hätte wahrscheinlich einen negativen Effekt auf die Affinität von MSS4 für exozytotische Rabs, da die hydrophobe Wechselwirkung mit V93_{MSS4} verloren gehen würde und die polare energetisch ungünstig in eine hydrophobe Tasche gerichtet wäre. Die geschilderten Beobachtungen bestätigen die oben geäußerte Vermutung, die Aminosäurezusammensetzung von *SwitchI* exozytotischer Rabs sei eine Hauptdeterminante der Rab:MSS4-Komplexbildung.

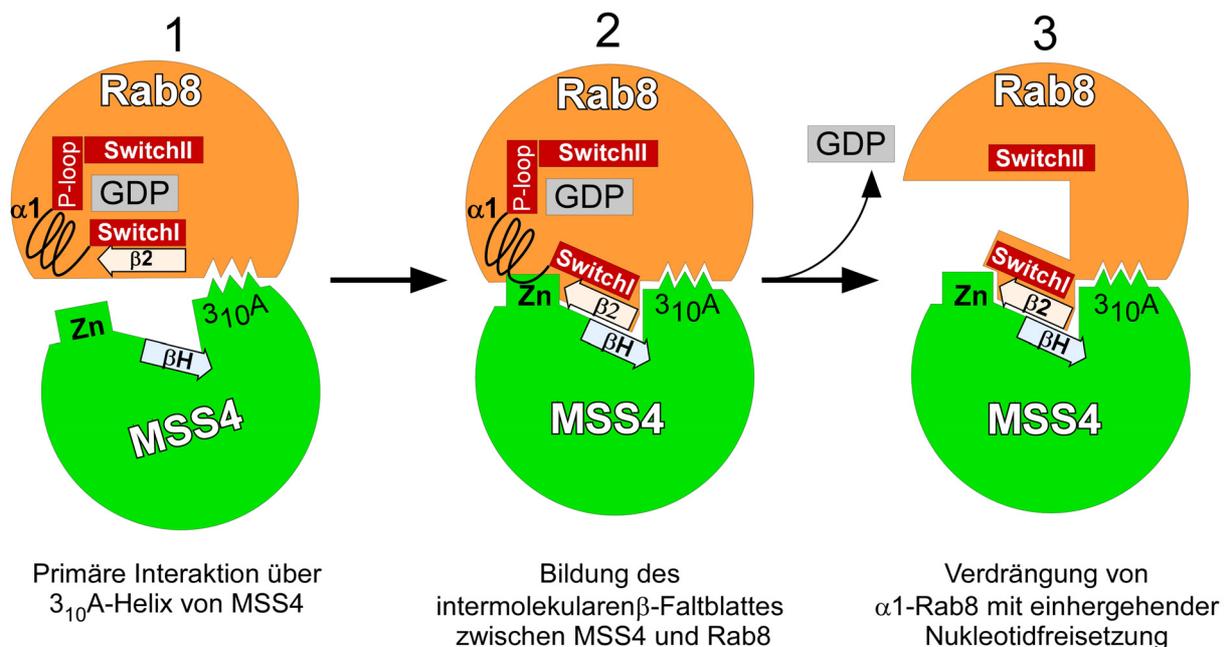


Abbildung 16: Schematisches Modell der MSS4-katalysierten Nucleotidfreisetzung an Rab8. Im ersten Schritt **(1)** bindet assoziiert Rab8:GDP (orange) locker mit den Aminosäuren der Helix 3₁₀A von MSS4 (grün). Beteiligt daran sind die Aminosäuren T5_{Rab8}, L8_{Rab8}, F45_{Rab8}, I47_{Rab8} und K58_{Rab8} von Rab8, sowie M74_{MSS4}, F75_{MSS4} und I76_{MSS4} von MSS4. Die Komplexbildung wird gefolgt **(2)** von der Ausbildung des gemeinsamen intermolekularen β-Faltblatts zwischen Rab8 und MSS4 durch die β-Stränge β2_{Rab8} und βH_{MSS4}. Da *SwitchI* direkt mit dem β-Strang β2_{Rab8} verbunden ist, bewirkt die Bewegung von β2_{Rab8} in Richtung der MSS4-Oberfläche eine ebensolche begleitende Verschiebung von *SwitchI*. Aufgrund der Bewegungen von β2_{Rab8} und *SwitchI* bilden Rab8 und MSS4 einen festen Komplex, in dem sich die Zinkfingerregion von MSS4 und die Helix α1 von Rab8 sterisch behindern. Daher wird die Helix α1 von Rab8 durch die sterische und elektrostatische Abstoßung des Zinkfingers von MSS4 verdrängt **(3)**. Die Verdrängung von α1 bewirkt eine Entfaltung der Helix und des dazu N-terminal befindlichen *P-loop*. Die Bindung von MSS4 an Rab8 resultiert in der Kristallstruktur, welche eine ungeordnete und entfaltete Nucleotidbindungstasche in Rab8 aufweist. Diese Entfaltung führt dazu, dass das Nucleotid (hier GDP) nicht mehr gebunden und das essentielle Magnesiumion nicht mehr koordiniert werden können, so dass das Nucleotid freigesetzt wird und der nucleotidfreie, binäre Proteinkomplex entsteht. Die ungeordnete Nucleotidbindungstasche in Rab8 erschwert die erneute Bindung von GDP oder GTP, sofern Helix α1 und der *P-loop* nicht wieder eine native Faltung oder Faltung mit Ähnlichkeit zum nativen Zustand eingenommen haben.

Ebenso bemerkenswert ist die Reorganisation der konservierten hydrophoben Triade (F45_{Rab8}, W62_{Rab8} und Y78_{Rab8}) von Rab8 in Folge Komplexbildung mit MSS4, die ein bereits bekannter Faktor für die Stabilisierung der Konformation der *Switch*-Regionen ist¹⁸⁸. Der Indolring von W62_{Rab8} der Triade dreht sich im MSS4:Rab8-Komplex und führt damit möglicherweise zu der beobachteten Destabilisierung von *SwitchIII*.

Die strukturellen Änderungen durch die Komplexbildung von MSS4:Rab8 können wie folgt in einem Modell zusammengefasst werden (siehe Abbildung 16): MSS4 unterstützt die simultane reißverschlussartige Zusammenführung von β -Strängen aus MSS4 und Rab8 zur Bildung des intermolekularen β -Faltblatts, die Verdrängung der α 1-Helix aus Rab8, Faltung und Seitwärtsbewegung von *SwitchI* und Destabilisierung von *SwitchIII*. Dadurch wird die Nukleotidbindungsstasche vollständig zerstört.

3.1.9. Aminosäuremutationen in MSS4 und Rab8 geben Hinweise auf den Nukleotidaustauschmechanismus

Der Mechanismus der MSS4-katalysierten Nukleotidfreisetzung ist in der Vergangenheit Gegenstand biochemischer und kinetischer Untersuchungen gewesen. Um verschiedene Modelle zu überprüfen, wurden MSS4 und DSS4 sowie einzelne Aminosäuren unterschiedlicher Rabs mit molekularbiologischen Methoden mutiert und die Auswirkung der Mutation auf die Katalysefähigkeit von MSS4/DSS4, bzw. die Fähigkeit der Rabs, MSS4-katalysierten Nukleotidaustausch einzugehen, untersucht. Aus diesen Analysen konnten Aminosäuren in MSS4 und der RabGTPase identifiziert werden, die für eine effiziente Katalyse von Bedeutung sind und deren Mutation, in den meisten Fällen zu Alanin, einen starken Einfluss auf die Affinität der Proteine zueinander oder die Katalysegeschwindigkeit oder beides hatten. In Ermangelung der bekannten Struktur des MSS4/DSS4:Rab-Komplexes wurde versucht, Aminosäuren mit Bedeutung für den Nukleotidaustausch anhand von Sequenzvergleichen von MSS4/DSS4 und unterschiedlichen RabGTPasen zu identifizieren (vergleiche Abbildung 17 und Tabelle 4). Die hier vorliegende Struktur des GEF:Rab-Komplexes aus MSS4 und Rab8 kann die Auswirkungen der Mutationen und die daraus gezogenen Schlussfolgerungen begründen und bestätigen.

Die Mutationen F75A und D96A in MSS4 zeigen einen stark verringerten Effekt auf die Nukleotidaustauschfähigkeit von MSS4 an Rab3A (siehe Tabelle 4). Die Mutation F75A in MSS4 bewirkt einen Abbruch der hydrophoben Interaktion mit Tyrosin5, Leucin8 und Isoleucin47 und schwächt darüber die Affinität für Rab3A, einhergehend mit sinkender katalytischer Effizienz, die wie beschrieben definiert über den Quotienten k_4/K_3 ist. Dagegen bewirkt die Mutation von D96 zu Alanin eine Verringerung der elektrostatischen und sterischen Abstoßung zu den Aminosäuren Aspartat44 und Aspartat45 in Rab3A. Damit wird vermutlich die effiziente Verdrängung der Helix α 1 aus Rab3A beeinträchtigt und die

ERGEBNISSE

katalytische Wirksamkeit von MSS4 herabgesetzt. Allerdings kann der Grund für die verringerte Aktivität der D96A_{MSS4}-Mutante statt in der verringerten Fähigkeit zur Verdrängung der α 1-Helix_{Rab3A} auch in einer gesunkenen Affinität von MSS4 zu Rab3A liegen, da durch Mutation von Aspartat96 zu Alanin die polare Interaktion mit Arginin48_{Rab3A} unterbrochen wird; dies würde die katalytische Effizienz k_4/K_3 ebenso senken.

Die in der Vergangenheit auf kinetische Effekte im Nukleotidaustausch untersuchten Mutationen von MSS4 und Rab3A/Rab8 sind in Abbildung 17 und Tabelle 4 zusammengefasst. Die Auswirkungen der Mutationen auf die Stimulation des Nukleotidaustauschs lassen sich anhand der MSS4:Rab8-Struktur zum größten Teil erklären: Die Mutanten S31A_{Rab3A}, V52A_{Rab3A} und S53A_{Rab3A} zeigen nahezu unveränderte katalytische Effizienz, da die Rab8-homologen Aminosäurereste in die Ausbildung der MSS4:Rab8-Bindungsfläche nicht (S31_{Rab3A}) oder nur wenig (V52_{Rab3A}, S53_{Rab3A}) einbezogen sind. Moderate negative Effekte weisen dagegen die Mutanten K60A_{Rab3A}, S28A_{MSS4} und N79A_{MSS4} auf. Der zu K60_{Rab3A} homologe Rest in Rab8 und N79_{MSS4} bildet Wasserstoffbrückenbindungen im MSS4:Rab8-Komplex aus, sodass eine Mutation zu Alanin die verringerte Affinität und damit die verringerte katalytische Effizienz erklären kann. Die Mutation S28A_{MSS4} hat dagegen keinen direkten Einfluss auf die Bindungsfläche zwischen MSS4 und Rab8. Stattdessen koordiniert S28_{MSS4} intramolekular die Position von N79_{MSS4}; letztere dagegen ist in den Nukleotidaustausch über Bildung der Komplexbindungsfläche beteiligt, weswegen S28_{MSS4} eine eher indirekte Funktion in der Katalyse zukommt. Weiterhin konnte für die S28A_{MSS4}-Mutante gezeigt werden, dass das mutierte Protein sich wesentlich instabiler im Vergleich zu den anderen MSS4-Mutanten und der Wildtypform verhält, und über diese Instabilität ebenfalls eine Beeinträchtigung der Nukleotidaustauschs möglich ist. Einen moderaten positiven Effekt auf den Nukleotidaustausch hat die Mutante D45A_{Rab3A} bzw. D31A_{Rab8}, da die elektrostatische Abstoßung zu D96_{MSS4} vermindert wird, einhergehend mit höherer Affinität zwischen Rab8:GDP/GTP und MSS4 und damit erhöhter katalytischer Effizienz.

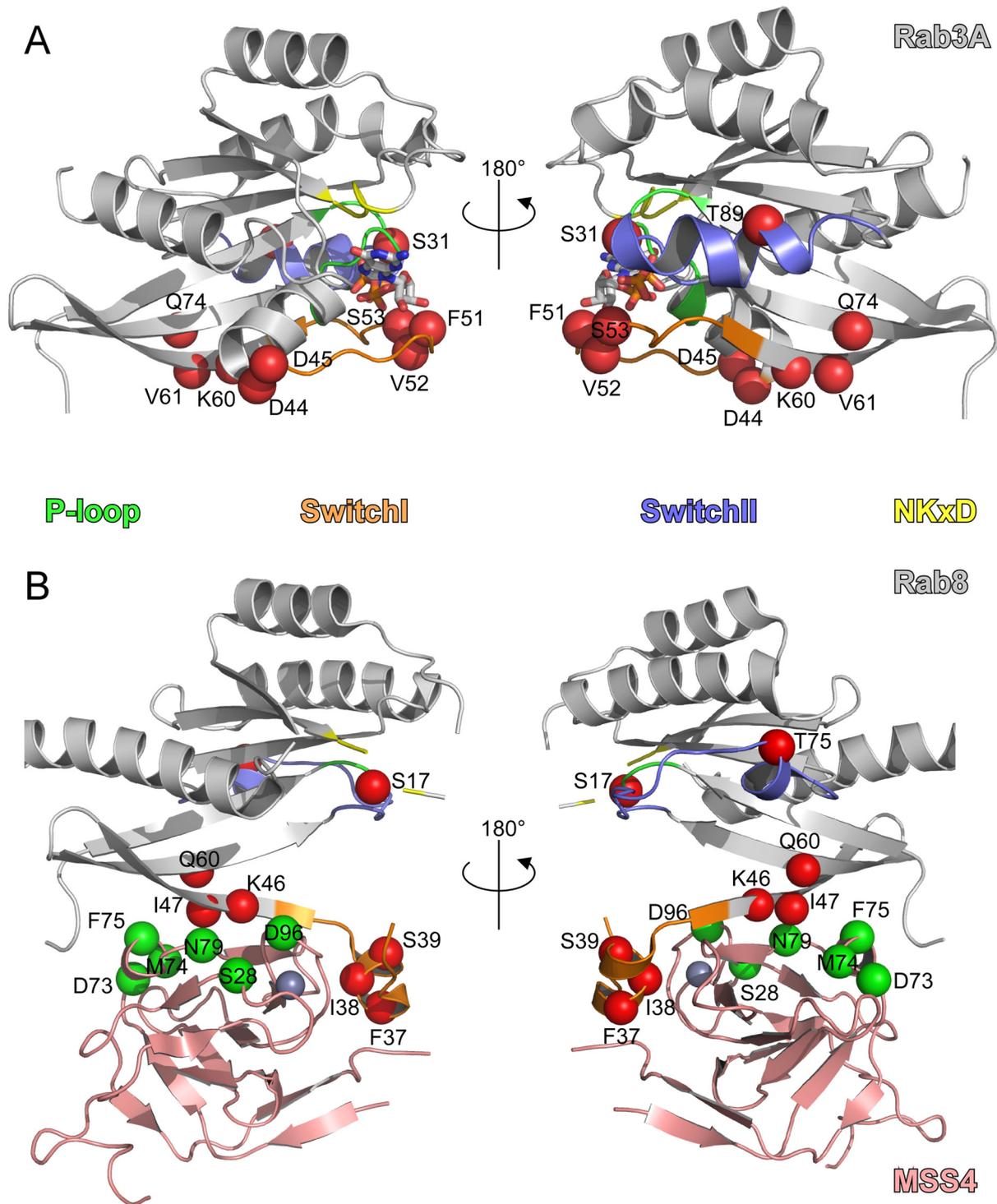


Abbildung 17: Zusammenfassende Übersicht untersuchter Mutationen in MSS4 und Rab3A/Rab8 in zwei um 180° gedrehten Ansichten. **(A)** Schematische Darstellung von Rab3A in aktiver Konformation (Stabmodell: GTP-Analog GppNHp). Die Positionen der eingeführten Mutationen an Rab3A und Rab8 (in Rab3A äquivalenten Positionen) sind durch rote Kugeln symbolisiert. Die Mutationen sind vor allem im Bereich der MSS4-Bindungsfläche zu finden (*SwitchI*: D44_{Rab3A}/E30_{Rab8}, D45_{Rab3A}/D31_{Rab8}, F51_{Rab3A}/F37_{Rab8}, V52_{Rab3A}/I38_{Rab8}, S53_{Rab3A}/S39_{Rab8}; β 2- β 3 Interswitch: K60_{Rab3A}/K46_{Rab8}, V61_{Rab3A}/I47_{Rab8}), aber auch Reste, die nicht direkt in die Bindung involviert waren Bestandteil kinetischer Analysen (*P-loop*: S31_{Rab3A}/S17_{Rab8}; *SwitchII*: T89_{Rab3A}/T75_{Rab8}; β 2- β 3 Interswitch: Q74_{Rab3A}/Q60_{Rab8}). **(B)** Schematische Darstellung des MSS4:Rab8-Komplexes. Wie in (A) sind die Positionen der untersuchten Mutationen durch rote (Rab8/Rab3A) und grüne (MSS4) Kugeln markiert, sofern möglich, da E30_{Rab8}/D44_{Rab3A} und D31_{Rab8}/D45_{Rab3A} in der MSS4:Rab8-Kristallstruktur nicht sichtbar waren. Die Mehrzahl der eingeführten Mutationen liegen nahe der MSS4:Rab8-Bindungsfläche, mit Ausnahme von S17_{Rab8}/S31_{Rab3A} und T75_{Rab8}/T89_{Rab3A}. (graue Kugel: Zinkion)

ERGEBNISSE

Stark negative Effekte auf den Nukleotidaustausch weisen die Mutanten F51A_{Rab3A} (F37A_{Rab8}), V61A_{Rab3A} (I47A_{Rab8}), T89A_{Rab3A} (T75A_{Rab8}), D73A_{MSS4}, M74A_{MSS4}, F75A_{MSS4} und D96A_{MSS4} auf. Mit Ausnahme von T89_{Rab3A} bzw. T75_{Rab8} sind alle erwähnten Reste in der Bindungsoberfläche der beiden Proteine lokalisiert und gehen mehrfache spezifische polare oder hydrophobe Kontakte ein. Durch die Mutation zu Alanin verringert sich daher die Affinität der Proteine zueinander und beeinflusst darüber die katalytische Effizienz k_4/K_3 negativ. Unerklärt bleibt der stark negative Effekt der Mutation T89A_{Rab3A}, und die Verminderung der Nukleotidaustauschaktivität der Mutante ist aus der MSS4:Rab8-Struktur nicht ableitbar. Die in *SwitchII* befindliche Aminosäure T75_{Rab8} (T89_{Rab3A}) bildet in der Komplexstruktur mit MSS4 keine direkten oder indirekten Kontakte aus, sondern ist der Bindungsoberfläche abgewandt. Da die intrinsische Nukleotidfreisetzungsrates T89A_{Rab3A}-Mutante im Vergleich zur Rab3A-Wildtypform nahezu unverändert ist⁷⁰, hat die Mutation vermutlich keinen Einfluss auf die strukturelle Integrität des Proteins, und der Grund für die veränderte Austauschaktivität ist wahrscheinlich nicht in einem veränderten Nukleotidbindungsverhalten der mutierten RabGTPase zu suchen. Überraschenderweise ist die Aminosäure T89_{Rab3A} Bestandteil eines in exozytotischen Rabs konservierten Abschnittes mit der Sequenz (₈₆TITT/S₈₉ in Rab3A, ₇₂TITT/S₇₅ in Rab8). Sollte dieser konservierte Bereich für die Bindung anderer Effektor- oder Regulatorproteine als MSS4 von Bedeutung sein, so wäre bei Mutation kein Einfluss auf die Nukleotidaustauschaktivität zu erwarten. Allerdings ist eine Beteiligung von *SwitchII* an der Bindung von MSS4 anhand der MSS4:Rab8-Kristallstruktur nicht auszuschließen, da die Erkennung des konservierten Abschnittes in *SwitchII* ein Intermediat im Nukleotidaustauschprozess sein mag, auch wenn damit einhergehende starke strukturelle Reorganisationen bei Bindung von MSS4 an die RabGTPase unwahrscheinlich erscheinen.

Tabelle 4: Zusammenfassende Auflistung der Auswirkung von Aminosäuremutationen in Rab3A/Rab8 und MSS4 auf den Nukleotidaustausch. Die Tabelle zeigt die Mutationen an Rab3A bzw. Rab8 und MSS4 in Verbindung mit den ermittelten biophysikalischen Parametern k_4 und K_3 (entsprechend Abbildung 12) des Nukleotidaustauschs. Einander entsprechende, homologe Mutationen zwischen Rab3A und Rab8 sind zur besseren Vergleichbarkeit angegeben, die Position der mutierten Aminosäuren in der Rab3A- und MSS4:Rab8-Struktur kann Abbildung 17 entnommen werden. Aus den katalytischen Konstanten k_4 und K_3 wurde die katalytische Effizienz (k_4/K_3) berechnet und die Auswirkung der Mutation mit der katalytischen Effizienz des Wildtypproteins verglichen (Quotient mut/wt). Mutationen, die zu geringerer katalytischer Effizienz des Nukleotidaustauschs im Vergleich zum Wildtypprotein führen, sind in roter Schrift dargestellt, solche mit höherer Effizienz dagegen in grün.

Rab Mutation	entspricht	MSS4 Mutation	k_4 ($10^{-3}s^{-1}$)	K_3 (μM)	k_4/K_3 ($M^{-1}s^{-1}$)	mut/wt Kat. Eff.	
Rab3A wt		wt	7.7	11	715	1	70
Rab3A S31A	S17A _{Rab8}	wt	4.1	7	590	0.83	70
Rab3A D45A	D31A _{Rab8}	wt	10	2.6	3900	5.4	70
Rab3A F51A	F37A _{Rab8}	wt	2.4	170	14	0.02	70
Rab3A V52A	I38A _{Rab8}	wt	17	21	800	1.1	70
Rab3A S53A	S39A _{Rab8}	wt	30	45	660	0.92	70
Rab3A K60A	K46A _{Rab8}	wt	4.7	25	190	0.27	70
Rab3A V61A	I47A _{Rab8}	wt	1.8	180	10	0.014	70
Rab3A T89A	T75A _{Rab8}	wt	5	150	33	0.032	70
Rab3A wt		S28A	5.1	35	150	0.22	155
Rab3A wt		D73A	13	245	54	0.08	155
Rab3A wt		M74A	8.4	200	42	0.06	155
Rab3A wt		F75A	3.9	290	13	0.02	155
Rab3A wt		N79A	3.3	42	79	0.11	155
Rab3A wt		D96A	2.7	130	21	0.03	155
Rab8 wt		wt	230	27	8520	1	
Rab8 wt		F75A	50	35	1430	0.14	
Rab8 E30A	D44A _{Rab3A}	wt	325	0.6	540000	63	
Rab8 D31A	D45A _{Rab3A}	wt	301	4.8	62000	7.3	
Rab8Q60G	Q74G _{Rab3A}	wt	600	2.4	250000	29	

Die kinetischen Untersuchungen des MSS4-katalysierten Nukleotidaustauschs sind an der GTPase Rab3A von einer andern Arbeitsgruppe durchgeführt worden. Um die erhaltenen Parameter für das System aus MSS4 und Rab8 verifizieren und damit auf einen möglichen generellen Mechanismus der Wirkung von MSS4 auf exozytotische Rab-Proteine schließen zu können, wurden ähnliche Mutationen in Rab8 eingeführt und kinetisch charakterisiert. Dafür wurde die Auswirkung der F75A_{MSS4}-Mutation sowie der zu Rab3A homologen

ERGEBNISSE

Mutation $D45A_{\text{Rab3A}}$ an Rab8 untersucht ($D31A_{\text{Rab8}}$) (siehe Abbildung 19). Zwar sind die intrinsische Nukleotiddissoziation von Rab8 sowie der MSS4-stimulierte Nukleotidaustausch von Rab8 wesentlich schneller als von Rab3A, dennoch konnten die grundsätzlichen Ergebnisse des Austausches an Rab3A auf das System aus Rab8 und MSS4 übertragen werden. Die Mutation $F75A_{\text{MSS4}}$ bewirkt sowohl an Rab3A als auch an Rab8 eine Verminderung der katalytischen Effizienz ($k_{-4}/K_M(\text{Rab3A})=0.02$, $k_{-4}/K_M(\text{Rab8})=0.14$) durch geringere Affinität für den Rab:Nukleotid-Komplex. Dabei ist die Auswirkung für Rab3A um ungefähr eine Größenordnung ausgeprägter als für Rab8, tendenziell ist der Effekt jedoch als ähnlich zu betrachten. Gleiches gilt für die Auswirkung der Mutation $D31A_{\text{Rab8}}$ (homolog zu $D45A_{\text{Rab3A}}$), welche die Affinität der mutierten Formen von Rab8:Nukleotid und Rab3A:Nukleotid für MSS4 erhöhen und damit die katalytische Effizienz um einen Faktor 5-7 erhöhen, bei nahezu gleich bleibender katalytischer Aktivität k_{-4} . Grund im Fall von $D31A_{\text{Rab8}}$ ist wie bereits geschildert die verringerte elektrostatische Abstoßung zwischen der Helix $\alpha 1$ und $D96_{\text{MSS4}}$ durch die Mutation von Aspartat31 zu Alanin in Rab8.

Da die Effekte der Mutationen $F75A_{\text{MSS4}}$ sowie $D31A_{\text{Rab8}}$ und $D45A_{\text{Rab3A}}$ im MSS4-katalysierten Nukleotidaustausch sehr ähnlich sind, ist der von MSS4 angewandte Mechanismus für Rab3A und Rab8 vermutlich als ähnlich anzusehen und die kinetischen Ergebnisse aus vorherigen Studien von Mutationen an Rab3A und MSS4 auf das System aus Rab8 und MSS4 übertragbar.

Bei vergleichender Betrachtung der MSS4:Rab8-Struktur mit der GTP-Form von Rab3A fällt auf, dass der Aminosäurerest $E30_{\text{Rab8}}$ bzw. $D44_{\text{Rab3A}}$ sowohl elektrostatisch als auch sterisch von $D96_{\text{MSS4}}$ abgestoßen wird. Daher ist für die Mutation $E30A_{\text{Rab8}}$ ein noch größerer positiver Effekt auf die Affinität von Rab8:Nukleotid zu MSS4 und damit auf die katalytische Effizienz zu erwarten, was durch kinetische Untersuchung des MSS4-katalysierten Nukleotidaustauschs an $E30A_{\text{Rab8}}$ bestätigt werden konnte (siehe Tabelle 4 und Abbildung 19). Die nukleotidgebundene Mutante $E30A_{\text{Rab8}}$ zeigt eine ca. fünfzigfach höhere Affinität K_3 ($K_3(\text{Rab8}_{\text{wt}})=27\mu\text{M}$, $K_3(\text{E30A}_{\text{Rab8}})=0.6\mu\text{M}$) für MSS4 als die Wildtyp-RabGTPase bei gleichzeitig nur geringfügig beschleunigter katalytischer Aktivität k_{-4} ($k_{-4}(\text{Rab8}_{\text{wt}})=0.23\text{s}^{-1}$, $k_{-4}(\text{E30A}_{\text{Rab8}})=0.325\text{s}^{-1}$). Dadurch ist die katalytische Effizienz des mutierten Proteins mehr als sechzigfach gegenüber der Wildtyp-RabGTPase erhöht. Da die Aminosäuren $E30_{\text{Rab8}}$ und $D31_{\text{Rab8}}$ und ihre homologen Reste anderer Rab-Proteine in exozytotischen RabGTPasen streng konserviert sind, stellt sich im Zusammenhang mit den bestimmten kinetischen Parametern von Mutationen in diesen Positionen die Frage nach der Bedeutung des MSS4-katalysierten Nukleotidaustauschs. Aus der Beobachtung, dass bestimmte Aminosäuren in den exozytotischen Rab-Proteinen Rab1A, Rab3A, Rab8, Rab10, Ypt1 und Sec4 streng konserviert sind, in endozytotischen Rabs aber variieren, und aus der Tatsache, dass MSS4/DSS4 nur mit eben den exozytotischen Rabs interagiert, wurde geschlossen, dass die

erwähnten streng konservierten Aminosäuren in die Bindung von MSS4/DSS4 an die Rab-Proteine und die Fähigkeit MSS4/DSS4-stimulierten Nukleotidaustausch eingehen zu können, direkt involviert seien. Im Umkehrschluss erfordern diese Konservierung der Aminosäuren und die Rolle von MSS4/DSS4 als GEF allerdings, dass die exozytotischen Rabs von der Evolution auf optimale Stimulierbarkeit des Nukleotidaustauschs durch MSS4/DSS4 selektiert und optimiert wurden. Die kinetischen Parameter der Mutanten E30A_{Rab8}, D31A_{Rab8} und D45A_{Rab3A} lassen Zweifel an diesem Bild aufkommen, da durch einfache Mutation dieser Aminosäuren zu Alanin die katalytische Effizienz von MSS4 um einen wesentlichen Faktor gesteigert werden kann (siehe Tabelle 4). Diese Beobachtung lässt zwei alternative Interpretationen zu: Sollte MSS4 tatsächlich ein GEF sein, dessen primäre Funktion die Katalyse des Nukleotidaustauschs an exozytotischen Rab-Proteinen ist, so müssen die Aminosäuren E30_{Rab8} und D31_{Rab8} weitere Funktionen für die Interaktion mit anderen Regulator- oder Effektorproteinen haben. Für diese Interpretation der Rolle von E30_{Rab8} und D31_{Rab8} spricht außerdem die Lage der Aminosäuren in der RabSF2-Region; die RabSF-Regionen sind vermutlich zuständig für die Interaktion mit spezifischen Effektoren und/oder Regulatoren. Wären E30_{Rab8} und D31_{Rab8} hierfür unbedeutend, so wären sie aller Wahrscheinlichkeit nach im Laufe der Evolution auf Stimulierbarkeit des Nukleotidaustauschs durch MSS4/DSS4 optimiert und mutiert (z.B. zu Alanin, wie in dieser Studie gezeigt) worden.

Alternativ kann als weitere Interpretationsmöglichkeit der kinetischen Daten die Funktion von MSS4/DSS4 als Nukleotidaustauschfaktor angezweifelt werden, und die Nukleotidfreisetzung nur ein Nebenprodukt der eigentlichen Aufgabe von MSS4/DSS4 sein. Eventuell ist die Geschwindigkeit und/oder Effizienz des Nukleotidaustauschs nicht von Belang für die physiologische Funktion von MSS4/DSS4, weswegen eine Optimierung der Positionen E30_{Rab8} und D31_{Rab8} auf maximale katalytische Effizienz nicht von Bedeutung ist. Wie im vorangehenden Modell geschildert sind dann diese konservierten Aminosäurepositionen für die Wechselwirkung mit anderen Bindungspartnern exozytotischer Rabs möglicherweise essentiell.

Weitere Inspektion der MSS4:Rab8-Kristallstruktur und Vergleich mit der GTP-Form von Rab3A lässt Glutamin60_{Rab8} (Glutamin74_{Rab3A}) als weitere, bisher nicht beachtete Aminosäure mit Bedeutung für den Nukleotidaustausch erkennen. Die Aminosäure Q60_{Rab8} ist nicht spezifisch für exozytotische Rabs konserviert, sondern ist auch in den endozytotischen Rabs häufig in homologer Position zu finden (siehe Abbildung 3), kann aber auch durch andere Aminosäuren (z.B. Glutamat in Rab5B) ersetzt sein. Die Aminosäure Q60_{Rab8} befindet sich zentral im β -Strang β 3 von Rab8 (siehe Abbildung 18) und ist aufgrund fehlender Konserviertheit in exozytotischen Rab-Proteinen bisher nicht mit dem MSS4-katalysierten Nukleotidaustausch in Verbindung gebracht worden. Bei Bindung von MSS4 an Rab8 bildet

ERGEBNISSE

sich das intermolekulare β -Faltblatt zwischen $\beta_{H_{MSS4}}$ und $\beta_{2_{Rab8}}$ aus. Die spezifischen Interaktionen nahezu jeder Aminosäure reichend von F33_{Rab8} bis T49_{Rab8} in der MSS4:Rab8-Bindungsoberfläche zwingt β -Strang $\beta_{2_{Rab8}}$ in eine starre aber ungewöhnliche Konformation verglichen mit der nukleotidgebundenen Form von RabGTPasen (z.B. Rab3A:GTP). Dabei werden Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem N-terminalen Ende von $\beta_{2_{Rab8}}$ und dem C-terminalen Ende von $\beta_{3_{Rab8}}$ aufgebrochen, die in der GTP-Form von RabGTPase normalerweise vorhanden und an der Ausbildung des intramolekularen β -Faltblatts beteiligt sind. Zur Wiederherstellung dieser Wasserstoffbrückenbindungen müsste $\beta_{3_{Rab8}}$ der MSS4-induzierten Bewegung von $\beta_{2_{Rab8}}$ folgen. Eine solche Bewegung ist allerdings nicht möglich, da diese eine ebensolche Bewegung von Q60_{Rab8} hinein in die Position von F75_{MSS4} bedeuten würde (siehe Abbildung 18). Betrachtet aus der Sicht von $\beta_{2_{Rab8}}$ wird also $\beta_{3_{Rab8}}$ durch sterische Abstoßung zwischen Q60_{Rab8} und F75_{MSS4} in Richtung der Nukleotidbindungstasche gedrückt, was eine einhergehende Bewegung des β -Faltblatts, gebildet aus β_1 , β_3 , β_4 , β_5 und β_6 ; mit sich bringt. Da die C-terminalen Enden von β_3 und β_1 mit *SwitchII* bzw. dem *P-loop* verbunden sind, werden diese nukleotidbindenden Schleifen relativ zu β_2 in die Nukleotidbindungstasche gedrückt und interferieren dort mit der normalen Position des Nukleotids. Es ist daher zu erwarten, dass eine Mutation von Q60_{Rab8} zu einer Aminosäure mit geringerer sterischer Interferenz zu F75_{MSS4} einen Effekt auf den MSS4-katalysierten Nukleotidaustausch zeigt. Daher wurde die Mutante Q60G_{Rab8} hergestellt um den Effekt auf die MSS4-GEF-Aktivität zu untersuchen. Oberflächlich betrachtet wäre auch eine Mutation von F75_{MSS4} zu Alanin geeignet, diesen sterischen Effekt zu untersuchen. Allerdings zeigt F75_{MSS4} spezifische hydrophobe Interaktionen mit T5_{Rab8}, L8_{Rab8} und I47_{Rab8}. Mutation von F75_{MSS4} würde daher zu multiplen Effekten führen, nämlich zur Beeinflussung der sterischen Behinderung mit Q60_{Rab8} und Veränderung der Affinität zu Rab8 durch Abbruch der erwähnten hydrophoben Interaktionen. Die Aminosäure Q60_{Rab8} zeigt keine polaren oder hydrophoben Wechselwirkungen mit MSS4 und ist daher wesentlich besser geeignet, um die Bedeutung des sterischen Effektes von Q60_{Rab8} auf die Konformation des Rab8 β -Faltblatts und den Nukleotidaustausch zu analysieren.

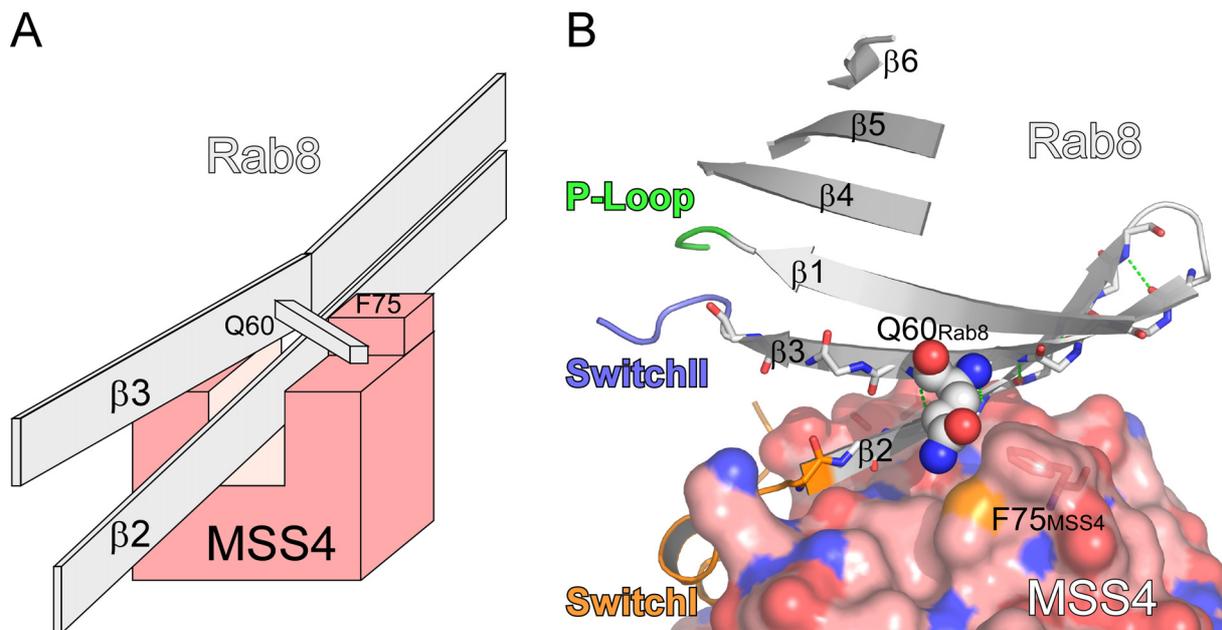


Abbildung 18: Schematische Darstellung der Bedeutung von Glutamin_{60Rab8}/Glutamin_{74Rab3A} für den MSS4-katalysierten Nukleotidaustausch. **(A)** Die stark vereinfachte Darstellung verdeutlicht die Abhängigkeit der relativen Konformation der β-Stränge β_{2Rab8} und β_{3Rab8} bei Bindung an MSS4 von der sterischen Abstoßung der Aminosäuren Q60_{Rab8} und F75_{MSS4}. Der β-Strang β2 wird unter Bildung ein intermolekularen β-Faltblatts fest an die Oberfläche von MSS4 gebunden. Das übliche Arrangement der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen β_{2Rab8} und β_{3Rab8} ist im MSS4:Rab8-Komplex unterbrochen, da der β-Strang β_{3Rab8} der Bewegung von β_{2Rab8} aufgrund der sterischen Beeinträchtigung der Aminosäuren Q60_{Rab8} und F75_{MSS4} nicht folgen kann. **(B)** Die Abbildung zeigt den in (A) geschilderten Sachverhalt an der MSS4:Rab8-Struktur auf. Aus Gründen der Übersichtlichkeit ist MSS4 in Oberflächendarstellung abgebildet, sowie für Rab8 lediglich das β-Faltblatt (gebildet aus β_{1Rab8}-β_{6Rab8}), die nukleotidbindenden Schleifen *P-loop* (grün), *SwitchI* (orange) und *SwitchII* (blau). Als Stäbchenmodell ist die Aminosäure F75_{MSS4} aufgeführt, sowie das Polypeptidrückgrat von β_{2Rab8} und β_{3Rab8} mit den entsprechenden Wasserstoffbrückenbindungen zwischen β_{2Rab8} und β_{3Rab8} (grün gestrichelte Linien). Die Aminosäure Q60_{Rab8} ist als Kugelmodell gezeigt. Die sterische Beeinträchtigung zwischen Q60_{Rab8} und F75_{MSS4} wird umgangen, indem das β-Faltblatt bestehend aus β3, β1, β4, β5 und β6 relativ zu β-Strang β2 in Richtung der Nukleotidbindungstasche gedrückt wird. Dadurch werden einige der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen β_{2Rab8} und β_{3Rab8}, die in der unkomplexierten RabGTPase vorhanden sind, nahe der Nukleotidbindungstasche aufgebrochen. Die darauf folgende Bewegung des *P-loop* und von *SwitchII* in Richtung der Nukleotidbindungstasche interferiert mit der normalen Positionierung der Nukleotids.

Um eine mögliche Beeinträchtigung der strukturellen und biochemischen Stabilität der Q60G_{Rab8}-Mutante auszuschließen, wurde die intrinsische Nukleotidfreisetzungsrates k_{-1} der Mutante untersucht und mit der des Wildtypproteins verglichen. Die Auswirkung der Mutation Q60G_{Rab8} auf die strukturelle Integrität von Rab8 ist als gering anzusehen, da die Mutante eine lediglich um 25% gesteigerte intrinsische Nukleotidfreisetzungsrates von MantGDP gegenüber Wildtyp-Rab8 ($k_{-1}(\text{Rab8wt})=7.2 \cdot 10^{-4} \text{s}^{-1}$, $k_{-1}(\text{Q60G}_{\text{Rab8}})=9.0 \cdot 10^{-4} \text{s}^{-1}$) besitzt. Dieser geringe Einfluss der Q60G-Mutation lässt den Schluss zu, dass die mutierte Form des Proteins ein kaum verändertes Nukleotidbindungsverhalten aufweist und damit sich Wildtyp und Mutante nur wenig voneinander unterscheiden werden.

ERGEBNISSE

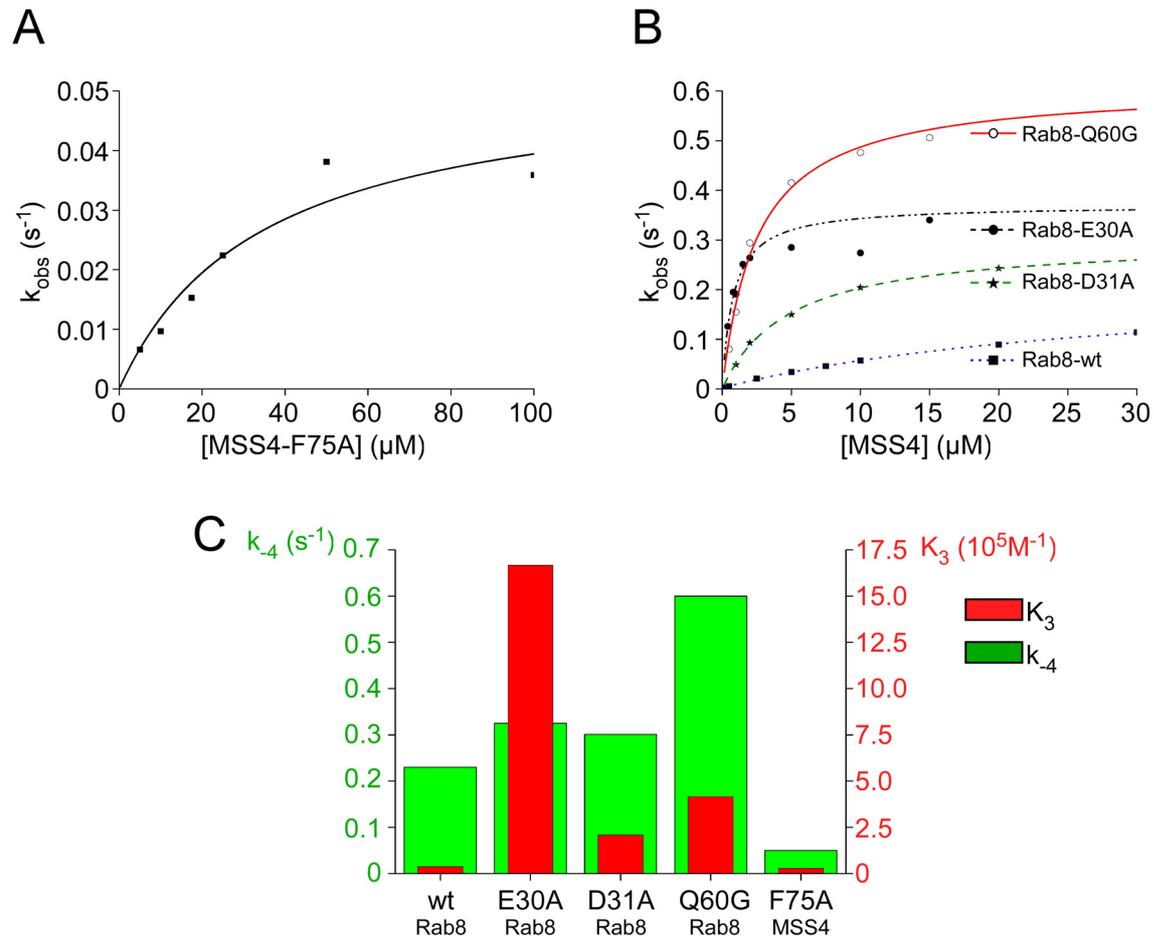


Abbildung 19: Auswirkung von ausgewählten Aminosäuremutationen in MSS4 und Rab8 auf den Nucleotidaustausch. **(A)** Hyperbolische Abhängigkeit des Nucleotidaustauschs an Rab8 von der Konzentration der Mutante F75A_{MSS4}. **(B)** Kinetische Untersuchung des MSS4-Nucleotidaustauschs an verschiedenen Rab8-Mutanten in Abhängigkeit von der MSS4-Konzentration. **(C)** Vergleichende Darstellung der berechneten Konstanten des Nucleotidaustauschs für verschiedene Mutanten. Aufgeführt sind die Austauschraten (k_4 , linke Ordinate, grüne Darstellung) und die Affinitäten von MSS4/F75A_{MSS4} für die verschiedenen Rab8-Mutante:Nucleotid-Komplexe (K_3 , rechte Ordinate, rote Darstellung). Wesentlich stärker als die Austauschraten k_4 werden die Affinitäten K_3 von MSS4/F75A_{MSS4} für die verschiedenen Rab8-Mutante:Nucleotid-Komplexe durch die hier ausgewählten Mutationen beeinflusst.

Die Mutation Q60G_{Rab8} wirkt sich positiv sowohl auf die katalytische Aktivität k_4 als auch auf die Affinität K_3 von MSS4 für den Rab8:Nucleotid-Komplex aus (siehe Tabelle 4 und Abbildung 19): Die katalytische Aktivität k_4 erhöht sich ca. um einen Faktor drei, die Affinität K_3 steigt um einen Faktor zehn, was gemeinsam in einer etwa dreißigfach gesteigerten katalytischen Aktivität k_4/K_3 der Q60G_{Rab8}-Mutante gegenüber dem Wildtypprotein resultiert. Das Ergebnis konnte damit die getroffenen Vorhersagen bestätigen. Die Aminosäure Q60_{Rab8} oder jegliche Aminosäure in der zu Q60_{Rab8} äquivalenten Position ist somit in den Nucleotidaustausch durch MSS4 involviert, obwohl sie in dieser Position nicht exklusiv für exozytische Rab-Proteine konserviert ist. Die gesteigerte katalytische Aktivität k_4 der Q60G_{Rab8}-Mutante deutet darauf hin, dass die GTPase nach Nucleotidfreisetzung das Nucleotid mit erhöhter Geschwindigkeit erneut binden kann, wahrscheinlich durch erleichterte Wiederherstellung des $\beta 2$ - $\beta 3$ -Faltblatts von Rab8 und damit einhergehender verbesserter Verdrängung von Aminosäuren des *P-loop* und *SwitchII* aus der Nucleotid-

bindungstasche bei Bindung des Nukleotids. Die relativ hohe Affinität K_3 der nukleotidgebundenen Q60G_{Rab8}-Mutante für MSS4 resultiert aus dem Verlust der sterischen Behinderung der hydrophoben Aminosäure F75_{MSS4} mit dem Aminosäurerest von Q60_{Rab8}. Obwohl MSS4 das thermodynamische Potential besitzt, den Nukleotidaustausch an exozytotischen RabGTPasen zu katalysieren, lassen die in dieser und anderen Studien erhaltenen strukturellen und kinetischen Daten Zweifel an der Rolle als GEF aufkommen: MSS4 verwendet einen unterschiedlichen Bindungsmodus verglichen mit anderen GEFs kleiner GTPasen: Es bewirkt eine Entfaltung und Destabilisierung der essentiellen nukleotid-indenden Bereiche (*P-loop*, *SwitchI*, *SwitchII*). Die an MSS4 bindenden RabGTPasen sind offensichtlich nicht von der Evolution auf den möglichst effizientesten Nukleotidaustausch optimiert worden. Daher mag die Fähigkeit zum Nukleotidaustausch durch MSS4 lediglich ein Nebenprodukt seiner eigentlichen, bisher unbekanntes physiologischen Funktion sein. Da MSS4 im Laufe der hier vorliegenden Arbeit einige ungewöhnliche strukturelle und kinetische Eigenschaften offenbarte, welche seine Funktion als effizienten Nukleotidaustauschfaktor in Frage stellt, wurde in einem weiteren Projekt der Nukleotidaustauschfaktor Sec2 untersucht. Das Protein Sec2 zeigt Nukleotidaustauschaktivität, seine strukturellen und kinetischen Parameter sind allerdings unbekannt und sollen, sofern möglich, im folgenden Abschnitt beschrieben werden. Die Analyse von Sec2 konnte zeigen, dass in der Tat effiziente Nukleotidaustauschfaktoren für kleine GTPasen der Rab-Subfamilie existieren und stellt daher die Funktion von MSS4 weiter in Frage.

3.2. Der Nukleotidaustauschfaktor Sec2

Die Untersuchung des MSS4-katalysierten Nukleotidaustauschs ergab ungewöhnliche strukturelle und kinetische Ergebnisse: Der GEF MSS4 bindet im Gegensatz zu anderen bisher strukturell charakterisierten GEFs an Rab8 nur über *SwitchI* und das β 2-Faltblatt sowie Teile des N-Terminus, aber nicht über *SwitchII* und/oder den *P-loop*, die in anderen GTPase:GEF-Komplex in jedem Fall Bestandteil der Bindungsoberfläche sind. Außerdem sorgt MSS4 für eine teilweise Entfaltung von Rab8 durch Beeinflussung der Position der Helix α 1 und zerstört darüber die für die Nukleotidbindung bedeutende Konformation des *P-loop*, wodurch vermutlich die erneute Bindung von Nukleotid an den MSS4:Rab8-Komplex erschwert wird. Dieser Sachverhalt drückt sich in der geringen katalytischen Effizienz des Nukleotidaustauschs von MSS4 aus, eine weitere ungewöhnliche Eigenschaft für einen GEF. Die abweichenden Charakteristika von MSS4 im Vergleich zu anderen GEFs bringt die Frage auf, ob MSS4 einen Mechanismus des Nukleotidaustauschs anwendet, der von allen RabGEFs appliziert wird oder ob er nur eine MSS4-spezifische Besonderheit darstellt. Um diese Frage zu beantworten, wurde als weiteres RabGEF das Protein Sec2 biophysikalisch und strukturell charakterisiert, wie im Folgenden dargelegt. Obwohl die Aufklärung der Struktur sowohl von Sec2 als auch eines Sec2:Rab-Komplexes erfolglos war und damit detaillierte Informationen des Sec2-katalysierten Nukleotidaustauschs nicht verfügbar sind, konnte eine umfangreiche kinetische Analyse des Austausches zeigen, dass Sec2 ein außerordentlich effizienter GEF ist. Daher stimuliert Sec2 wahrscheinlich durch einen von MSS4 verschiedenen Mechanismus den Nukleotidaustausch und lässt vermuten, dass potente GEFs für Rab-Proteine existieren und MSS4 einen eher ungewöhnlichen GEF repräsentiert.

3.2.1. Strategie der Charakterisierung von Sec2

Wie bereits einleitend beschrieben, bindet der N-Terminus von Sec2 an die RabGTPase Sec4 und zeigt an dieser Nukleotidaustauschaktivität. Daher wurde die Untersuchung von Sec2 auf die N-terminalen Aminosäuren 1-165 beschränkt und dieses verkürzte Konstrukt durch molekularbiologische Methoden hergestellt. Der Abschnitt 1-165 enthält vermutlich eine *Coiled-Coil*-Region als strukturelle Eigenschaft. Die physiologische Bindung von Sec2₁₋₁₆₅ an Sec4 konnte gezeigt werden, weswegen der Komplex aus Sec2₁₋₁₆₅ und Sec4 zum Gegenstand struktureller und kinetischer Untersuchung gemacht wurde. Um die Wahrscheinlichkeit erfolgreicher Kristallisation zu erhöhen wurde zusätzlich versucht, Komplexe von Sec2₁₋₁₆₅ mit anderen RabGTPasen zu bilden. Hierfür wurde eine Reihe von RabGTPasen aus verschiedenen Organismen mit Hilfe von Größenausschlusschromatographie auf die Bindung an Sec2₁₋₁₆₅ überprüft. Von den untersuchten Rab-Proteinen

Rab1A, Rab1B, Rab3A, Rab4A, Rab6A, Rab7, Rab8, Rab9, Rab11, Rab13, Ypt1, Sec4, Ypt31, Ypt7, Ypt51 und Ypt52 zeigten ausschließlich Sec4, Rab3A und Rab8 Bindung an Sec2₁₋₁₆₅ (siehe Abbildung 20). Interessanterweise fallen alle diese Sec2₁₋₁₆₅-bindenden Rabs in die Klasse exozytischer Rabs, wenn auch das Ausmaß der Wechselwirkungen nicht so zahlreich wie im Falle von MSS4 ist. Da Rab8 das Säugetierhomolog zu Sec4 ist¹⁸⁹, ist die Wechselwirkung mit Sec2 nicht überraschend. Ebenso weist Rab3A signifikante Sequenzhomologien zu Sec4 und Rab8 auf und agiert wie Rab8 und Sec4 in den finalen Schritten des exozytischen Vesikeltransportes vom Golgi-Apparat zur Plasmamembran¹⁹⁰. Aufgrund dieser Gemeinsamkeiten mag Sec2 die GTPasen Sec4, Rab8 und Rab3A erkennen, auch wenn diese Komplexe heterolog sind. Dieser Vermutung muss allerdings entgegengesetzt werden, dass die erwähnten drei Rab-Proteine weder einer gemeinsamen Rab-Subfamilie angehören^{61,72}, noch signifikante Sequenzunterschiede zu anderen, nicht Sec2-bindenden Rabs bestehen. Generell ließe ein solcher Sequenzvergleich der Sec2-bindenden Rabs Sec4, Rab8 und Rab3A mit anderen RabGTPasen eine Bestimmung der Aminosäuren zu, die vermutlich mit Sec2 interagieren; leider können in diesem Fall aber keine signifikanten Unterschiede ausgemacht werden können und daher durch Sequenzhomologieanalyse der Sec2-bindenden Rab-Proteine Sec4, Rab8 und Rab3A keine Rückschlüsse auf die Sec2-Bindungsstelle gezogen werden.

Zur strukturellen Untersuchung wurden Komplexe aus Sec4₁₉₋₁₈₆, Rab8₁₋₁₈₃ und Rab3A₁₄₋₁₈₄ mit Sec2₁₋₁₆₅ gebildet und gereinigt und nachfolgend zur Kristallisation eingesetzt. Das physiologische System aus Sec2₁₋₁₆₅, Sec4₁₉₋₁₈₆ und Nukleotiden wurde einer kinetischen Analyse ähnlich wie bereits für MSS4 beschrieben unterzogen.

3.2.2. Expression und Reinigung der Komponenten zur Sec2₁₋₁₆₅ Charakterisierung

Zur Charakterisierung des Sec2-katalysierten Nukleotidaustauschs wurden folgende Proteinkomponenten benötigt: Sec2₁₋₁₆₅, Sec4₁₄₋₁₈₆, Rab8₁₋₁₈₃ und Rab3A₁₄₋₁₈₄. Mit Ausnahme von Rab8₁₋₁₈₄ wurden alle Komponenten mit Hilfe von Metallaffinitätschromatographie gereinigt. Dazu wurden die Proteine Sec2₁₋₁₆₅, Sec4₁₄₋₁₈₆, und Rab3A₁₄₋₁₈₄ in einem modifizierten pET19-Vektor mit einem Affinitätsanker, gefolgt von einer TEV-Protease Erkennungssequenz, fusioniert und im bakteriellen System exprimiert. Im Falle von Sec4₁₄₋₁₈₆ ließ sich der Affinitätsanker nicht durch die TEV-Protease entfernen, im Fall von Sec2₁₋₁₆₅ gelang dies erst nach Komplexbildung mit Sec4₁₄₋₁₈₆, Rab8₁₋₁₈₃ oder Rab3A₁₄₋₁₈₄. Das Protein Rab8₁₋₁₈₃ musste über das in Abschnitt 3.1.2 beschriebene Verfahren der Denaturierung/Renaturierung gewonnen werden. Anschließend wurden die verschiedenen Komplexe aus Sec2₁₋₁₆₅ mit Sec4₁₄₋₁₈₆, Rab8₁₋₁₈₃ oder Rab3A₁₄₋₁₈₄ gebildet, der Affinitäts-

ERGEBNISSE

anker von Sec2₁₋₁₆₅ im Komplex durch die TEV-Protease abgespalten und der jeweilige Komplex über Größenausschlusschromatographie gereinigt (siehe Abbildung 20).

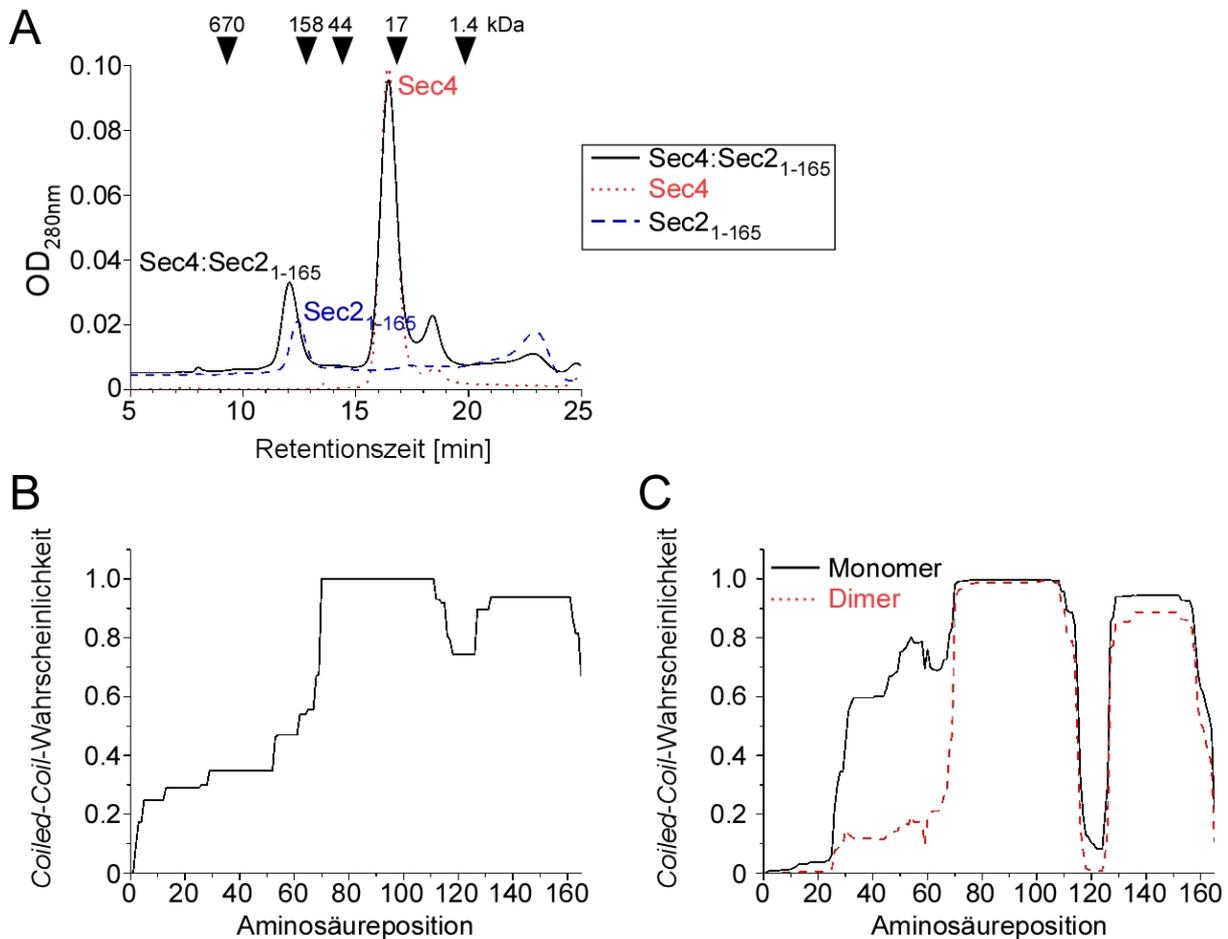


Abbildung 20: Komplexbildung von Sec4:Sec2₁₋₁₆₅ und Besonderheiten von Sec2₁₋₁₆₅. **(A)** Größenausschlusschromatographie der Sec4₁₄₋₁₈₆:Sec2₁₋₁₆₅-Komplexformierung. Deutlich erkennbar ist die Verschiebung hin zu geringeren Retentionszeiten bei Bildung des Sec4₁₄₋₁₈₆:Sec2₁₋₁₆₅-Komplexes aus den Komponenten Sec4₁₄₋₁₈₆ und Sec2₁₋₁₆₅. Oberhalb des Chromatogramms sind die Molekulargewichte einiger Standardproteine (Vitamin B₁₂: 1.4kDa; Myoglobin: 17kDa; Ovalbumin: 44kDa; γ -Globulin: 158kDa; Thyroglobulin: 670kDa) mit ihren Elutionen (schwarzer Pfeil), erhalten aus der Kalibrierung der Säule, angegeben. Sec2₁₋₁₆₅ eluiert außergewöhnlich früh, wahrscheinlich begründet durch seine *Coiled-Coil*-Struktur. **(B)** Vorhersage der *Coiled-Coil*-Bildungsverhaltens von Sec2₁₋₁₆₅ mit Hilfe des Programms PairCoil¹⁷⁹. Sec2₁₋₁₆₅ weist über den gesamten Bereich Tendenz zur *Coiled-Coil*-Bildung auf, die im Bereich der Aminosäuren 65-165 maximal ist. **(C)** Vorhersage des *Coiled-Coil*-Bildungsverhaltens von Sec2₁₋₁₆₅ mit Hilfe des Programms MultiCoil¹⁸⁰. Das Programm MultiCoil liefert eine ähnliche Vorhersage wie das Programm PairCoil, gibt aber zusätzlich noch die Wahrscheinlichkeit einer Dimerisierung zu einem parallelen homodimeren *Coiled-Coil* an.

Wie aus Abbildung 20A ersichtlich, zeigt Sec2₁₋₁₆₅ ein ungewöhnliches Elutionsverhalten in der Größenausschlusschromatographie: Obwohl das Molekulargewicht des verkürzten Sec2-Konstrukts lediglich 21kDa beträgt, eluiert das Protein verglichen zu den Standardproteinen verwendet zur Kalibrierung der Säule mit einem scheinbaren Molekulargewicht größer als 158kDa. Dieses besondere Verhalten muss vermutlich mit der Struktur von Sec2₁₋₁₆₅ erklärt werden: Da für Sec2₁₋₁₆₅ eine hohe Wahrscheinlichkeit besteht eine *Coiled-Coil*-Struktur ausbilden zu können (siehe Abbildung 20B), ist das beobachtete Verhalten in der Größenausschlusschromatographie nicht unerwartet. *Coiled-Coil*-Strukturen stellen starre, stabförmige Gebilde dar, die sich wesentlich sperriger mit scheinbar größerer Molekularmasse in

der Größenausschlusschromatographie verhalten als globuläre Proteine gleichen Molekulargewichts. Es existieren verschiedene Arten von Coiled-Coil-Strukturen, so z.B. parallele oder antiparallele Homomultimere, sowie antiparallele Monomere. Ohne die atomare Struktur des Moleküls, hier Sec2₁₋₁₆₅, zu kennen ist eine Vorhersage des *Coiled-Coil*-Typus nur schwer möglich. Allerdings konnten durch die Strukturaufklärung verschiedenster *Coiled-Coil*-Proteine Gesetzmäßigkeiten und Regeln abgeleitet werden, mit deren Hilfe aus der Aminosäuresequenz des Proteins die Wahrscheinlichkeit eine bestimmte Coiled-Coil-Struktur (parallel oder antiparallel, Multimer oder Monomer) einzunehmen, berechnet werden kann^{179,180}. Das Konstrukt Sec2₁₋₁₆₅ zeigt über den gesamten Bereich eine Neigung zur *Coiled-Coil*-Bildung, die im Aminosäurebereich 60-165 maximal ist (siehe Abbildung 20B). Weiterhin besteht die Tendenz für Sec2₁₋₁₆₅ ein homodimeres, vermutlich paralleles *Coiled-Coil* auszubilden (siehe Abbildung 20C). Da in linksgängigen *Coiled-Coil*-Strukturen im Mittel 3.5 Aminosäuren eine Windung der α -Helix einnehmen und der Gangunterschied 5.1Å pro Windung beträgt, lässt sich die ungefähre Ausdehnung des Sec2₁₋₁₆₅ *Coiled-Coils* abschätzen. Bei Annahme eines antiparallelen, monomeren *Coiled-Coils* für den Aminosäureabschnitt 65-165, der die höchste Wahrscheinlichkeit einer *Coiled-Coil*-Bildung zeigt, wäre die Länge dieser Struktur minimal 72Å. Im Falle eines homodimeren *Coiled-Coils* wären maximal alle 165 Aminosäuren in die *Coiled-Coil*-Struktur involviert und die maximale Länge betrüge 240Å. Innerhalb dieser Grenzen bewegt sich die Größe von Sec2₁₋₁₆₅. Zum Vergleich: Ein globuläres Protein gleicher Masse zu Sec2₁₋₁₆₅ (21kDa) hätte dagegen einen Durchmesser von 36Å. Daher bestätigt die Größenausschlusschromatographie die Vermutung, dass Sec2₁₋₁₆₅ eine *Coiled-Coil*-Struktur annimmt, wenn auch die genaue Ausdehnung des *Coiled-Coils* nicht bestimmt werden kann. Zur Unterscheidung zwischen monomeren und dimeren *Coiled-Coil* müsste das Molekulargewicht des gereinigten Sec2₁₋₁₆₅-Moleküls bekannt sein. Für die Bestimmung des Molekulargewichtes wäre die Methode der analytischen Gleichgewichtultrazentrifugation geeignet, da diese unabhängig von der Ausdehnung des Moleküls und nur abhängig vom Molekulargewicht des analysierten Proteins ist.

Außerdem unklar ist die Stöchiometrie der verschiedenen Rab:Sec2₁₋₁₆₅-Komplexe. Ausgehend von densitometrischen Analysen der Proteinbanden nach Polyacrylamidgelelektrophorese muss vermutet werden, dass die Rab:Sec2₁₋₁₆₅-Komplexe in einem Verhältnis von 1:2 vorliegen. Diese Beobachtung stützt die Vermutung, dass Sec2₁₋₁₆₅ als homodimeres, paralleles *Coiled-Coil* vorliegt, da in einem monomeren, antiparallelen *Coiled-Coil* das Verhältnis von Rab:Sec2 von 1:2 nur erreicht werden könnte, wenn Sec2₁₋₁₆₅ zwei unabhängige *Coiled-Coils* bilden würde, die über eine externe Dimerisierungsdomäne einen Komplex bilden würden. Dann existierten aber ebenso zwei unabhängige Rab-Bindungsstellen an diesem Sec2₁₋₁₆₅-Dimer und es wäre eine Rab:Sec2-Komplex mit dem

ERGEBNISSE

Verhältnis 2:2 zu erwarten, was aber nicht beobachtet wurde. Allerdings kann diese Frage auch nur durch eine exakte Molekulargewichtsbestimmung des Rab:Sec2₁₋₁₆₅-Komplexes eindeutig beantwortet werden; hierfür wäre wiederum die analytische Gleichgewichtsupltrazentrifugation als Untersuchungsmethode geeignet, was aber nicht durchgeführt werden konnte.

Die Kristallisation der Komplexe Sec₁₋₁₆₅:Sec4₁₉₋₁₈₆, Sec₁₋₁₆₅:Rab8₁₋₁₈₃ und Sec2₁₋₁₆₅:Rab3A₁₄₋₁₈₄ wurde mit Hochdurchsatzmethoden versucht. Zwar wurden in einzelnen Kristallisationsansätzen auffällige und viel versprechende Aggregate mit kristallinem Charakter beobachtet, dennoch konnte die Variation der Kristallisationsparameter (Temperatur, Proteinkonzentration, Zusätze an Additiven, pH-Wert, Salzkonzentration etc.) der entsprechenden Bedingung nicht zu Optimierung in Richtung qualitativ verwendbarer Kristalle geführt werden.

Coiled-Coil-Proteine sind aufgrund ihrer gestreckten und wenig kompakten Struktur erfahrungsgemäß schwer zu kristallisieren. Sollte Sec2₁₋₁₆₅ tatsächlich eine Struktur mit einer Länge 240Å darstellen, wäre die Kristallisation wahrscheinlich besonders erschwert. Da RabGTPasen eine kompakte globuläre Struktur mit einem Durchmesser von ca. 35Å einnehmen, kann die Rab-Bindungsstelle auf Sec2₁₋₁₆₅ diese Ausdehnung kaum überschreiten. Daher wurde versucht, Sec2₁₋₁₆₅ in Gegenwart von gebundenen Sec4 durch limitierte Proteolyse mit der Protease Trypsin zu verdauen, um eine kompaktere Version von Sec2₁₋₁₆₅ mit intakter Rab-Bindungsstelle zu identifizieren. Zwei spezifische Spaltungsprodukte konnten mit Hilfe massenspektrometischer Analyse ausgemacht werden, die beide N-terminale Verkürzungen darstellen: Fragment 10-165 und Fragment 65-165. Diese verkürzten Konstrukte Sec2₁₀₋₁₆₅ und Sec2₆₅₋₁₆₅ wurden durch molekularbiologischer Techniken hergestellt, konnten aber nicht in löslicher Form exprimiert und gereinigt werden. Hier müssen weitere Konstrukte produziert werden, die ein besseres Löslichkeitsverhalten in der bakteriellen Expression zeigen.

Eine weitere Möglichkeit, die Bindungsstelle von Rab-Proteinen an Sec2₁₋₁₆₅ eventuell einzugrenzen, um mögliche kompaktere Sec2-Konstrukte zur Kristallisation herzustellen, resultiert aus der Analyse eines Aminosäuresequenzvergleichs ähnlicher Sec2-Domänen aus unterschiedlichen Organismen und/oder Proteinen. Stark konservierte Bereiche können dabei auf die Rab-Bindungsstelle hinweisen. Proteine, die neben Sec2 aus *Saccharomyces cerevisiae* eine Sec2-Domäne besitzen, sind Rabin3 aus *Rattus norvegicus*, Rabin8 *Homo sapiens* und Sec2 aus *Schizosaccharomyces pombe*. Durch die Sequenzhomologieanalyse der Sec2-Domänen dieser vier Proteine lassen sich zwei konservierte Bereiche identifizieren, die mögliche Bindungsstellen für die entsprechenden Rab-Proteine darstellen könnten (siehe Abbildung 21). Insbesondere im ersten Abschnitt befindet sich eine große Anzahl konservierter Aminosäuren. Da Sec2 aus *Saccharomyces cerevisiae* Sec4, Rab8 und Rab3A

bindet, muss sowohl die Bindungsoberfläche dieser drei RabGTPasen hoch konserviert sein als auch die Bindungsstelle in Sec2. Die einzige Region in Sec2, die diese Anforderung erfüllt ist der erste konservierte Bereich. Zwei weitere Besonderheiten lassen vermuten, dass der konservierte Bereich 1 die Rab-Bindungsstelle und katalytisch aktive Region in der Sec2-Domäne sein könnte: Zum einen bricht die Wahrscheinlichkeit für eine *Coiled-Coil*-Struktur in diesem Abschnitt plötzlich ein (vergleiche Abbildung 20B und Abbildung 20C). Möglicherweise ist die regelmäßige *Coiled-Coil*-Anordnung im konservierten Bereich 1 unterbrochen und erlaubt damit stärkere strukturelle Flexibilität, die zur effektiven Bindung eines Rab-Proteins notwendig sein mag. Zum anderen umfasst der konservierte Bereich 1 ca. 25 Aminosäuren, der unter Berücksichtigung der oben dargelegten Argumentation zur Berechnung der Länge eines *Coiled-Coils* (3.5 Aminosäuren pro Windung, 5.1Å Gangunterschied der Helixwindung) eine Ausdehnung von ca. 36Å hätte, was auffälligerweise sehr exakt dem Durchmesser einer RabGTPase entspräche. Somit hätte dieser Bereich eine ausreichende Größe zur Bindung eines Rab-Proteins, sowie eine auffällige strukturelle Besonderheit durch Abweichung vom optimalen Coiled-Coil-Sequenzmuster. Zwar hat der konservierte Bereich 2 eine ähnliche Länge wie Bereich 1, aber die konservierten Aminosäuren betreffen hauptsächlich die Positionen der Kernreste im Inneren des *Coiled-Coils* (Positionen a und d, vergleiche Abbildung 7). Daher ist es unwahrscheinlicher, dass Bereich 2 die Bindungsstelle für eine RabGTPase bildet.

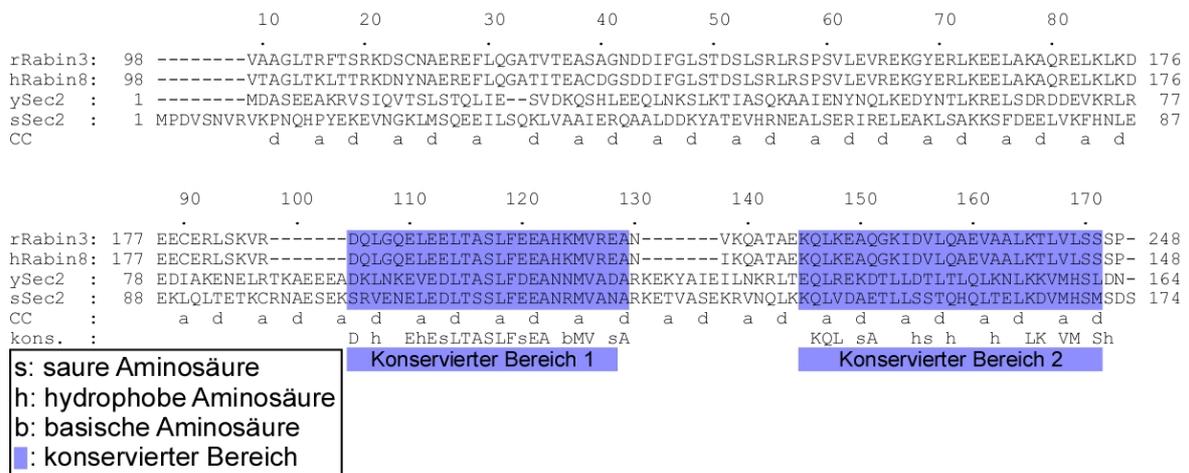


Abbildung 21: Aminosäuresequenzhomologievergleich der Sec2-Domänen verschiedener Organismen. Die Analyse umfasst die Sec2-Domänen der Proteine Sec2 aus *Saccharomyces cerevisiae* (ySec2) und *Schizosaccharomyces pombe* (sSec2), sowie die Sec2-Domänen von Rabin3 aus *Rattus norvegicus* (rRabin3) und Rabin8 aus *Homo sapiens* (hRabin8). Zwei stark konservierte Bereiche sind farblich hervorgehoben, und die konservierten Reste darunter angegeben (kons.). Die vermuteten Positionen der Kernreste des Inneren des *Coiled-Coils* (CC) sind mit der Angabe a und d markiert (Positionsangabe mit Hilfe der Vorhersage durch die Programme PairCoil und MultiCoil^{179,180}). Die Nummerierung der Aminosäurepositionen oberhalb des Sequenzvergleichs bezieht sich auf Sec2 aus *Schizosaccharomyces pombe*.

Zur weiteren strukturellen Charakterisierung der Sec2:Rab-Interaktion mit Hilfe von Kristallisation sollten auf Grundlage der geschilderten Sequenzanalyse wesentlich verkürzte Konstrukte der Sec2-Domäne hergestellt werden, die in jedem Fall den konservierten Bereich 1 umfassen. Dabei muss sicherlich noch ein gewisser N- und C-terminaler

ERGEBNISSE

Überhang, folgend auf den konservierten Bereich, berücksichtigt werden, damit eine *Coiled-Coil*-Bildung sichergestellt werden kann. Solche kompakteren Sec2-Konstrukte verhalten sich, strukturelle Integrität vorausgesetzt, wahrscheinlich wesentlich günstiger in der Kristallisation als die vollständige, stark in eine Richtung ausgedehnte Sec2-Domäne. Diese Annahmen und Vermutungen haben selbstverständlich nur Gültigkeit, sofern Sec2 tatsächlich ein paralleles, homodimeres *Coiled-Coil* ausbildet, da eine monomere, antiparallele Konformation nicht nur aus dem konservierten Bereich 1 bestehen könnte, sondern noch weitere Teile des Proteins benötigte.

Obwohl die strukturelle Charakterisierung der Sec2:Rab-Interaktion bis zum jetzigen Zeitpunkt erfolglos war, könnten die aufgeführten Modifikationen der Konstrukte in der Zukunft zum Erfolg führen.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die kinetische Charakterisierung der Sec2:Rab-Interaktion, und diese wird nachfolgend für das System aus Sec2₁₋₁₆₅ und Sec4₁₉₋₁₈₆ dargelegt.

3.2.3. Kinetische Untersuchung des Systems aus Sec2, Sec4 und Nukleotiden

3.2.3.1. Interaktion von Sec4 mit Guaninnukleotiden

Die Interaktion von Sec4 mit Nukleotiden wurde mit Methoden untersucht, die bereits für die Analyse des MSS4:Rab8:GDP-System angewendet worden sind. Obwohl Sec4 zwei Tryptophane besitzt, konnte keine nutzbare Fluoreszenzänderung zur Detektion der Bindung von Guaninnukleotiden an nukleotidfreies Sec4 gefunden werden. Diese Beobachtung ist insbesondere überraschend, da sich die Tryptophane in der Sec4-Struktur in exakt der gleichen Position befinden wie bei Ypt51, welches eine detektierbare und nutzbare Signaländerung der Tryptophanfluoreszenz bei Bindung von Nukleotiden zeigt⁹⁰. Jedoch verhielt sich nukleotidfreies Sec4 wesentlich instabiler als andere guaninnukleotidbindende Proteine, und es ist daher wahrscheinlich, dass nur ein kleiner Teil des Proteins zur Nukleotidbindung in der Lage war und damit jegliches potentielles Signal stark verringert wurde. Aufgrund des Fehlens eines nutzbaren intrinsischen Signals wurde von den fluoreszenzmarkierten Nukleotiden MantGDP, MantGTP und dem MantGTP-Analog MantGppNHp Gebrauch gemacht (vgl. Abschnitt 3.1.4). Die Assoziation der fluoreszenten Nukleotide gab ein verwendbares Signal aus dem Förster-Resonanz-Energietransfer von Tryptophan auf die Mant-Gruppe. Die Abhängigkeit der beobachteten Geschwindigkeitskonstanten k_{obs} der Assoziation von der Konzentration an MantGDP und MantGTP ließ die Berechnung der Assoziationsgeschwindigkeitskonstanten k_{+1} zu und beträgt $1.1 \cdot 10^6 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ für MantGDP und $2.6 \cdot 10^6 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ für MantGTP (siehe Abbildung 22A). Diese Werte liegen im Bereich anderer Ras-ähnlicher GTPasen und lassen damit den Schluss zu, dass die

Bestimmung des kinetischen Parameters trotz der beschriebenen Instabilität nukleotidfreien Sec4s möglich ist.

Für die Untersuchung der Dissoziationskinetiken von Nukleotiden aus dem Sec4:MantGXP-Komplex muss aufgrund der erwarteten geringen Geschwindigkeit der Dissoziation das nicht-hydrolysierbare Derivat MantGppNHp an Stelle von MantGTP eingesetzt werden, da ansonsten die Hydrolyseaktivität von Sec4 und die Dissoziation des Nukleotids überlappen und zu nicht unterscheidbaren Signaländerungen führen würden. Das gebundene MantGXP wird durch Zugabe von überschüssigem, nicht-fluoreszenten GDP aus dem Sec4:MantGXP-Komplex verdrängt und die direkte Fluoreszenzänderung durch Freisetzung der Mant-Gruppe gemessen (siehe Abbildung 22B). Nicht-lineare Kurvenanpassung an das zeitabhängige Fluoreszenzsignal mit einer exponentiellen Funktion ergibt die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten k_{-1} , $6.3 \cdot 10^{-4} \text{s}^{-1}$ für MantGDP und $5.5 \cdot 10^{-4} \text{s}^{-1}$ für MantGppNHp. Diese Werte von k_{-1} liegen im gleichen Bereich wie für Rab8 ($k_{-1}=7.2 \cdot 10^{-4} \text{s}^{-1}$), sind aber wesentlich schneller als für die meisten Proteine der Familie Ras-ähnlicher GTPasen (z.B. $1.8 \cdot 10^{-5} \text{s}^{-1}$ für Ras¹¹⁹, $2.3 \cdot 10^{-5} \text{s}^{-1}$ für Ran⁹⁵, $6 \cdot 10^{-5} \text{s}^{-1}$ für Ypt1⁹⁰, $8 \cdot 10^{-5} \text{s}^{-1}$ für Rab7³⁹).

Die Bestimmung der Assoziations- und Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten (k_{+1} und k_{-1}) erlaubt die Berechnung der Dissoziationskonstanten des Gleichgewichtes K_{D1} über den Quotienten k_{-1}/k_{+1} ($K_{D1}=0.6 \text{nM}$). Diese Bindung ist schwächer als für andere Ras-ähnliche GTPasen, liegt aber in der Größenordnung der Dissoziationskonstanten von Rab8 ($K_{D1}=0.1 \text{nM}$).

3.2.3.2. Gleichgewichtskonstanten durch Sec4, Sec2, GDP Titration

Mit Hilfe der berechneten Affinität von mantGDP für nukleotidfreies Sec4 ist es möglich, die fehlenden Konstanten K_{D2} , K_{D3} und K_{D4} des Interaktionschemas zwischen Sec4, Nukleotid und Sec2 unter Durchführung einer Gleichgewichtstitration zu erhalten (vergleiche Abbildung 10). Dafür wurde Sec2 zu einer Lösung mit äquimolaren Konzentrationen an Sec4 und mantGDP titriert und die Fluoreszenzintensität gemessen. Das gemessene Signal ergibt sich aus der Freisetzung von MantGDP aus dem Sec4:MantGDP-Komplex. Die Konzentration an Sec4:MantGDP muss dabei so hoch gewählt sein, dass selbst bei hohen Konzentrationen von Sec2 keine vollständige Freisetzung von MantGDP stattfinden kann. Nach Erreichen hoher Sec2-Konzentration und Sättigung des Fluoreszenzsignals wird durch Zugabe eines Überschusses an unmarkiertem GDP das übrige noch gebundene MantGDP verdrängt. Diese Prozedur lässt eine Abschätzung der Fluoreszenzausbeuten von Sec4:MantGDP:Sec2 und freiem MantGDP bei bekannter Konzentration der Moleküle zu. Mit diesen Werten als Fixpunkt und dem K_D -Wert für die Interaktion von MantGDP mit Sec4 können die Titrationsdaten durch nicht-lineare Kurvenanpassung unter Verwendung der Gleichgewichtsbedingungen für K_{D2} , K_{D3} und K_{D4} und der initialen Fluoreszenzausbeute (die Fluoreszenzausbeute des Sec4:MantGDP-Komplexes) angepasst werden.

ERGEBNISSE

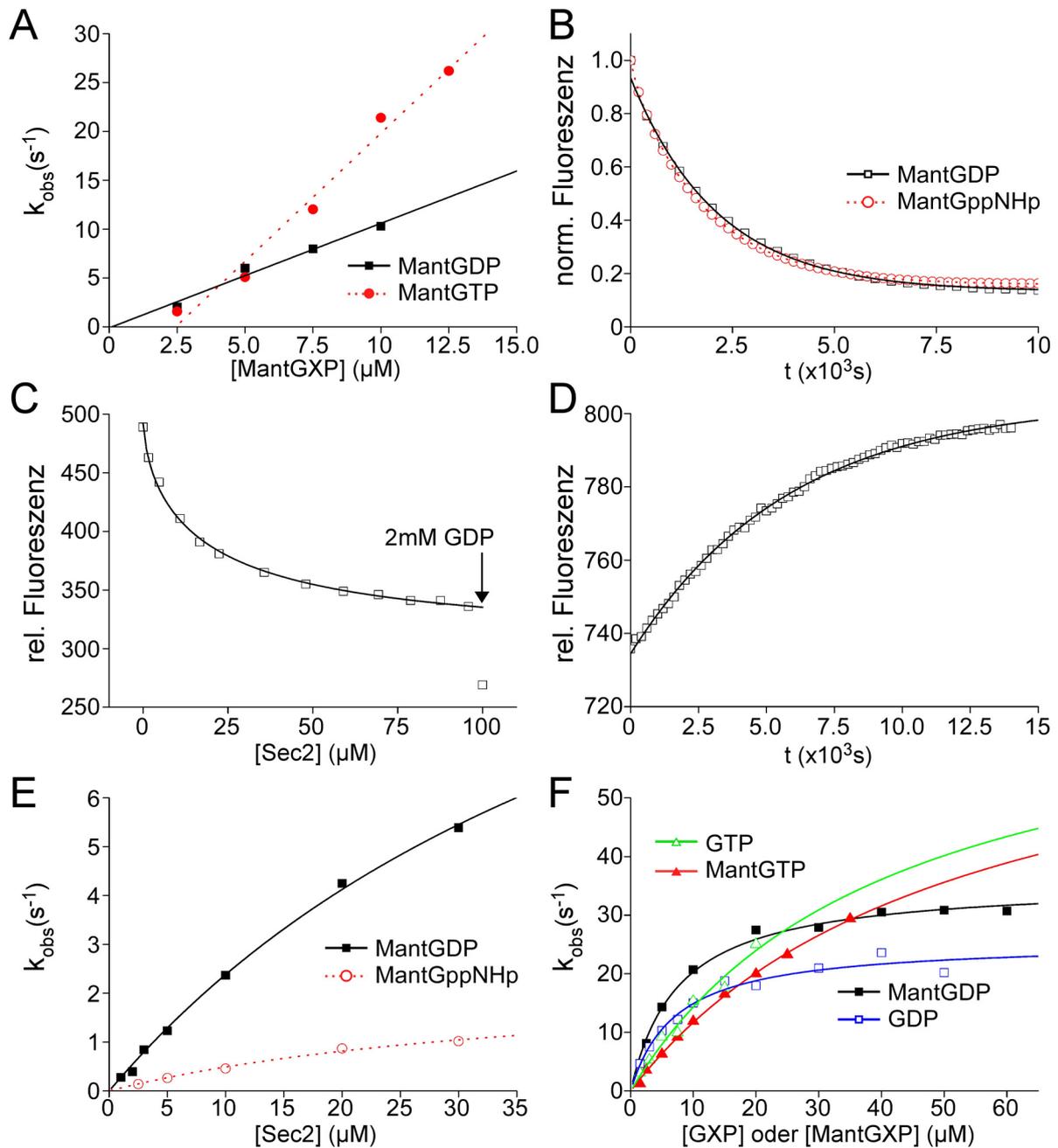


Abbildung 22: Kinetische Untersuchung der Wechselwirkungen zwischen Sec2, Sec4 und verschiedenen Nucleotiden. **(A)** Assoziationskinetik von nukleotidfreiem Sec4 (0.5µM) mit steigenden Konzentrationen an MantGDP und MantGTP, beobachtet mit der *Stopped-Flow*-Technik (Signal: FRET von Tryptophan auf die Mant-Gruppe beobachtet (Anregung 290nm, Emission 420nm)). Die Steigung der Ausgleichsgeraden ergibt die Assoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{+1} . **(B)** Dissoziationskinetik von Mant-Nucleotiden aus dem Sec4:MantGXP-Komplex (200nM) nach Zugabe eines Überschusses an unmarkiertem Nucleotid (1mM) (verwendetes Signal: FRET-Signal von Tryptophan auf die Mant-Gruppe, Anregung 290nm, Emission 450nm). Anpassung der Messwerte an eine einfach exponentielle Funktion ergibt die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{-1} . **(C)** Endpunkttitration von Sec4:MantGDP (5µM) mit steigender Konzentration an Sec2 und einer finalen Zugabe von GDP (2mM) zur vollständigen Verdrängung und Freisetzung von MantGDP aus Sec4 und dem Sec4:Sec2-Komplex. (Signal: Mant-Fluoreszenz, Anregung 348nm, Emission 450nm). Zu Details siehe Abschnitt 6.4.2. **(D)** Bestimmung der Sec2-Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{-2} aus dem Sec2:Sec4-Komplex (100nM) durch Verdrängung mit Dansyl-MSS4 (0.8µM) (Signal: FRET Tryptophan auf Dansyl, Anregung 280nm, Emission 490nm). **(E)** Sec2-katalysierter Nucleotidaustausch an Sec4:MantGXP (0.2µM) bei steigenden Sec2-Konzentrationen, beobachtet durch Fluoreszenzänderung der Mant-Gruppe (Anregung 348nm, Emission 400nm *cut-off*-Filter) mit der *Stopped-Flow*-Technik. Die hyperbolische Abhängigkeit von k_{obs} von der Sec2-Konzentration lässt die Berechnung von K_3 und k_{-4} zu. **(F)** Assoziationskinetik des nukleotidfreien Sec2:Sec4-Komplexes (0.4µM) mit Nucleotiden und Mant-Nucleotiden, beobachtet mit Tryptophanfluoreszenz- bzw. FRET-Signaländerung im *Stopped-Flow*-Verfahren. Hyperbolische Kurvenanpassung (k_{obs} gegen Nucleotidkonzentration) ergibt K_4 und k_{+4} .

Diese Anpassung der gemessenen Werte an das zugrunde gelegte Model ergibt folgende Gleichgewichtskonstanten (siehe Abbildung 22C): Sec2 interagiert mit nukleotidfreiem Sec4 mit einer Affinität von $K_{D2}=9.2\text{nM}$. Die Dissoziationskonstante K_{D3} für die Bindung von Sec2 an Sec4:MantGDP beträgt $70\mu\text{M}$, der nukleotidfreie Sec2:Sec4-Komplex hingegen bindet MantGDP mit $K_{D4}=5\mu\text{M}$. Diese Werte zeigen, dass die Affinität von MantGDP im ternären Sec4:MantGDP-Sec2-Komplex um einen Faktor 10^4 (K_{D4}/K_{D1} oder K_{D3}/K_{D2}) gegenüber dem binären Sec4:MantGDP-Komplex verringert ist. Die korrespondierenden Werte für andere GEFs sind $3 \cdot 10^5$ für Ran:RCC1⁹², 10^5 für Ras:Cdc25¹⁹¹, 10^3 für Ypt51:Vps9⁹⁰ und 10^4 für MSS4 (siehe oben).

3.2.3.3. Kinetik der Sec2:Sec4-Interaktion

Bei der Interaktion von Sec2 mit nukleotidfreiem Sec4 konnte kein verwendbares Signal zur Bestimmung der Gleichgewichtskonstanten oder der Assoziationsgeschwindigkeitskonstanten identifiziert werden. Auch hierfür ist der Grund wahrscheinlich die geringe Stabilität von nukleotidfreiem Sec4. Weiterhin enthält das Fragment von Sec2₁₋₁₆₅ keine Tryptophane und kann daher selbst keine messbare Fluoreszenzänderung bewirken. Die Markierung einer der Komponenten mit einer fluoreszenten Dansylgruppe konnte für Sec2₁₋₁₆₅ und Sec4 nicht angewendet werden, da Sec2₁₋₁₆₅ keine Cystein zur kovalenten Modifikation durch Dansyl besitzt und das einzige Cystein in dem verwendeten Sec4-Konstrukt im Inneren der Nukleotidbindungstasche verborgen und damit nicht verwendbar ist. Ausgenutzt werden konnte jedoch das für die Charakterisierung der MSS4:Rab8-Interaktion produzierte Dansyl-MSS4: Als humanes Homolog zu DSS4 kann MSS4 mit Sec4 interagieren¹⁴⁵. Daher wurde ein Überschuss an Dansyl-MSS4 eingesetzt, um Sec2 aus seinem Komplex mit Sec4 zu verdrängen (siehe Abbildung 22D). Als Signal wurde der Förster-Resonanz-Energietransfer von Tryptophan auf die Dansylgruppe von MSS4 gemessen und dieses anschließend an eine exponentielle Funktion erster Ordnung angepasst, um die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante k_2 von Sec2 aus dem Sec2:Sec4-Komplex zu berechnen. Die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante k_2 beträgt demnach $1.7 \cdot 10^{-4}\text{s}^{-1}$. Zusammen mit der zuvor berechneten Dissoziationskonstante ($K_{D2}=9.2\text{nM}$) des Gleichgewichts lässt sich die Assoziationsgeschwindigkeitskonstante zu $k_{+2}=1.8 \cdot 10^4\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ errechnen. Dieser relativ geringe Wert lässt vermuten, dass der Bindungsmechanismus zwischen Sec2 und Sec4 eine beträchtliche strukturelle Reorganisation für mindestens eine der Komponenten enthält. Diese Überlegung befindet sich in Übereinstimmung mit den strukturellen Veränderungen in anderen GTPase:GEF-Komplexen, für die strukturelle Daten zu Verfügung stehen.

3.2.3.4. Nukleotidverdrängung von Sec4 durch Sec2

Die Fähigkeit von Sec2, Guaninnukleotide aus dem Komplex mit Sec4 zu verdrängen, wurde mit Hilfe der *Stopped-Flow*-Technik untersucht. Dafür wurde ein 1:1-Komplex aus Sec4 mit MantGDP oder MantGppNHp vorgelegt und die Verdrängung des Nukleotids mit variierenden Konzentrationen von Sec2 zeitabhängig gemessen (siehe Abbildung 22E). Als Signal diente die Fluoreszenzabnahme der Mant-Gruppe bei Freisetzung von MantGDP oder MantGppNHp aus dem GTPase:Nukleotid-Komplex. Der Graph der beobachteten Geschwindigkeitskonstanten k_{obs} aufgetragen gegen die Sec2-Konzentration hat keine lineare Kurvenform, sondern zeigt eine hyperbole Abhängigkeit. Die individuellen Kurven der Fluoreszenzänderung bei der jeweiligen Sec2-Konzentration zeigten am Anfang keine schnellere Änderung, was auf eine unterschiedliche Fluoreszenzausbeute des ternären Komplexes gegenüber dem Sec4:MantGDP-Komplex hingedeutet hätte (wie z.B. beobachtet für die Interaktion von RCC1 mit Ran:MantGDP⁹²). Diese Beobachtung rechtfertigt die im Falle der Gleichgewichtstitration von Sec2 mit dem Sec4:MantGDP gemachte Annahme, dass der Sec4:MantGDP:Sec2-Komplex die gleiche Fluoreszenzausbeute hat wie der Sec4:MantGDP-Komplex (siehe Abschnitt 3.1.4).

Der hyperbole Kurvenverlauf der Auftragung der beobachteten Geschwindigkeitskonstanten gegen die Sec2-Konzentration deutet auf einen Zwei-Schritt-Mechanismus in dieser Reaktion hin. Im ersten Schritt bindet Sec2 an Sec4:MantGXP und bildet einen ternären Komplex mit relativ geringer Affinität (Dissoziationskonstante des Gleichgewichtes K_{D3}). Im zweiten, geschwindigkeitsbestimmenden Schritt wird das Nukleotid mit der Geschwindigkeitskonstante k_4 verdrängt und es bildet sich der binäre Protein:Protein-Komplex. Unter Zugrundelegung dieses Modell lassen sich die Dissoziationskonstante K_{D3} zu $50\mu\text{M}$ und k_4 zu 15s^{-1} für MantGDP und 2.5s^{-1} für MantGppNHp bestimmen. Aufgrund des begrenzten verfügbaren Konzentrationsbereiches für Sec2 ist die Extrapolation der Kurven allerdings problematisch und damit die exakte Bestimmung der Parameter K_{D3} und k_4 nicht möglich. Dennoch geben die Werte auf jeden Fall die Größenordnung an, in welcher diese Reaktion abläuft.

Im Fall von MantGDP liegt die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten von Sec2 im Bereich der Austauschgeschwindigkeit von RCC1⁹² und ist damit um mehrere Größenordnungen schneller als andere bisher untersuchte Rab:GEF-Komplexe.

Die bestimmte Dissoziationskonstante K_{D3} ($50\mu\text{M}$) stimmt sehr gut mit dem Wert überein, der aus der Analyse der Gleichgewichtstitration unabhängig ermittelt wurde ($70\mu\text{M}$). Allerdings zeigen diese Werte eine relativ schwache Affinität von Sec2 für Sec4:MantGDP an und begrenzen daher die katalytische Effizienz k_{kat}/K_{D3} von Sec2 auf $3 \cdot 10^5$.

3.2.3.5. Assoziation des Sec2:Sec4-Komplexes mit Nukleotiden

Im Gegensatz zu der Situation der Wechselwirkung unmarkierter Nukleotide mit nukleotidfreiem Sec4 konnte für die Interaktion von GDP und GTP mit dem Sec4:Sec2-Komplex eine Signaländerung der intrinsischen Tryptophanfluoreszenz bei Bindung der Komponenten ausgemacht werden. Die Abhängigkeit der beobachteten Geschwindigkeitskonstanten k_{obs} von der Nukleotidkonzentration weist ein hyperboles Verhalten auf (siehe Abbildung 22F), wiederum auf einen Zwei-Schritt-Mechanismus der Reaktion hindeutend und lassen die Berechnung der Parameter K'_{D4} und k'_{+4} zu. Zusätzlich zu den unmarkierten Nukleotiden wurde die Bindung von MantGDP, MantGTP und der 2'-Desoxy-Form von MantGDP (MantdGDP) untersucht. Die Resultate der Anpassung der erhaltenen Werte an ein hyperboles Modell liefern K'_{D4} und k_{+4} und sind in Tabelle 5 zusammengefasst.

Tabelle 5: Zusammenfassung der berechneten kinetischen Parameter der Interaktion angegebener Nukleotide mit dem Sec2:Sec4-Komplex. Die Werte ergeben sich aus der hyperbolen Kurvenanpassung (sofern nicht anders angegeben) der *Stopped-Flow*-Messungen von Nukleotiden mit dem Sec2:Sec4-Komplex. Aufgeführt sind die Affinitätskonstante K'_4 des schwachen initialen Sec4:GXP:Sec2-Komplexes, der Kehrwert als Dissoziationskonstante K'_{D4} , die Geschwindigkeitskonstante k'_{+4} des Konformationsumwandlung des ternären Komplexes. Daraus wird die effektive Assoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{+4} aus dem Produkt von K'_4 und k'_{+4} berechnet. Der Quotient aus Assoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{+4} und Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten k_{-4} (bestimmt aus der Sec2-katalysierten Nukleotidfreisetzung aus dem Sec4:MantGXP-Komplex) ergibt die Affinität K_4 des Sec2:Sec4-Komplexes zu den entsprechenden Nukleotiden, bzw. die Dissoziationskonstante K_{D4} als ihren Kehrwert. (+:Werte wurden von dem entsprechenden MantGDP oder MantGTP Experiment übernommen; *: Werte stammen aus dem Experiment der Nukleotidfreisetzung durch Sec2; n.b.: Werte wurden nicht bestimmt)

	K'_4 (M^{-1})	K'_{D4} (μM)	k'_{+4} (s^{-1})	k_{+4} ($M^{-1}s^{-1}$)	k_{-4b} (s^{-1})	K_4 (M^{-1})	K_{D4} (μM)
GDP	$14.1 \cdot 10^4$	7.1	25.5	$3.6 \cdot 10^6$	15.3 ⁺	$2.4 \cdot 10^5$	4.2
GTP	$2.4 \cdot 10^4$	41.7	73.0	$1.8 \cdot 10^6$	2.4 ⁺	$7.5 \cdot 10^5$	1.3
MantGDP	$13.2 \cdot 10^4$	7.6	35.7	$4.7 \cdot 10^6$	15.3 [*]	$3.1 \cdot 10^5$	3.2
MantdGDP	n.b.	n.b.	n.b.	$1.2 \cdot 10^6$	3.7	$3.2 \cdot 10^5$	3.1
MantGTP	$1.9 \cdot 10^4$	52.6	72.7	$1.4 \cdot 10^6$	2.4 [*]	$5.8 \cdot 10^5$	1.7

Die erhaltenen Ergebnisse können als ein Reaktionsverlauf interpretiert werden, in dem zunächst ein ternärer Komplex gebildet wird, der nachfolgend in Sec4:GXP und Sec2 zerfällt. Dabei findet die Fluoreszenzänderung im zweiten Schritt statt. Dieser Schritt stellt wahrscheinlich eine geschwindigkeitsbestimmende Konformationsänderung des Komplexes dar, die einen schwach gebundenen, schnell zerfallenden ternären Komplex generiert.

Die Ergebnisse der kinetischen Analyse der Interaktion zwischen den Komponenten Sec4, Sec2 und verschiedenen Nukleotiden ist in Abbildung 23 in Form einer Übersicht dargestellt.

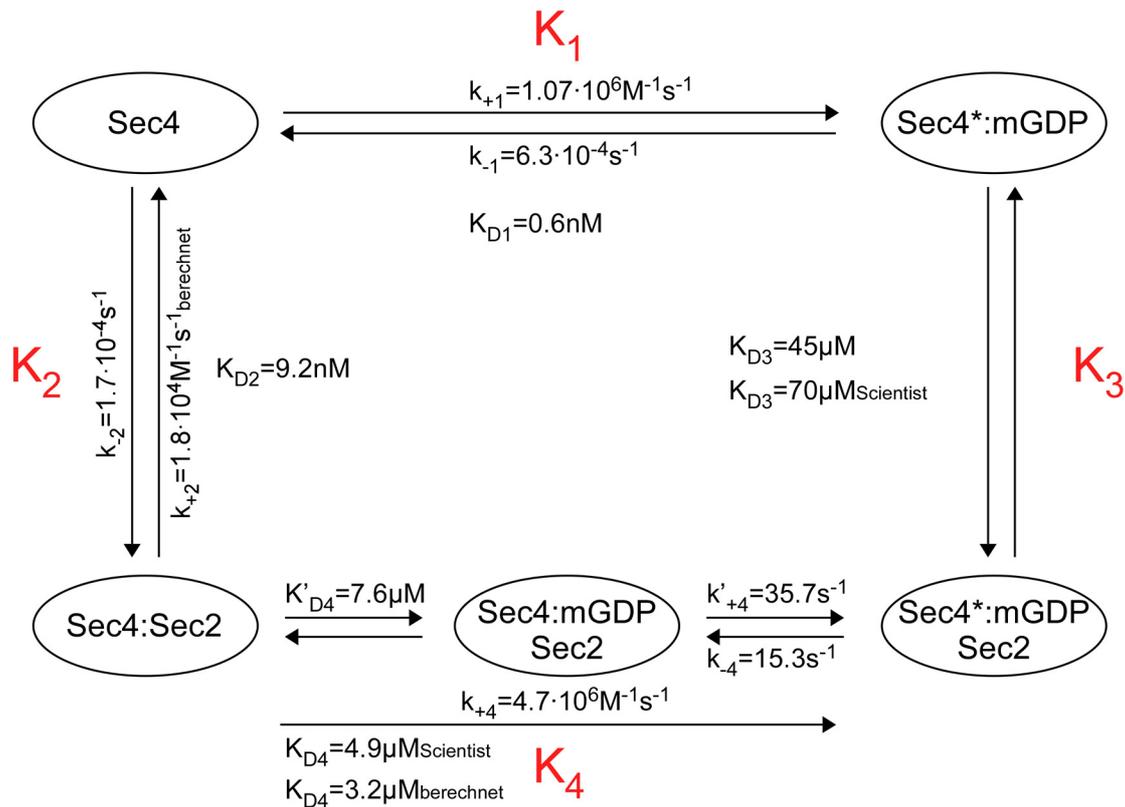


Abbildung 23: Schematische Zusammenfassung der Interaktionen zwischen Sec4, Sec2 und unterschiedlichen Nukleotiden mit den kinetischen Parametern. K_D bezeichnet die Dissoziationskonstante des entsprechenden Gleichgewichts, wogegen K_D' sich auf schwache Vorgleichgewichte bezieht. Assoziations- und Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten werden durch k_{+x} bzw. k_{-x} angezeigt. Im Fall der Assoziationsreaktion von nukleotidfreiem Sec4 mit Nukleotiden und nukleotidfreiem Sec4:Sec2-Komplex mit Nukleotiden wurde eine effektive Assoziationsgeschwindigkeitskonstante bei niedriger Nukleotidkonzentration ($c(\text{GXP}) \gg K_D$) durch Multiplikation von $1/K_D'$ mit der maximalen Rate der Assoziation k'_{+x} berechnet. Der Stern (*) markiert einen anderen Zustand des Sec4-Moleküls, vermutlich eine unterschiedliche Konformation.

3.2.3.6. Interpretation der kinetischen Daten der Sec2:Sec4-Interaktion

Die erhaltenen Ergebnisse sollen im Hinblick auf eine erweiterte Version des Schemas in Abbildung 10, analog zum Interaktionsschema von Rab8:Nukleotid:MSS4, erklärt werden, bzw. wie in Abbildung 23 zusammengefasst werden. Dieses umfasst die Isomerisierung des ternären Sec4:Nukleotid:Sec2-Komplexes aus den bereits im Falle von MSS4:Rab8 diskutierten Gründen und von früher berichteten Untersuchungen⁹⁰. Einer der Gründe für die Einbeziehung eines solchen Schritts in früheren Arbeiten war die Beobachtung, dass Nukleotide an nukleotidfreie GTPasen mit einem Zwei-Schritt-Mechanismus binden¹¹⁹. Daher ist es wahrscheinlich, dass derselbe Bindungsmechanismus für die Bindung von Nukleotiden an den binären GTPase:GEF-Komplex stattfindet. In der vorliegenden Arbeit war, wie bereits beschrieben, die Stabilität von nukleotid- und GEF-freiem Sec4 zu gering gewesen und erlaubte die detaillierte Analyse von Nukleotidassoziationskinetiken nicht, sodass es nicht möglich war, die Untersuchungen unter hohen, sättigenden Konzentrationen an Nukleotid durchzuführen. Dennoch kann als sicher geltend angenommen werden, dass die gemessene Assoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{+1} eigentlich aus einem schwachen Vergleich-

gewicht und einer langsamen Isomerisierungsreaktion ($K'_1 \cdot k'_{+1}$) zusammengesetzt ist, wie für andere Ras-ähnliche GTPasen beschrieben¹¹⁹.

In den Experimenten, die eine detaillierte Messung erlaubten, wurde eine maximale Assoziationsrate von Nukleotiden mit Sec4:Sec2 von $k'_{+4}=35.5\text{s}^{-1}$ gefunden, welche dann wiederum geschwindigkeitsbestimmend für die Dissoziation von Sec2 aus dem ternären Komplex ist. Ein weiterer Grund für die Berücksichtigung eines zusätzlichen intermediären ternären Komplexes ist, dass die Anwendung der gemessenen Konstanten an das einfachste Modell (vergleiche Abbildung 10) ein kinetisches Problem mit sich bringen würde: Die Dissoziationskonstante K_{D3} des ternären Komplexes wurde im Titrationsexperiment zu $70\mu\text{M}$ bestimmt. Die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{-3} dieser Reaktion würde dann durch die Isomerisierungsrate k'_{+4} der Bildung des ternären Komplexes aus Sec2:Sec4 und den Nukleotiden ausgedrückt werden und wäre somit 35.5s^{-1} ($=k_{-3}$). Eine Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante $k_{-3}=35\text{s}^{-1}$ würde aber nicht einem Ein-Schritt-Bindungsmechanismus entsprechen, da dieser Mechanismus eine diffusionskontrollierte Bildung des Komplexes aus Sec2 und Sec4:GDP mit einer Geschwindigkeit von ca. $10^8\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ voraussetzen müsste. Die gemessene Dissoziationskonstante $K_{D3}=70\mu\text{M}$ würde mit dieser Assoziationsgeschwindigkeitskonstante von $10^8\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ eine Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante von $k_{-3}=10^3\text{s}^{-1}$ bis 10^4s^{-1} ($k_{-3}=k_{-3} \cdot K_{D3}$) erfordern, um die geringe Affinität von Sec2 für Sec4:GDP erklären zu können. Diese Überlegung steht im Widerspruch zu der berechneten Konstanten k_{-3} von 35.5s^{-1} , womit die Annahme eines intermediären ternären Komplexes, der bei Bindung von Sec2 and Sec4:GDP eine Isomerisierung eingeht, gerechtfertigt wird. Ähnliche Argumente gelten bei Betrachtung der Bindung von Nukleotid an den binären Sec2:Sec4-Komplex.

Die Konsistenz des Modells bestehend aus den Gleichgewichtskonstanten K_1 , K_2 , K_3 und K_4 (siehe Abbildung 23) kann theoretisch einer Prüfung unterzogen werden, da, wie bereits in Abschnitt 3.1.3 beschrieben, aus thermodynamischen Erfordernissen das Produkt aus K_1 und K_3 gleich dem Produkt aus K_2 und K_4 sein muss. Da diese Beziehung für die Ermittlung von K_2 , K_3 und K_4 im Titrationsexperiment für die Anpassung der Daten an das zugrunde gelegte Modell angewendet worden ist, können diese Parameter nicht zur Überprüfung des Modells erhalten. Allerdings stimmen die Werte der Parameter K_{D3} und K_{D4} aus den kinetischen Untersuchungen gut mit den ermittelten Werten aus der Gleichgewichtstitration überein. Tatsächlich ist der Unterschied für K_{D3} aus der Gleichgewichtsanalyse ($70\mu\text{M}$) nur marginal unterschiedlich zum Ergebnis des kinetischen Experiments ($50\mu\text{M}$). Für die Dissoziationskonstante K_{D4} beträgt die Diskrepanz einen Faktor zwei ($4.9\mu\text{M}$ aus der Titration, $2.3\mu\text{M}$ aus den transienten Kinetiken), kann aber aufgrund der völlig unterschiedlichen experimentellen Ansätze und der möglichen Akkumulation verschiedener Messfehler in den individuellen Konstanten als befriedigend angesehen werden. Das

ERGEBNISSE

beschriebene Sec4:Sec2:Nukleotid-Interaktionsschema (siehe Abbildung 23) kann daher in sich konsistent angesehen werden.

In den vorangegangenen Abschnitten sind strukturelle und kinetische Charakterisierungen des Nukleotidaustauschs der Proteine MSS4 und Sec2 an den RabGTPasen Rab8 und Sec4 dargelegt worden. Diese im Detail untersuchten Systeme lassen verschiedene Schlüsse auf die physiologische Funktion der Proteine zu. Der Vergleich der kinetischen Parameter untereinander und mit anderen bekannten Nukleotidaustauschfaktoren kleiner GTPasen ermöglichen mechanistische und funktionelle Aussagen über die Rolle von MSS4 und Sec2. In der abschließenden Diskussion werden im folgenden Abschnitt die ermittelten Parameter der GEFs vergleichend gegenübergestellt.

4. DISKUSSION

4.1. Vergleich der kinetischen Parameter von Sec2 und MSS4 mit anderen GEFs

Verglichen zu anderen bisher charakterisierten GEFs von Rab-Proteinen ist Sec2 ein hoch effizienter Austauschfaktor. Die katalytische Effizienz (k_4/K_{D3}) eines Austauschfaktors entspricht im Prinzip der Geschwindigkeitskonstanten für eine Reaktion zweiter Ordnung, die multipliziert mit der GEF-Konzentration die Geschwindigkeit der GDP-Freisetzung aus dem GTPase:GDP-Komplex angibt. Die katalytische Effizienz k_4/K_{D3} (analog zu k_{kat}/K_M in der Formulierung der Michaelis-Menten-Kinetik) kann niemals größer sein als die Assoziationsgeschwindigkeitskonstante der Bindung von GEF an den GTPase:GDP-Komplex. Da die Obergrenze für die Geschwindigkeitskonstante einer bimolekularen Assoziationsreaktion durch Diffusion der Reaktionspartner begrenzt ist, kann die katalytische Effizienz einen Wert von $10^8 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ nicht überschreiten⁹⁹. Enzyme mit dieser Effizienz können als katalytisch perfekt angesehen werden, weil sie ihre theoretische Grenze erreicht haben; die gleichen Überlegungen gelten für GEFs.

Die Werte katalytischer Effizienzen k_4/K_{D3} bisher quantitativ analysierter GEFs variieren über einen weiten Bereich (siehe Tabelle 1). Am unteren Ende dieser Skala befinden sich mit geringer Aktivität die GEFs Vps9 ($k_4/K_{D3}=5.2 \cdot 10^2 \text{M}^{-1} \text{s}^{-190}$), DSS4 ($k_4/K_{D3}=6.6 \cdot 10^2 \text{M}^{-1} \text{s}^{-190}$), Tiam ($k_4/K_{D3}=6.2 \cdot 10^2 \text{M}^{-1} \text{s}^{-197}$) und MSS4 ($k_4/K_{D3}=7 \cdot 10^2 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ für Rab3a⁷⁰ und $k_4/K_{D3}=9 \cdot 10^3 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ für Rab8). Der GEF MSS4 ist damit von geringer katalytischer Effizienz, aber auch Cdc25 katalysiert an Ras den Nukleotidaustausch mit ähnlichen kinetischen Parametern ($k_4/K_{D3}=4 \cdot 10^4 \text{M}^{-1} \text{s}^{-193}$). Der Austauschfaktor Sec2 ist dagegen zur Katalyse des Nukleotidaustauschs an Sec4 wesentlich befähigter ($k_4/K_{D3}=2.1 \cdot 10^6 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$), erreicht aber dennoch nicht so hohe Werte wie RCC1 für Ran ($k_4/K_{D3}=4 \cdot 10^7 \text{M}^{-1} \text{s}^{-192,95}$) und Ef-Ts für Ef-Tu ($k_4/K_{D3}=3 \cdot 10^7 \text{M}^{-1} \text{s}^{-191,94}$), die nahezu die theoretische Obergrenze erreichen und beinahe perfekte GEFs sind.

Es ist von Interesse, die gemessenen und berichteten kinetischen und thermodynamischen Parameter zur bekannten zellulären Funktion der unterschiedlichen GEFs in Beziehung zu setzen und eine rationale Erklärung für die Optimierung der entsprechenden Werte auf den regulierten Prozess im Laufe der Evolution zu versuchen. Die beiden Systeme mit der höchsten Effizienz umfassen solche Systeme, in denen sowohl der GEF als auch die entsprechende GTPase in löslicher Form in der Zelle vorliegen (Ef-Tu:Ef-Ts^{192,193}; Ran:RCC1¹⁹⁴). Dieses steht im Gegensatz zu allen anderen aufgeführten Systemen, bei denen ohne Ausnahme eine oder beide Komponenten GEF und/oder GTPase) direkt oder

DISKUSSION

indirekt mit einer biologischen Membran assoziiert ist (Ras:Sos¹⁹⁵; Rac1:Tiam1¹⁹⁶; Arf:Sec7¹⁹⁷; Cdc42:Dbp1^{198,199}). In den Fällen, in denen beide Proteine membranlokalisiert sind, kompensiert die Zunahme der effektiven lokalen Konzentration der Bindungspartner (durch Reduzierung der Freiheitsgrade von drei auf zwei Dimensionen) vollständig oder teilweise die relativ schwache Affinität des GEF für die GTPase. Ein interessanter Vergleich ist hier derjenige zwischen Rab8:MSS4 und Cdc25:Ras, die beide ähnliche katalytische Effizienzen im Nukleotidaustausch besitzen. Indirekte Rekrutierung der Cdc25-Domäne von Sos an die Plasmamembran nach Aktivierung durch das Protein Grb2 führt vermutlich zu einer Konzentration, die im Vergleich zu der Dissoziationskonstanten $K_{D3}=38\mu\text{M}$ relativ hoch ist. Damit erlaubt Cdc25 eine volle Umsetzung seiner Nukleotidaustauschaktivität, bestimmt durch k_4 . Dieser Wert ist wesentlich höher als für Rab8:MSS4 und kann nur durch sehr hohe MSS4-Konzentrationen erreicht werden.

Die Bedeutung hoher K_{D3} -Werte (d.h. geringer Affinitäten) der Austauschfaktoren, die an eine Membran rekrutiert werden, ist, dass Austausch nur dann stattfinden sollte, wenn die Rekrutierung in kontrollierter Weise geschieht, wie beschrieben für das Ras:Sos-System. Im Fall von Sec2 und Sec4 wird Sec2 durch Interaktion mit einem weiteren, aktiven Rab, Ypt32:GTP, an sekretorische Vesikel rekrutiert und kann dort mit Sec4 wechselwirken. Wie für Sos beschrieben ist die Affinität von Sec2 für Sec4:GDP vergleichsweise gering, aber der lokale Konzentrationseffekt durch Membranlokalisierung der Proteine zusammen mit dem hohen Wert für die Nukleotidaustauschrate k_4 führt zu einem effizienten, regulierten Austausch. Dieses steht in gänzlichem Gegensatz zu den beiden effizientesten Systemen Ef-Tu:Ef-Ts und Ran:RCC1 (siehe Tabelle 1), in denen hohe Austauschaktivität sowohl durch einen geringen K_{D3} -Wert (d.h. hohe Affinität) als auch durch einen hohen k_4 -Wert (d.h. hohe Austauschrate) erreicht wird. Diese Systeme sind konstitutiv voll aktiv und müssen aufgrund ihrer zytosolischen Lokalisation ohne zusätzliche Konzentrationseffekte ihre Funktion erfüllen.

Der Grund für das Auftreten von Proteinen (MSS4 und Sec2) mit unterschiedlichen Austauschcharakteristika für Rab-Proteine bleibt unklar. Wie bereits seit längerem Bestandteil der Diskussion könnten MSS4 und DSS4 Proteine sein, die nicht primär von der Natur als GEFs konzipiert worden sind, sondern dass ihre Austauschaktivität ein thermodynamisches Abfallprodukt ihrer eigentlichen Funktion ist. Es wurde vorgeschlagen, dass MSS4 und DSS4 eine Rolle als Chaperon haben könnten und dass möglicherweise die ungewöhnliche kinetische Eigenschaft, Nukleotide nach Bildung des binären MSS4/DSS4:Rab-Komplexes außerordentlich langsam zu binden⁹⁰, diese Proteine mit der Fähigkeit ausstattet, Rab-Proteine für eine relativ lange Dauer im nukleotidfreien Zustand einzufangen. Die geringe Austauschspezifität von MSS4 und DSS4 für individuelle Rab-Proteine könnte diese Funktion reflektieren. Dennoch bleiben die extremen Beispiele Vps9

und Rabex5⁹⁰ bestehen, die geringe Austauschraten k_4 zeigen, sowie dagegen Sec2, welches den Nukleotidaustausch um drei Größenordnungen schneller katalysiert. Vermutlich wurden diese Parameter im Laufe der Evolution auf die distinkte Funktion des jeweiligen GEFs abgestimmt. Daher scheint die schnellstmögliche Freisetzung von GDP, und infolgedessen Ersatz durch GTP, nicht immer die wichtigste Eigenschaft eines GEFs zu sein, obwohl dies vermutlich für Ef-Tu:Ef-Ts und Ran:RCC1 der Fall ist. Stattdessen ist eine mögliche Erklärung für weniger optimale katalytische Effizienzen von entsprechenden GEFs, dass die Geschwindigkeit der GDP-Freisetzung sich zu einem bestimmten Wert entwickelt hat, der mit der zeitlichen Koordinierung von GTPase-regulierten Prozessen in unmittelbarer Beziehung steht.

Bei Vergleichen bekannter molekularer Strukturen^{100,102,104-107,129,132} und MSS4 mit kinetischen Daten^{91-96,200} Ras-ähnlicher GTPasen in Komplex mit ihren Guaninnukleotid-austauschfaktoren fällt eine Korrelation zwischen Kinetik und Struktur auf. Insbesondere solche GEFs weisen eine hohe katalytische Effizienz auf, die den *P-loop* der GTPase direkt über Aminosäurereste kontaktieren und damit seine Konformation in definierter Art und Weise stabilisieren. Ef-Ts kontaktiert die Aminosäuren H19_{Ef-Tu}, V20_{Ef-Tu} und D21_{Ef-Tu} des *P-loop* von Ef-Tu, RCC1 die Aminosäuren G19_{Ran} und G20_{Ran} des *P-loop* von Ran, Sos die Aminosäuren G13_{Ras} und S17_{Ras} des *P-loop* von Ras. In den übrigen Komplexen Rac:Tiam, Arf1:Gea(Sec7), Cdc42:DbpA, Cdc42:Intersectin, Cdc42:SopE und RhoA:DbpA wird SwitchII durch das GEF in seiner Konformation so beeinflusst, dass ein negativer Aminosäurerest des DxxGQE-Motivs das konservierte Lysin des *P-loop* bindet und damit seine Konformation stabilisiert. Jedoch findet keine direkte Interaktion, sondern nur eine vermittelte Interaktion zwischen dem GEF und dem *P-loop* statt. Die Struktur des Komplexes zwischen Sec2 und Sec4 ist bisher unbekannt. Allerdings zeigt Sec2 eine hohe katalytische Effizienz des Nukleotidaustauschs, die im Bereich der Aktivitäten von Ef-Ts, RCC1 und Sos liegt und lässt daher vermuten, dass Sec2 ebenfalls im Nukleotidaustausch direkte Kontakte zum *P-loop* von Sec4 ausbildet. Möglicherweise ist die Koordinierung des *P-loop* durch einen Nukleotidaustauschfaktor eine Notwendigkeit für hohe katalytische Effizienz und hebt damit die Bedeutung optimaler Konformation des *P-loop* für die Nukleotidbindung heraus.

4.2. Physiologische Funktion von MSS4

Es ist in früheren Untersuchungen gezeigt worden, dass MSS4/DSS4 Wachstumsdefekte von Zellen, hervorgerufen durch Aminosäuremutationen der Nukleotidbindungstasche exozytotischer Rabs, unterdrücken kann, oder anders ausgedrückt, die negativen Effekte dieser Aminosäureaustausche teilweise aufhebt^{148,152,201}. Faltung, Lokalisation und Regulation von Rab-Proteinen sind von der Art des gebundenen Nukleotids abhängig. Daher könnte die Aktivität von RabGTPasen mit Defekten in der Nukleotidbindungstasche in der

DISKUSSION

Zelle unkontrolliert sein. Da die Affinität von GEFs für nukleotidfreie GTPasen bekannterweise hoch ist (der K_D der Interaktion liegt im nanomolaren Bereich), könnten durch Aminosäuremutationen entstandene nukleotidfreie GTPasen spezifische GEFs in der Zelle durch stabile Bindung aus dem Rabzyklus absondern und ihn dadurch blockieren, wie bereits für andere Proteine der Ras-Superfamilie vermutet wird^{95,108,202-204}. Der unterdrückende Effekt von Wachstumsdefekten durch MSS4 wird wahrscheinlich durch die Bildung eines stabilen MSS4:Rab-Komplexes erreicht, und verhindert damit den schädlichen Effekt von RabGTPasen mit beeinträchtigtem Nukleotidbindungsverhalten.

In der Vergangenheit ist der Einfluss von DSS4 auf die Lebensfähigkeit von Hefezellen mit Mutationen in den RabGTPasen Sec4 oder Ypt1 untersucht worden. Wie bereits erwähnt ist DSS4/MSS4 nicht essentiell für die Lebensfähigkeit der Organismen¹⁴⁸. Zellen mit der Mutation Sec4-G147D (Sec4-8) sind nicht in der Lage, bei 37°C zu wachsen, können aber durch Überexpression der Mutante DSS4-D108G (DSS4-1, entspricht MSS4-E98G) gerettet werden¹⁴⁸. Die Mutation von Glycin in Position 147 von Sec4 zu Aspartat ändert vermutlich die Konformation der α -Helix α_4 und damit einhergehend die Lage der β_5 - α_4 -Schleife, welche das G4-Motiv (NKxD-Motiv) enthält. Da das G4-Motiv zur Erkennung und Bindung von Guaninnukleotiden von Bedeutung ist, bewirkt die veränderte Lage der β_5 - α_4 -Schleife eine verringerte Affinität der GTPase für GDP und GTP. Damit repräsentiert die Sec4-8-Mutante wahrscheinlich eine partiell nukleotidfreie Form, deren Effekt sich vor allem bei Wachstumsbedingungen mit erhöhter Temperatur auswirkt. DSS4-1, aber nicht die Wildtypform DSS4, kann solche Zellen mit Sec4-8-Mutationen retten, da es vermutlich die Bildung von Proteinaggregaten hervorgerufen durch das instabile, nukleotidfreie Sec4-8 unterbindet. Merkwürdigerweise hat die Überexpression von Wildtyp-DSS4 in Gegenwart von Sec4-8 einen unerwartet negativen Effekt auf die Lebensfähigkeit der Zellen, da der Wachstumsdefekt der Sec4-8-Mutanten nicht mehr nur bei 37°C, sondern nun auch bei 25°C zum Tragen kommt. Aus der MSS4:Rab8-Struktur ist ersichtlich, dass die Seitenkette von Glutamat98 (Aspartat108 in DSS4) eine polare Bindung mit dem in exozytotischen Rabs konservierten Lysin46 eingeht. In der DSS4-1 Mutante ist diese Wechselwirkung nicht vorhanden, da Aspartat108 zu Glycin mutiert ist. Überexpression von DSS4 in den Zellen führt sicherlich nicht nur zur Bindung von Sec4 bzw. Sec4-8, sondern auch zur Bindung und Absonderung von endogenem Ypt1, welches ebenfalls ein Bindungspartner von DSS4 ist. Die E108G-Mutation verringert möglicherweise dadurch die Affinität von DSS4 für Sec4 und Ypt1 und moduliert zwischen den positiven und negativen Effekten der Überexpression, nämlich zwischen der Rettung von nukleotidfreiem Sec4-8 und der Absonderung von endogenem Ypt1 durch überexprimiertes DSS4.

Für andere Sec4-Mutanten ist ein ähnlicher Einfluss gezeigt worden, nur dass die schädlichen Effekte dieser Mutanten durch Überexpression von Wildtyp DSS4, und nicht

DSS4-1, eliminiert werden konnten. Die Mutanten Sec4^{I133} (N133I) und Sec4^{N34} (S34S) liegen bevorzugt in der nukleotidfreien Form vor und üben in Hefezellen eine dominant negative Wirkung aus, resultierend in Letalität von Zellen mit solchen Mutationen¹⁶⁵. Diese Mutationen befinden sich in der Nukleotidbindungstasche von Sec4. In Sec4^{I133} ist die Aminosäure Asparagin133 des G4-Motivs (NKxD-Motiv) zu Isoleucin mutiert, wodurch die Wasserstoffbrückenbindung zwischen Asparagin und dem Sauerstoff in Position 6 der Guaninbase unterbrochen wird. In Sec4^{N34} wird die Magnesiumkoordination durch Mutation des konservierten Serin34 des *P-loops* zu Asparagin gestört und darüber die Affinität zu GDP und GTP gesenkt. Beide Mutationen resultieren in einer GTPase mit bevorzugt nukleotidfreiem Zustand. Im Fall der GTPase Ras stören die zu Sec4^{N34} und Sec4^{I133} homologen Mutationen die normale Ras-Funktion durch Konkurrenz mit GEF-Interaktionen und formen einen stabilen, aber katalytisch inaktiven Ras:GEF-Komplex²⁰⁵. Überexpression eines relevanten GEFs kann die Effekte dieser Blockierung durch feste Komplexierung dieser Mutanten, die wahrscheinlich eine dem Übergangszustand des Nukleotidaustauschs ähnelnde Konformation annehmen, lindern^{203,205-207}. Einen ähnlichen Effekt zeigt DSS4 für die Sec4^{N34} und Sec4^{I133} und kann einen stabilen Komplex mit ihnen bilden, um das Ausmaß der schädlichen Effekte dieser Mutanten zu verringern¹⁵¹. Dagegen kann DSS4-1 die schädlichen Effekte der Ypt1-1 Mutante nicht inhibieren¹⁴⁸. In der Ypt1-1-Mutante ist das essentielle Threonin T40 des G2-Motives in *SwitchI* zu Lysin mutiert, wodurch die Magnesiumkoordination sowie die *SwitchI*-Konformation im GTP-Zustand beeinflusst ist. Im MSS4:Rab8-Komplex bildet MSS4 zu diesem Threonin keine Kontakte aus, sondern das Threonin befindet sich auf der Außenseite von Helix α SI, weswegen die Bindung zu DSS4/DSS4-1 im Falle der Mutation T40K vermutlich unbeeinflusst bleibt. Die Mutante Ypt1-1 kann weiterhin Nukleotide binden und stellt daher keine nukleotidfreie Mutante dar, und ist damit ein weiteres Indiz für die Annahme, dass DSS4/DSS4-1 seine positiven Effekte vorzugsweise auf nukleotidfreie Rab-Proteine auswirkt.

Die Auswirkungen von DSS4 auf Zellen mit Mutationen in Sec4, welche die Eigenschaft der Nukleotidbindung beeinflussen, werfen die Frage auf, ob MSS4/DSS4 tatsächlich ein GEF ist oder ob die Chaperonaktivität für nukleotidfreie Rabs eventuell die primäre Funktion von MSS4/DSS4 ist.

In der MSS4:Rab8-Struktur befindet sich die Rab8-MSS4-Bindungsstelle innerhalb der N-terminalen 58 Aminosäuren von Rab8. Interessanterweise kann MSS4 spezifisch an ein kleines Peptid binden, welches eine konservierte proximale Membranregion von Integrin α 3A (FKCGFFKRART) im Hefehybridsystem bindet²⁰⁸. Diese Region zeigt eine gewisse Sequenzhomologie zum Abschnitt α SI- β 2 in Rab8, der die konservierteste Region in exozytotischen Rabs und Bestandteil der MSS4-Bindungsstelle ist. Möglicherweise ist dieser konservierte Abschnitt zur MSS4 Erkennung ausreichend. Daher könnte die Bindung von

DISKUSSION

MSS4 an exozytotische Rabs bereits stattfinden, bevor das Protein überhaupt vollständig in der Proteinbiosynthese translatiert worden ist. Die MSS4-Bindung an das unfertige Rab stellt dann eventuell einen Ankerpunkt für korrekte Rab-Faltung ohne Nukleotid dar noch ehe die Nukleotidbindungstasche überhaupt synthetisiert und geformt wurde. Somit mag MSS4 der korrekten Faltung nukleotidfreier Rabs assistieren um die Bildung von Aggregaten fehl gefalteter Rab-Proteine zu verhindern. Ein Schwachpunkt dieses Modells ist die evolutionär konservierte Spezialisierung von MSS4 für exozytotische Rabs, die aus keinem bekannten und ersichtlichen Grund gefährdeter für Missfaltung sein sollten als andere Rabs.

Vielleicht werden auf exozytotische Rabs einwirkende Proteine unterschiedlich reguliert, und MSS4/DSS4 sind nur unter bestimmten spezialisierten Bedingungen für eine zelluläre Funktion essentiell, wie z.B. für die Ras-Austauschfaktoren kodiert durch SCD25- und CDC25-Gene berichtet worden ist²⁰⁹. Eine weitere Möglichkeit ist, dass MSS4/DSS4 bei der Koordination des größten Teils des exozytotischen Membranflusses und Transport der Membranlipide behilflich ist.

5. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

RabGTPasen werden durch Bindung von GTP in die Lage versetzt, ihre Funktion im vesikulären Transportprozess durch Interaktion mit Effektorproteinen wahrzunehmen. Zur effizienten und regulierten Aktivierung benötigen sie dazu Guaninnukleotidaustauschfaktoren (GEFs), welche den Nukleotidaustausch von GDP zu GTP um mehrere Größenordnungen im Vergleich zum spontanen Nukleotidersatz beschleunigen. Alle bisher bekannten GEFs kleiner GTPasen katalysieren die Austauschreaktion, indem sie einen nukleotidfreien binären GTPase:GEF-Komplex formieren. In diesem Komplex werden essentielle Aminosäuren für die Nukleotidbindung in optimaler Weise stabilisiert, um entweder GTP zur Aktivierung zu binden oder um mit GDP zu reassoziieren. Physiologisch liegt GTP in zehnfach bis fünfzigfachem Überschuss gegenüber GDP vor, sodass die Bindung eines GEFs an eine GTPase zur Bindung von GTP führt und damit die Aktivierung des Proteins und nachgeschalteter Prozesse einleitet.

In früheren Studien sind die Interaktionen kleiner GTPasen mit den entsprechenden GEFs bereits vielfach Gegenstand struktureller und kinetischer Charakterisierung gewesen, und in vielen Fällen konnten detaillierte Einblicke in den GEF-katalysierten Nukleotidaustauschprozess gewonnen werden. Bisher waren keine Strukturen eines RabGEFs im Komplex mit einem Rab-Protein bekannt. Lediglich die Strukturen der Apo-Formen der RabGEF-Aktivität aufweisenden Proteine MSS4 und Vps9 wurden aufgeklärt. Aufgrund der strukturellen Heterogenität von Guaninnukleotidaustauschfaktoren und der sehr individuellen mechanistischen Umsetzung des Nukleotidaustauschs der verschiedenen strukturell bekannten GEFs ist es aber nicht möglich, die Funktionsweise von RabGEFs im Allgemeinen und von MSS4 und Vps9 im Speziellen abzuleiten.

Grundsätzlich können aber für den GEF-katalysierten Nukleotidaustausch an kleinen GTPasen folgende Gemeinsamkeiten festgehalten werden: Im nukleotidfreien binären GTPase:GEF-Komplex werden essentielle Aminosäuren zur Nukleotidbindung der GTPase in optimaler Weise stabilisiert, es werden definierte Kontakte zum *P-loop* und *SwitchII* der GTPase ausgebildet und die Affinität des Nukleotids für die GTPase durch Störung der Bindung des essentiellen zweiwertigen Magnesiumions erreicht. Allerdings unterscheiden sich die einzelnen GEFs mechanistisch stark im Erreichen dieser Effekte.

Die kinetisch untersuchten RabGEFs sind langsam und katalytisch ineffizient in ihrem Nukleotidaustauschverhalten. Zur Aufklärung der RabGEF-Wirkungsweise wurden die Proteine MSS4 und Sec2 einer umfangreichen kinetischen und strukturellen Charakterisierung unterzogen und die Ergebnisse zur vergleichenden Analyse untereinander und mit anderen Austauschfaktoren herangezogen.

ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Mit Hilfe von Fluoreszenzmethoden konnten kinetische Untersuchungen des Nukleotidaustauschs von MSS4 an der GTPase Rab8 die Ergebnisse früherer Experimente an dem Hefehomolog DSS4 bestätigen: MSS4 ist ein vergleichsweise langsamer und ineffizienter Nukleotidaustauschfaktor; dennoch stimuliert MSS4 den Nukleotidaustausch an Rab8 um einen Faktor 300. Dagegen konnte gezeigt werden, dass die Nukleotidaustauschdomäne von Sec2 (Aminosäuren 1-165) eine schnelle maximale Katalysegeschwindigkeit und effizienten Nukleotidaustausch an der GTPase Sec4 aufweist: Sec2 beschleunigt den Nukleotidaustausch an Sec4 um mehr als vier Größenordnungen.

Die molekulare Struktur des nukleotidfreien MSS4:Rab8-Komplexes wurde im Rahmen dieser Arbeit mittels Röntgenkristallstrukturanalyse bestimmt. Die Komplexstruktur offenbart dramatische Unterschiede in der mechanistischen Umsetzung des Nukleotidaustauschs im Vergleich zu anderen bekannten GTPase:GEF-Komplexen. So bewirkt Bindung von MSS4 eine lokale Entfaltung von Rab8 ausgehend vom *P-loop* bis zum N-terminalen Ende von *SwitchI*, und auch die guaninbindenden Motive G4 und G5 sind in der Kristallstruktur nicht sichtbar, folglich flexibel und entfaltet. Im Gegensatz zu anderen bekannten GTPase:GEF-Komplexen stabilisiert MSS4 die *P-loop*-Konformation nicht, weder direkt (wie z.B. Sos an Ras) noch indirekt (wie z.B. RCC1 an Ran), MSS4 bildet keine Kontakte zu *SwitchII* aus (im starken Gegensatz zu allen anderen GEFs) und besitzt nur eine relativ kleine Kontaktfläche mit Rab8, die sich nahezu vollständig auf *SwitchI* und das Faltblatt $\beta 2$ beschränkt. Auch scheint die Interferenz mit der essentiellen Magnesiumkoordination zwecks Verringerung der Nukleotidaffinität für die GTPase Rab8 nicht der primäre Grund für den Nukleotidaustausch zu sein. Stattdessen ist die lokale Entfaltung der erwähnten nukleotidbindenden Strukturen der Grund für die MSS4-katalysierte Nukleotidfreisetzung.

Die MSS4:Rab8-Komplexstruktur reflektiert die gemessenen kinetischen Daten in hervorragender Art und Weise: Der ungeordnete Zustand mehrerer essentieller nukleotidbindender und magnesiumkoordinierender Aminosäuren und Struktur motive verlangsamt den Nukleotidaustausch und erklärt damit die erhaltenen kinetischen Untersuchungen früherer Studien (DSS4:Ypt1, MSS4:Rab3A). Kinetische Analyse von Aminosäuremutationen in Rab8 (E30A, D31A, Q60G) und MSS4 (F75A) konnten weiteren Einblick in den Austauschmechanismus geben und zeigen, dass Rab8 evolutionär nicht auf maximale Geschwindigkeit und Effizienz in seiner Aktivierbarkeit durch MSS4 selektiert worden ist.

Sowohl die strukturellen als auch die kinetischen Daten der MSS4:Rab8:Nukleotid-Interaktion (Wildtyp und Mutanten) bestätigen die in der Vergangenheit geäußerten Zweifel an der Rolle von MSS4 als Guaninnukleotidaustauschfaktor. Im Vergleich zu MSS4 ist die Austauschdomäne von Sec2 wesentlich schneller und effizienter im Nukleotidaustausch. Daher ist anzunehmen, dass Sec2 einen vollständig anderen Mechanismus für den

Nukleotidaustausch an Sec4 anwendet als MSS4 an Rab8 oder DSS4 an Ypt1/Sec4. Dieser gleicht wahrscheinlich dem Mechanismus anderer klassischer GEFs.

Die kinetische Analyse von Sec2 beweist, dass effektive und schnelle GEFs für Rab-Proteine existieren. Damit mehrten sich die Zweifel an der GEF-Funktion von DSS4/MSS4, zumal Sec2 und DSS4/MSS4 beide mit der GTPase Sec4 interagieren können und eine redundante GEF-Funktion beider Proteine unwahrscheinlich ist. Höchstwahrscheinlich ist Sec2 als der eigentliche GEF für Sec4 zu betrachten. DSS4/MSS4 hat dagegen eventuell die in früheren Studien vermutete Chaperonaktivität für nukleotidfreie RabGTPasen.

Um detaillierte Einblicke in den Nukleotidaustauschprozess an Rab-Proteinen zu erhalten, muss die Struktur des Sec2:Sec4-Komplexes bestimmt werden. Zur erfolgreichen Kristallisation und Strukturbestimmung ist eine weitere Eingrenzung der Sec4-Bindungsstelle an Sec2 vorzunehmen, um die ausgedehnte *Coiled-Coil*-Struktur von Sec2 zu verkleinern und die Kristallisation des Komplexes, die kompakte und globuläre Strukturen begünstigt, wahrscheinlicher zu machen. Zusätzlich können die Analysen des Austauschprozesses auf weitere RabGEFs ausgedehnt werden. Hier bietet sich das Protein Rabin8 an, welches Austauschaktivität für Rab8 zeigt, deren kinetischen Parameter aber noch unbekannt sind. Rabin8 enthält eine Sec2-Domäne und bietet daher sowohl die Möglichkeit, Rückschlüsse auf den Sec2-katalysierten Austauschprozess an Sec4 ziehen zu können, als auch die kinetischen Daten mit der MSS4:Rab8-Interaktion vergleichen zu können. Dieser Untersuchungsansatz bietet außerdem die Option, die Funktion von MSS4 weiter reflektieren zu können.

Coiled-Coil-Strukturen, wie in Sec2 gefunden, sind ein sehr häufiges Bindungsmotiv für Rab-Proteine, sind allerdings nur als Domänen von Effektorproteinen und nicht von GEFs identifiziert worden. Mit der Auflösung der molekularen Struktur des Rabin8:Rab8- oder des Sec2:Sec4-Komplexes böte sich die Möglichkeit zu untersuchen, wie das *Coiled-Coil*-Motiv für so unterschiedliche Prozesse wie spezifische Erkennung und Bindung des aktivierten Zustands einer RabGTPase und den Nukleotidaustausch angewendet wird. Auch sind *Coiled-Coil*-Strukturen in allen charakterisierten GTPase:GEF-Komplex als Austauschelement unbekannt.

Die in der vorliegenden Arbeit präsentierten kinetischen Untersuchungen und Methoden bieten ein exaktes System für die Analyse von GEFs und können zum Vergleich von GEFs unterschiedlicher GTPasen herangezogen werden. Zusätzlich geben sie die Möglichkeit, molekulare Strukturen im Kontext ihrer kinetischen Parameter analysieren zu können um weitere Einblicke in die Funktionsweise von Guaninnukleotidaustauschfaktoren zu erlangen.

6. MATERIAL UND METHODEN

6.1. Materialien

6.1.1. Chemikalien

Alle Chemikalien wurden von den folgenden Herstellern in der größtmöglichen Reinheit bezogen.

Tabelle 6: Liste der verwendeten Chemikalien

Hersteller	Verbindung/Chemikalie
Applichem, Darmstadt, Deutschland	Acrylamid/Bisacrylamid (37.5:1, 30%), Guanidiniumhydrochlorid (GdnHCl), Ammoniumsulfat
Gerbu, Gaiberg, Deutschland	DTE, DTT, HEPES, EDTA, Glycerin, Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid (IPTG), Kanamycin
Hampton Research, Laguna Niguel, CA, USA	PEG/Ion Screen, Crystal Screen HAT, Additiv Screen, 1,2,3-Heptantriol
JT Baker, Deventer, NL	Acetonitril, Ethanol, Isopropanol, Aceton, Harnstoff, Kaliumdihydrogenphosphat, Dikaliumhydrogenphosphat, Kaliumhydroxid, Salzsäure, Natriumchlorid, Magnesiumchlorid
Merck, Darmstadt, Deutschland	Ammoniumpersulfat, Natriumhydroxid, Imidazol, Tetrabutylammoniumbromid (TBABr)
Pharma Waldhof, Düsseldorf, Deutschland	GMP, GDP, GTP
Roth, Karlsruhe, Deutschland	CHAPS, Tris
Serva, Heidelberg, Deutschland	TEMED, Bromphenolblau, Coomassie Brilliant Blue R250, TritonX-100, Ampicillin, β -Mercaptoethanol, Zinkchlorid
Sigma, Taufkirchen, Deutschland	Sinapinische Säure, Ethidiumbromid, Trifluoressigsäure, Agarose, Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), Polyethylenglykol 3350 (PEG3350), GppNHp
Fluka, Steinheim, Deutschland	Saccharose, Argininhydrochlorid, Magnesiumacetat Tetrahydrat, di-Natriumtartrat Dihydrat
Molecular Probes Invitrogen, Carlsbad, USA	5-(((2-iodoacetyl)amino)ethyl)aminonaphthalene-1-sulfonische Säure (1,5-IAEDANS)
Riedel-de-Haen, Seelze, Deutschland	Nickelchlorid
Calbiochem, Darmstadt, Deutschland	Chloramphenicol

6.1.2. Allgemeine Instrumentation

Proteinreinigungen wurden gewöhnlich mit der FPLC-Anlage ÄKTA Prime (Amersham Bioscience, Uppsala, Schweden) durchgeführt. Zentrifugationen wurden mit Eppendorf 5415C/D Tischzentrifugen, Eppendorf Centrifuge 5810R (Eppendorf, Köln, Deutschland) oder Avanti J20-XP Zentrifuge von Beckman Coulter (Palo Alto, CA, USA) durchgeführt. Für

päparative Ultrazentrifugation wurde eine Beckman Optima L70-K Zentrifuge eingesetzt. Für denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese wurde das BioRad Mini-Protean-II System verwendet. Messungen von pH-Werten erfolgte mit Hilfe eines pH-Meters 761 von Calimatic Knick (Berlin, Deutschland). Entionisiertes Wasser wurde durch Anlagen von Millipore produziert (Eschborn, Deutschland). Dialyseschläuche (MWCO 14kDa) wurden von Schleicher und Schuell (Dasse, Deutschland) verwendet. Zur Konzentrierung von Proteinen wurden verschiedene Konzentratoren von Millipore (Eschborn, Deutschland) eingesetzt. Bakteriellen Flüssigkulturen wurde in Schüttelinkubatoren Infors-HT inkubiert. Zur Amplifikation von DNA mittels PCR wurde der Thermocycler PTC-200 von MJ-Research eingesetzt.

6.1.3. Häufig verwendete Lösungen und Wachstumsmedien

LB-Medium

0.5% (w/v) Hefeextrakt
1% (w/v) Trypton
1% (w/v) NaCl

SDS-PAGE Laufpuffer (10x)

0.25 M Tris-HCl
2 M Glycin
1% (w/v) SDS

SDS-PAGE Sammelgelpuffer

0.5 M Tris-HCl, pH6.8
0.4% (w/v) SDS

SDS-PAGE Trenngelpuffer

1.5 M Tris-HCl, pH8.8
0.4% (w/v) SDS

SDS-PAGE Probenpuffer (2x)

0.1 M Tris-HCl, pH6.8
4% (w/v) SDS
20% (v/v) Glycerin
0.2 M DTT
0.5% (w/v) Bromphenolblau

Coomassie Färbelösung

10% (v/v) Essigsäure
40% (v/v) Methanol
0.1% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R250

DNA-Ladepuffer (5x)

10% (w/v) Ficoll400
50 mM Na₂EDTA, pH8.0
0.05% (w/v) SDS
0.15% (w/v) Bromphenolblau
0.15% (w/v) Xylencyanol

TAE-Puffer (1x)

40 mM Tris
20 mM Essigsäure
1 mM Na₂EDTA

6.2. Analytische Methoden

6.2.1. MALDI-TOF-Massenspektrometrie

Matrix assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Massenspektrometrie (MALDI-TOF-MS) ist eine Methode zur Massenbestimmung von Molekülen. MALDI-Spektren wurden mit Hilfe einer Voyager-DE Pro Biospektrometer Arbeitsstation von Applied Biosystems (Weiterstadt, Deutschland) aufgenommen. Proteinproben wurden bei Bedarf (hoher Salz- oder Detergenzgehalt) durch Anwendung einer kleinen, zentrifugierbaren Gelfiltrationssäule (Quiagen, Hilden, Deutschland) entsalzt und anschließend mit gleichen Volumen der frisch zubereiteten Probenmatrix (10mg/ml Sinapinische Säure, 0.1% (v/v) Trifluoressigsäure, 50% (v/v) Acetonitril) gemischt. Die Mischung wurde schnellstmöglich auf einen MALDI-Probenträger aufgebracht, luftgetrocknet und Spektren wurden mit den folgenden Geräteeinstellungen aufgenommen: Beschleunigungsspannung 25 kV, Gitterspannung 93%, Extraktionsverzögerung 750 ns. Die Laserintensität wurde während der Messung zur Optimierung des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses manuell angepasst. Die Kalibrierung des Gerätes wurde mit Proteinstandards mit definiertem Molekulargewicht erreicht. Die Datenaufnahme und -auswertung erfolgte mit dem gerätespezifischen Programmpaket Voyager Software Package. Die Genauigkeit von MALDI-TOF-MS zu Massenbestimmung von Proteinen beträgt ca. ± 20 Da für Proteine im Molekulargewichtsbereich 20-30kDa.

6.2.2. Analytische Umkehrphasenchromatographie

Analytische Umkehrphasenchromatographie diente zur Bestimmung der Nukleotidzusammensetzung und des Nukleotidgehalts von Proben. Eingesetzt wurde zu diesem Zweck eine HPLC-Anlage (*High pressure liquid chromatography*) der Firma Waters, ausgestattet mit einer Waters 626 Pumpe, einem Waters 2475 Fluoreszenzdetektor und einem Waters 2487 Absorptionsdetektor (Waters, Milford, MA, USA). Die Chromatographie wurde mit einer ProntoSil 120-5-C18-AQ C₁₈-Umkehrphasensäule durchgeführt (Bischoff Chromatography, Leonberg, Deutschland).

Variante A: Die Auftrennung gewöhnlicher Guaninnukleotide geschah durch isokratische Elution (Puffer: 50mM Kaliumphosphat pH6.6, 10mM Tetrabutylammoniumbromid, 8% (v/v) Acetonitril) mit einer Flussrate von 1ml/min. Eluierende Nukleotide wurden durch Absorption bei einer Wellenlänge von 256nm detektiert. Die Auswertung der Daten erfolgte mit der Millennium Software (Waters).

Variante B: Die Auftrennung eines fluoreszenzmarkierten Nukleotids (MantGDP, MantGTP, MantGppNHp) von gewöhnlichen Guaninnukleotiden mittels eines linearen Gradienten erreicht (Lösung A: 50mM Kaliumphosphat pH6.6; Lösung B: 50mM Kaliumphosphat pH6.6, 70% (v/v) Acetonitril), mit einer Flussrate von 1ml/min und einem Gradienten über 20ml. Die Detektion eluierender Nukleotide erfolgte durch Absorptionmessungen bei 256nm

(Absorption der Guaninbase) und 350nm (Absorption der Mant-Gruppe), sowie gegebenenfalls durch Messung der Fluoreszenz der Mant-Gruppe (Anregungswellenlänge 350nm, Emissionswellenlänge 440nm). Die Auswertung der Daten erfolgte mit der Millennium Software (Waters) durchgeführt.

6.2.3. Analytische Größenausschlusschromatographie

Größenausschlusschromatographie (auch Gelfiltration) trennt Biomoleküle auf Basis der Unterschiede des hydrodynamischen Radius; die Moleküle eluieren dabei in der Reihenfolge fallender Größe. Gelfiltrationsläufe wurden, wie beschrieben im Fall der analytischen Umkehrphasenchromatographie (siehe Abschnitt 6.2.2), mit Hilfe einer Waters HPLC-Anlage durchgeführt. Die folgenden Säulen wurden verwendet: Superdex75 10/30 oder Superdex200 10/30 (Amersham Biotech, Uppsala, Schweden). Die Säulen wurden mit zwei Säulenvolumina Gelfiltrationspuffer (10mM HEPES pH7.5, 50mM Natriumchlorid, 5mM DTE, 1mM Magnesiumchlorid, 10µM GDP) zu Beginn der Analyse equilibriert. Proben wurden in einem Volumen von bis zu 200µl auf die Säule geladen; die minimale geladene Proteinmasse pro Proteinkomponente betrug 80µg. Die Elution der Proteine erfolgte in einem Säulenvolumen Gelfiltrationspuffer, die Detektion der Proteine fand durch Absorption bei den Wellenlängen 280nm (Absorption aromatischer Aminosäuren) und 220nm (Absorption der Peptidbindung) statt.

Zur Abschätzung der molekularen Größe und des Molekulargewichtes wurde das Elutionsprofil des analysierten Proteins mit dem Elutionsprofil von Proteinstandards mit globulären Proteinen bekannten Molekulargewichtes verglichen (für Superdex75 10/30: LMW Gelfiltration Kit (Amersham Bioscience, Uppsala, Schweden); Superdex200 10/30: BioRad Gelfiltrationsstandard (BioRad, Hercules, CA, USA)).

Bei Bedarf und im Falle uneindeutiger Elutionsprofile wurden die eluierten Proteine fraktioniert und die Fraktionen nachfolgend mit denaturierender SDS-PAGE analysiert.

6.2.4. Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese

Denaturierende Natriumdodecylsulfat (SDS) Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) wird verwendet, um komplexe Proteingemische unter Einwirkung eines angelegten elektrischen Feldes in einem Polyacrylamidgel entsprechend ihrer Größe aufzutrennen, um Reinheit und Zusammensetzung der Proben beurteilen zu können.

Typischerweise wurden 12.5-17.5%ige SDS-PAGE-Trenngelle zur Analyse der Proteine per SDS-PAGE verwendet, die von einem 5%igen Sammelgel überlagert worden sind. Die entsprechenden Komponenten für Sammel- und Trenngel wurden gemäß Tabelle 7 gemischt und in eine BioRad Mini-Protean-II System Kassette gegossen; dabei wurde das Sammelgel erst nach Polymerisation des Trenngels angesetzt und direkt auf das Trenngel gegeben.

MATERIAL UND METHODEN

Zur Probenvorbereitung wurde die Probe mit dem gleichen Volumen an 2x SDS-PAGE Probenpuffer versetzt und wenige Minuten auf 95°C zur Denaturierung des Proteins und quantitativer Bindung von SDS erhitzt. Die Gele wurden im Laufpuffer mit einer Spannung von ca. 10V pro Quadratcentimeter Trenngel betrieben, bis der Farbstoff Bromphenol des Probenpuffers das Trenngel verlassen hat. Die Proteine wurden durch Aufkochen in SDS-PAGE Färbelösung gefärbt, gefolgt von Entfärbung des Polyacrylamidgels in 10%iger Essigsäure, wobei die gefärbten Proteine im Gel sichtbar werden.

Tabelle 7: Zusammensetzung eines 15%igen Polyacrylamidgels. Die Zusammensetzung ist exemplarisch, für Gele mit abweichenden Polyacrylamidgehalt muss das Volumen an Acrylamid/ Bisacrylamid neu berechnet und durch entsprechende Zugabe von Wasser angepasst werden (TEMED: N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamin; APS: Ammoniumpersulfat)

	Sammelgel	Trenngel
Sammelgelpuffer	0.35ml	-
Trenngelpuffer	-	1.1ml
10% (w/v) SDS	27µl	45µl
30% (w/v) Acrylamid/ Bisacrylamid (37.5:1)	0.45ml	2.2ml
10% (w/v) APS	27µl	45µl
TEMED	3µl	2µl
Wasser	1.8ml	1ml

6.3. Biochemische Methoden

6.3.1. Reinigung von MSS4, Sec2, Sec4, Rab3A und MSS4:Rab8

Die Expression und Reinigung der Proteine MSS4, Sec2, Sec4, Rab3A und des MSS4:Rab8-Komplexes erfolgt ausgehend von den in Tabelle 9 gelisteten DNA-Konstrukten, sowie den unter Abschnitt 6.6.1 aufgeführten bakteriellen Expressionsstämmen. Die Proteine enthielten einen Hexahistidinaffinitätsanker, welcher Reinigung mittels einer Metallaffinitätsäule (HiTrap chelating HP, Amersham Bioscience, Uppsala, Schweden), geladen mit zweiwertigem Nickel, erlaubte. Nach Lyse der resuspendierten Bakterien (Lysepuffer: 50mM Natriumphosphat pH7.5, 500mM Natriumchlorid, 1mM PMSF) mit Hilfe eines Microfluidizers (Microfluidics, Newton, MA, USA) wurde das durch Ultrazentrifugation geklärte Lysat mit 1% (v/v) TritonX-100 versetzt und auf eine 5ml Metallaffinitätsäule (HiTrap chelating HP, Amersham Bioscience, Uppsala, Schweden) gegeben, um das rekombinante Protein zu binden. Nach Waschen der Säule in Gegenwart von 30mM Imidazol zur Unterbrechung unspezifischer Bindungen wurde das Protein durch Applikation eines linearen Imidazolgradienten (Metallaffinitätspuffer: 25mM Natriumphosphat pH7.5, 500mM Natriumchlorid; 30-500mM Imidazol, 30 Säulenvolumen) an einer ÄKTA Prime FPLC-Anlage (Amersham Bioscience, Uppsala, Schweden) in unterschiedlichen Fraktionen eluiert und durch UV-Absorption bei 280nm detektiert. Nach SDS-PAGE-Analyse wurden die Fraktionen mit dem erwünschten Protein vereinigt und der Hexahistidinaffinitätsanker durch

Decahistidin-TEV-Protease abgespalten (1mg TEV-Protease pro 50mg rekombinantes Protein) und zur Entfernung von Imidazol gegen Dialysepuffer (25mM Natriumphosphat pH7.5, 500mM Natriumchlorid, 1mM β -Mercaptoethanol, 1mM EDTA) über Nacht dialysiert. Die Decahistidin-TEV-Protease sowie unverdautes rekombinantes Protein wurden mittels der Metalaffinitätssäule vom verdauten Protein getrennt und letzteres mit 150mM Imidazol eluiert. Das Volumen wurde durch Konzentrierung des Proteins mit Hilfe geeigneter Ultrafiltration (3-50kDa Amicon Ultra, Billerica, MA, USA) zur Anwendung auf einer Größenausschlusschromatographiesäule (Superdex75 oder Superdex200, Amersham Bioscience, Uppsala, Schweden; Gelfiltrationspuffer: 10mM HEPES pH7.5, 100mM Natriumchlorid, 5mM DTE) reduziert. Das eluierende Protein der Größenausschlusschromatographie wurde an einer ÄKTA Prime FPLC-Anlage durch Absorption bei 280nm detektiert, und die gesammelten Fraktionen über SDS-PAGE analysiert. Fraktionen mit hoher Reinheit des erwünschten Proteins wurden vereinigt und durch Ultrafiltration (3-50kDa Amicon Ultra, Billerica, MA, USA) konzentriert. Aliquotierte Mengen des Proteins wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Von diesem Protokoll abweichende Prozeduren und reinigungsspezifische Details werden nachfolgend für die entsprechenden Proteine aufgeführt.

6.3.1.1. Expression und Reinigung von MSS4 und MSS4-F75A

Die Proteine MSS4₁₀₋₁₂₃ und MSS4-F75A₁₀₋₁₂₃ wurden in BL21(DE3) durch Induktion der Plasmide bei $\text{OD}_{600\text{nm}}=0.8$ mit 1mM IPTG und Wachstum bei 28°C für 5h exprimiert. Allen Puffern wurde 10% (v/v) Glycerin und $100\mu\text{M}$ Zinkchlorid zugesetzt. Für die abschließende Gelfiltration wurde eine Superdex75 26/60 Säule (Amersham Bioscience, Uppsala, Schweden) eingesetzt. Die Konzentrierung des Proteins fand mit einer Amicon Ultra YM-3 Membran statt (Amicon Ultra, Billerica, MA, USA).

6.3.1.2. Expression und Reinigung von Sec4

Das Protein Sec4₁₉₋₁₈₆ wurde BL21(DE3) durch Induktion des Plasmids bei $\text{OD}_{600\text{nm}}=0.7$ mit 0.4mM IPTG bei 25°C für 5h exprimiert. Vor Induktion wurden die Zellen 15min auf Eis abgekühlt. Allen Puffern wurde 1mM Magnesiumchlorid und $10\mu\text{M}$ GDP zugesetzt. Für die abschließende Gelfiltration wurde eine Superdex75 26/60 Säule (Amersham Bioscience, Uppsala, Schweden) eingesetzt. Die Konzentrierung des Proteins fand mit einer Amicon Ultra YM-10 Membran statt (Amicon Ultra, Billerica, MA, USA). Das Hexahistidinaffinitätsanker konnte durch die TEV-Protease nicht entfernt werden; daher wurde dieser Spaltungsschritt im Laufe der Reinigung nicht durchgeführt.

6.3.1.3. Expression und Reinigung von Sec2

Das Protein Sec2₁₋₁₆₅ wurde BL21(DE3) durch Induktion des Plasmids bei OD_{600nm}=0.6 mit 0.03mM IPTG bei 18°C für 4h exprimiert. Vor Induktion wurden die Zellen 15min auf Eis abgekühlt. Allen Puffern wurde 5% (v/v) Glycerin zugesetzt. Nach Lyse der Bakterien wurde das Lysat mit 4M Harnstoff vermengt; die erste Metallaffinitätschromatographie zu Bindung von Sec2₁₋₁₆₅ aus dem geklärten Bakterienlysat wurde ebenfalls in Gegenwart von 4M Harnstoff durchgeführt, welches erst durch die anschließende Dialyse entfernt wurde. Für die abschließende Gelfiltration wurde eine Superdex75 26/60 Säule (Amersham Bioscience, Uppsala, Schweden) eingesetzt. Die Konzentrierung des Proteins fand mit einer Amicon Ultra YM-10 Membran statt (Amicon Ultra, Billerica, MA, USA).

6.3.1.4. Expression und Reinigung von Rab3A

Das Protein Rab3A₁₄₋₁₈₄ wurde BL21(DE3) durch Induktion des Plasmids bei OD_{600nm}=0.7 mit 1mM IPTG bei 28°C für 5h exprimiert. Vor Induktion wurden die Zellen 15min auf Eis abgekühlt. Allen Puffern wurde 1mM Magnesiumchlorid und 10µM GDP zugesetzt. Für die abschließende Gelfiltration wurde eine Superdex75 26/60 Säule (Amersham Bioscience, Uppsala, Schweden) eingesetzt. Die Konzentrierung des Proteins fand mit einer Amicon Ultra YM-10 Membran statt (Amicon Ultra, Billerica, MA, USA).

6.3.1.5. Expression und Reinigung des MSS4:Rab8-Komplexes

Die Plasmide codierend für Hexahistidin-MSS4₁₀₋₁₂₃ und Rab8₁₋₁₈₃ wurden in BL21(DE3) Codon Plus RIL bei OD_{600nm}=0.6 durch Induktion mit 1mM IPTG bei 23°C für 17h koexprimiert. Vor Induktion wurden die Zellen 15min bei 4°C abgekühlt. Allen Puffern wurde 5% (v/v) Glycerin, 1mM Magnesiumchlorid und 5µM GDP zugesetzt. Die Metallaffinitätschromatographie wurde unter geringeren Salzkonzentrationen (300mM Natriumchlorid) durchgeführt.

6.3.2. Rückfaltung und Reinigung von Rab8 und der Rab8-Mutanten

Das Protein Rab8 sowie die Aminosäurepunktmutanten E30A_{Rab8}, D31A_{Rab8}, Q60Q_{Rab8} konnten nicht löslich exprimiert werden und mussten daher über Expression in unlösliche bakterielle Einschlusskörper hergestellt werden. Daraufhin wurde das Protein durch Behandlung mit dem denaturierenden Reagens Guanidiniumhydrochlorid (GdnHCl) in Lösung gebracht und in den nativen Zustand zurückgefaltet.

Die Plasmide codierend für Rab8 und die Mutanten E30A_{Rab8}, D31A_{Rab8}, Q60Q_{Rab8} wurden in BL21(DE3) Codon Plus RIL bei OD_{600nm}=0.8 mit 1mM IPTG für 5h bei 37°C exprimiert. Die Zellen wurden in Lysepuffer (100mM Tris-HCl pH7.5, 5mM EDTA, 5mM DTE, 1mM PMSF) resuspendiert, mit Hilfe eines Microfluidizers (Microfluidics, Newton, MA, USA) lysiert und mit 2% (v/v) TritonX-100 inkubiert. Die Einschlusskörper wurden durch Zentrifugation geerntet

(30min, 22000g) und in Waschpuffer (Lysepuffer mit 2M Harnstoff und 2% (v/v) TritonX-100) resuspendiert. Die gewaschenen Einschlusskörper wurden durch Zentrifugation gewonnen und zur Entfernung von Harnstoff und TritonX-100 mit Lysepuffer gewaschen. Das Protein wurde mit Denaturierungspuffer (6M GdnHCl, 50mM Tris-HCl pH7.5, 5mM DTE, 5mM EDTA) in Lösung gebracht und verbleibende unlösliche Bestandteile durch Zentrifugation (100000g, 1h) entfernt.

Ein Volumen einer Proteinmenge von 200mg entsprechend wurde bei 16°C unter Rühren langsam (ca. 1h) in 2l Renaturierungspuffer (50mM HEPES pH7.5, 400mM Argininhydrochlorid, 400mM Saccharose, 1mM EDTA, 5mM DTE, 50µM GDP, 2mM Magnesiumchlorid, 100mM Ammoniumsulfat) getropft; durch die plötzliche Verdünnung und den Entzug von GdnHCl faltete sich das Protein zurück. Unlösliche Bestandteile wurden durch Filtration entfernt. Das Protein wurde mit Ammoniumsulfat (70% Sättigung) über Nacht gefällt und mittels eines Papierfilters geerntet. Das Protein durch Solubilisierungspuffer (50mM HEPES pH7.5, 150mM NaCl, 5mM DTE, 10% (v/v) Glyzerin, 10µM GDP, 1mM Magnesiumchlorid) in Lösung gebracht und durch Zentrifugation (6000g, 30min) von unlöslichen Bestandteilen befreit. Zur Beurteilung des Erfolges der Rückfaltung wurden Proteinproben jedes Schrittes des Protokolls mit SDS-PAGE analysiert; GdnHCl enthaltende Proben mussten dabei vorher durch TCA-Fällung von GdnHCl befreit werden.

Die weitere Reinigung erfolgte, nach Konzentrierung des Proteins durch Ultrafiltration (Amicon YM-10, Amicon Ultra, Billerica, MA, USA), durch Größenausschlusschromatographie mit einer Superdex75 26/60 Säule (Amersham Bioscience, Uppsala, Schweden) in Gelfiltrationspuffer (10mM HEPES pH7.5, 100mM Natriumchlorid, 1mM Magnesiumchlorid, 10µM GDP, 5mM DTE). Das konzentrierte Protein wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

6.3.3. Präparativer Nukleotid austausch an RabGTPasen

Gewöhnlich sind RabGTPasen aufgrund ihrer GTP-Hydrolyseaktivität nach ihrer Reinigung mit GDP assoziiert. Da das Nukleotid mit hoher Affinität gebunden ist, wird für den Austausch gegen andere Nukleotide (GTP, Mant-Nukleotide) ausgenutzt, dass die Affinität des Nukleotids für die RabGTPase durch Entzug von Magnesium um mehrere Größenordnungen fällt.

Die entsprechende Menge Rab-Protein wurde mit einem fünffachen Überschuss EDTA pH8.0 gegenüber der Magnesiumchloridkonzentration und zeh- bis zwanzigfachen Überschuss des gewünschten Nukleotids gegenüber der Proteinkonzentration für 2h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe des doppelten Überschusses an Magnesiumchlorid gegenüber der EDTA-Konzentration wurde das überschüssige Nukleotid mit Hilfe einer NAP-5 Gelfiltrationssäule (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Schweden) abgetrennt (Puffer: 10mM HEPES pH7.5, 50mM Natriumchlorid, 5mM DTE, 2mM Magnesiumchlorid).

MATERIAL UND METHODEN

Das Protein wurde gegebenenfalls konzentriert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Die Effizienz des Nukleotidaustauschs wurde über analytische Umkehrphasen-HPLC überprüft.

6.3.4. Herstellung nukleotidfreier RabGTPasen

Die Herstellung nukleotidfreier GTPasen unterliegt dem folgenden Prinzip: Das gebundene Nukleotid (GDP) wird zunächst ersetzt durch das weniger stark gebundene GTP-Analog GppCp, das eine ca. hundertfach geringere Affinität für die RabGTPase besitzt. Das freigewordene GDP, aber nicht GppCp, wird durch das Enzym alkalische Phosphatase verdaut. In einem zweiten Schritt wird GppCp durch das Enzym Phosphodiesterase zu GMP degradiert, welches durch die vorhandene alkalische Phosphatase weiter zu Guanosin umgesetzt wird.

Überschüssiges Magnesiumchlorid wurde aus der Proteinlösung durch Dialyse für 2h bei Raumtemperatur) gegen Puffer (10mM HEPES pH7.5, 100mM Natriumchlorid, 10mM EDTA, 5% (v/v) Glycerin) entfernt, gefolgt von Dialyse bei 4°C für 2h zur Entfernung von EDTA (10mM HEPES pH7.5, 100mM Natriumchlorid, 5% (v/v) Glycerin). Nach Zugabe von Ammoniumsulfat (100mM finale Konzentration) und Zinkchlorid (500µM finale Konzentration) und einem zehnfachen Überschuss von GppCp gegenüber der RabGTPase-Konzentration wurde das freiwerdende GDP mit alkalischer Phosphatase (fünf Einheiten pro Milligramm an Rab-Protein, Kat.-Nr. 1097075, Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) bei 18°C verdaut. Der Verdau von GDP wurde mit Hilfe analytischer Umkehrphasen-HPLC verfolgt. Nach quantitativer Umsetzung von GDP wurde GppCp durch Zugabe einer Spatelspitze Phosphodiesterase (Kat.-Nr. E202240Y, Amersham Bioscience, Uppsala, Schweden) degradiert. Nach quantitativer Umsetzung zu Guanosin, verfolgt mittels analytischer Umkehrphasen-HPLC, wurde eventueller Niederschlag durch Zentrifugation (10000g, 10min) entfernt, die Lösung in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

6.3.5. Fluoreszenzmarkierung von Proteinen mit 1,5-IAEDANS

Kovalente Modifikation freier Cysteine von Proteinen durch 5-(((2-iodoacetyl)-amino)-ethyl)-amino)-naphthalene-1-sulfonsäure (1,5-IAEDANS) ist eine leicht durchführbare Methode zur Markierung eines Moleküls für nachfolgende Interaktionsstudien mit Hilfe von Fluoreszenztechniken.

Da 1,5-IAEDANS mit freien Thiolgruppen reagiert, müssen zunächst die verfügbaren Cysteine des Proteins vollständig reduziert, das reduzierende Agens aber nachfolgend quantitativ abgetrennt werden, um nicht mit 1,5-IAEDANS zu interferieren. Das entsprechende Protein (100nmol) wurde zunächst mit DTT (3mM) für 30min auf Eis reduziert und darauf mit Hilfe einer NAP-5 Gelfiltrationssäule (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Schweden) umgepuffert (20mM Natriumphosphat pH7.5, 50mM Natriumchlorid).

Die Markierung des Proteins geschah durch Inkubation mit zehnfachem Überschuss frisch angesetzten 1,5-IAEDANS (1 μ mol) für 2h bei Raumtemperatur. Überschüssiges 1,5-IAEDANS wurde wiederum durch Anwendung einer NAP-5 Gelfiltrationssäule entfernt (Puffer wie oben). Der Erfolg der Markierung sowie die Anzahl kovalent modifizierter Cysteine wurde mittels MALDI-TOF-MS analysiert. Die Effizienz der Markierung wurde durch den Vergleich der bestimmten Proteinkonzentration mit der Konzentration der Dansylfunktion, berechnet aus der Absorption der Dansylfunktion bei der Wellenlänge 336nm (Extinktionskoeffizient 5700cm⁻¹M⁻¹), überprüft. Das Protein wurde gegebenenfalls konzentriert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

6.3.6. Fällung von Proteinen

Proben, die GdnHCl enthalten, mussten vor SDS-PAGE durch Fällung mit Trichloressigsäure (TCA) gereinigt werden. Nach Zugabe von TCA zur Proteinprobe (finale Konzentration 10-15% (w/v)) und 30min Inkubation auf Eis wurde das gefällte Protein abzentrifugiert (16000g, 10min), das Pellet zweimal mit eiskaltem Aceton gewaschen, anschließend getrocknet, in SDS-PAGE Probenpuffer aufgenommen und bei 95°C in Lösung gebracht.

6.3.7. Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinen wurden nach Bradford und durch UV-Absorption durchgeführt.

6.3.7.1. Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinbestimmung nach Bradford basiert auf der bevorzugten Bindung des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue G-250 an Argininreste in Proteinen; die Menge gefärbten Proteins kann spektroskopisch bestimmt und durch Kalibrierung mit Proteinstandards bekannter Konzentration quantifiziert werden.

Zur Bestimmung wird gebrauchsfertige Färbelösung Coomassie *Protein Assay Reagent* (Pierce, Rockford, IL, USA) verwendet. Von der Proteinprobe werden 1-10 μ g auf 100 μ l mit Wasser verdünnt und mit 900 μ l Bradfordlösung versetzt. Nach fünfminütiger Inkubation wird die Absorption des Farbstoffes bei einer Wellenlänge von 595nm im Vergleich zu einer Referenzprobe gemessen. Die Proteinkonzentration kann über den Vergleich mit kalibrierten Daten von Proteinen bekannter Konzentration berechnet werden.

6.3.7.2. Proteinbestimmung durch UV-Absorption

Mit Hilfe des berechneten Extinktionskoeffizienten von Proteinen kann die Konzentration eines Proteins gemäß dem Lambert-Beer'schen Gesetz durch UV-Absorption bei einer Wellenlänge von 280nm gemessen werden. Die Absorption wird bewirkt durch die aromatischen Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin, sowie durch die Anwesenheit von

Cystinen²¹⁰. Zur Bestimmung der Absorption wurde das Spektrophotometer ND-1000 (peQLab, Erlangen, Deutschland) verwendet, welches Applikation geringer Volumina (2µl) erlaubt. Zusammen mit dem Extinktionskoeffizienten des Proteins, berechnet aus der Aminosäuresequenz des Proteins²¹⁰, kann daraus die Proteinkonzentration ermittelt werden.

6.4. Biophysikalische Methoden

Fluoreszenzmessungen erfolgte mit Fluoreszenzspektrometern: LS-55 *Luminescence Spectrometer* (PerkinElmer, Wellesley, MA, USA) und Fluoromax-3 (Jobin Yvon, Edison, NJ, USA). Die Messungen wurden in 1ml Quartzküvetten (Hellma) unter permanentem Rühren und bei 25°C aufgenommen. *Stopped-Flow*-Messungen wurden mit dem Gerät SX.18MV-R (Surrey, Großbritannien) bei 25°C durchgeführt.

6.4.1. Bindungsstellentitration

Der Zustand nukleotidfreier RabGTPasen wurde anhand ihrer Fähigkeit, Nukleotide binden zu können, überprüft. Als Signal wurde die Tryptophanfluoreszenzänderung der GTPase oder die Fluoreszenzänderung der Mant-Gruppe bei Bindung des Nukleotides ausgenutzt. Die nukleotidfreie GTPase wurde in einer Konzentration eingesetzt, die weit oberhalb ihrer Dissoziationskonstante K_D zu Nukleotiden liegt, sodass jedes zugegebene Aliquot an Nukleotid von der GTPase gebunden wird. Sobald das Fluoreszenzsignal durch vollständige Bindung gesättigt ist, kann die bekannte Menge an eingesetzter nukleotidfreier GTPase mit der zugegebenen Menge Nukleotid verglichen und daraus die Anzahl aktiver Bindungsstellen berechnet werden.

Zu 1ml einer Lösung von 0.5µM nukleotidfreiem Rab-Protein wurde in Puffer (20mM HEPES pH7.5, 100mM Natriumchlorid, 5mM Magnesiumchlorid, 5mM DTE) MantGTP in mehreren Schritten (Erhöhung der MantGTP Konzentration um jeweils 40nM) gegeben. Der Fluoreszenzanstieg durch Bindung des Nukleotids wurde in einem Fluoreszenzspektrometer verfolgt (Anregungswellenlänge 340nm, Emissionswellenlänge 440nm). Nach vollständiger Bindung erreicht die Fluoreszenz ein Plateau bei weiterer Zugabe von MantGTP; in der Auftragung der Fluoreszenz gegen die MantGTP-Konzentration ergibt der Schnittpunkt der Geraden der Plateaubereiches mit der Geraden, resultierend aus dem Fluoreszenzanstieg bei Bindung von MantGTP an das nukleotidfreie Rab-Protein, die Konzentration aktiver Bindungsstellen.

6.4.2. Endpunkttitration

Die Interaktion von Sec4:MantGDP mit Sec2 wurde mit Hilfe einer Gleichgewichtstitration die Fluoreszenz der Mant-Gruppe ausnutzend (Anregungswellenlänge 348nm, Emissionswellenlänge 450nm) im Fluoreszenzspektrometer LS-55 *Luminescence Spectrometer* (Perkin-Elmer, Wellesley, MA, USA) untersucht. Der Sec4:MantGDP-Komplex wurde in einer

Konzentration von $5\mu\text{M}$ in 1ml Puffer (10mM HEPES pH7.5, 100mM Natriumchlorid, 5mM Magnesiumchlorid, 5mM DTE, 5% (v/v) Glycerin) bei Raumtemperatur vorgelegt und mit steigenden Konzentrationen an Sec2 titriert, bis die Mant-Fluoreszenz trotz weiterer Sec2-Zugabe keine Änderung mehr zeigte. Sec2 verdrängte teilweise MantGDP aus dem Sec4:MantGDP-Komplex, teilweise formierte sich ein ternärer Sec4:MantGDP:Sec2-Komplex. Durch eine finale Zugabe von 1mM GDP wurde das restliche gebundene MantGDP verdrängt und freigesetzt. Diese Prozedur erlaubt die Berechnung der Fluoreszenzausbeuten der Mant-Gruppe im Sec4:MantGDP-Komplex, im ternären Sec4:MantGDP:Sec2-Komplex und von freiem MantGDP. Zusammen mit den Fluoreszenzausbeuten, den Gleichgewichtsbedingungen für die einzelnen Komplexe, Massenerhaltung und der Affinität nukleotidfreien Sec4 lassen sich die Gleichgewichtskonstanten K_2 , K_3 und K_4 erhalten (siehe Abbildung 10) ⁹³. Die Kurvenanpassung des Fluoreszenzsignals in Abhängigkeit von der Sec2-Konzentration wurde mit Hilfe des Programms Scientist (MicroMath, Saint Louis, Missouri, USA) durchgeführt (siehe Abschnitt 8.4).

6.4.3. Transiente Kinetiken

Transiente Kinetiken befassen sich mit der zeitabhängigen Wechselwirkung von Reaktions- und Interaktionspartnern.

6.4.3.1. Langzeitmessungen: Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten

Für die Ermittlung von Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten wurden Langzeitfluoreszenzmessungen durchgeführt. Es wurden binäre Komplexe zweier Interaktionspartner hergestellt, in denen die eine Komponente mit einem Fluoreszenzmarker (Mant-Gruppe oder Dansylfunktion) versehen ist. Die Fluoreszenzänderung durch Verdrängung der markierten Komponente mit einem Überschuss unmarkierten Interaktionspartners wurde gemessen.

Typischerweise wurden 100-200nM des binären Komplexes mit markierter Komponente (z.B. Rab8:MantGDP-Komplex) vorgelegt und mit einem zehnfachen bis hundertfachen Überschuss an unmarkierter Komponente (z.B. GDP) in einem 1ml-Ansatz verdrängt. Im Falle einer Messung mit 1,5-IAEDANS als Fluoreszenzmarker wurde das Fluoreszenzresonanzenergietransfer (FRET) Signal bei Anregung von Tryptophanen (Anregungswellenlänge 290nm) auf die Dansylfunktion (Emissionswellenlänge 440nm) beobachtet. Für die Mant-Gruppe als Fluorophor wurde die direkte Fluoreszenzänderung gemessen (Anregungswellenlänge 348nm, Emissionswellenlänge 440nm).

Die beobachteten Fluoreszenzänderungen zeigten eine exponentielle Zeitabhängigkeit und konnten an eine exponentielle Funktion erster Ordnung angepasst werden.

MATERIAL UND METHODEN

$$F = F_0 + Ae^{-k_1t}$$

Gleichung 2: Exponentielle Funktion erster Ordnung. (F: Fluoreszenzsignal; F_0 : Fluoreszenzsignal im Gleichgewicht; A: Amplitude des Fluoreszenzsignals; k_1 : Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante; t: Zeit)

Die Zeitkonstante k_1 der Exponentialfunktion ist die gesuchte Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante der Interaktion. Ihr Kehrwert multipliziert mit dem natürlichen Logarithmus von zwei ergibt die Halbwertszeit der Interaktion. Datenanalyse wurde mit dem Programm Origin7.0 (OriginLab, Northampton, MA, USA) durchgeführt.

6.4.3.2. Stopped-Flow-Messungen

Assoziationsreaktionen von Proteinen oder von nukleotidfreien GTPasen mit Nukleotiden und verschiedene katalytische Reaktion sind oftmals zu schnell, um in einem gewöhnlichen Fluoreszenzspektrometer beobachtet werden zu können, da in der Mischzeit der interagierenden Komponenten die Reaktion bereits zu einem beträchtlichen Teil oder vollständig abgelaufen ist. Mit Hilfe der *Stopped-Flow*-Technik können zwei Komponenten schnell gemischt und Reaktionen untersucht werden, die im Millisekunden- bis Minutenbereich geschehen. Die *Stopped-Flow*-Technik wurde eingesetzt, um die Wechselwirkung von nukleotidfreien Rab8 und Sec4 mit Nukleotiden zu untersuchen, für die Nukleotidaustausch Katalyse von MSS4 an Rab8 und Sec2 and Sec4, für die Assoziation zwischen nukleotidfreiem Rab8 mit Dansyl-MSS4, für die Assoziation von Nukleotiden mit den nukleotidfreien, binären Sec2:Sec4- und MSS4:Rab8-Komplexen.

Typischerweise wurde die Proteinkomponente, bzw. die fluoreszenzmarkierte Komponente (mit Ausnahme von Mant-Nukleotiden), in einer Konzentration zwischen 0.2-0.5 μ M eingesetzt und die Reaktion bei verschiedenen Konzentrationen eines Überschusses des Interaktionspartners über Messung der Fluoreszenzänderung verfolgt (Pufferbedingungen: 10mM HEPES pH7.5, 100mM Natriumchlorid, 5mM Magnesiumchlorid, 5mM DTE). Die erhaltenen und gemittelten Fluoreszenzkurven ließen sich entweder an eine Exponentialfunktion erster (siehe Gleichung 2) oder zweiter Ordnung (siehe Gleichung 3) anpassen; dazu wurde das von Applied Photophysis bereitgestellte Programmpaket verwendet.

$$F = F_0 + A_1e^{-k_{obs1}t} + A_2e^{-k_{obs2}t}$$

Gleichung 3: Exponentielle Funktion zweiter Ordnung. (F: Fluoreszenzsignal; F_0 : Fluoreszenzsignal im Gleichgewicht; A_1 , A_2 : Amplituden des Fluoreszenzsignals der Phasen; k_{obs1} , k_{obs2} : Geschwindigkeitskonstanten der Phasen; t: Zeit)

Auftragung der Geschwindigkeitskonstanten k_{obs} gegen die Konzentration der variierenden Komponente ließ die Berechnung der Assoziationsgeschwindigkeitskonstanten zu. Im Falle eines Ein-Schritt-Bindungsverhaltens der Interaktionspartner ergab sich gemäß Gleichung 4 die Assoziationsgeschwindigkeitskonstante aus der Steigung der Ausgleichsgeraden. Für einen Zwei-Schritt-Bindungsmechanismus zeigte die Geschwindigkeitskonstante eine hyperbole Abhängigkeit von der Konzentration der variierenden Komponente. Hyperbole

Kurvenanpassung gemäß Gleichung 5 ergab die maximale Reaktionsgeschwindigkeit der Interaktion k_1 , sowie die Affinitätskonstante K_1 des vorgelagerten, schwachen Gleichgewichtes. Das Produkt aus Affinitätskonstante K_1 und maximaler Reaktionsgeschwindigkeit k_1 ergab die Assoziationsgeschwindigkeitskonstante k_1 der Reaktion. Für die Herleitung von Gleichung 4 und Gleichung 5 siehe Abschnitt 8.2 und 8.3.

$$k_{obs} = k_1 c_B + k_{-1}$$

Gleichung 4: Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit k_{obs} von der Konzentration der variierenden Komponente B in einem Ein-Schritt-Bindungsmechanismus. (k_{obs} : Reaktionsgeschwindigkeit; c_B : Konzentration der Komponente B; k_1 : Assoziationsgeschwindigkeitskonstante; k_{-1} : Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante)

$$k_{obs} = \frac{k_1}{1 + \frac{1}{K_1 \cdot c_B}} + k_{-1}$$

Gleichung 5: Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit k_{obs} von der Konzentration der variierenden Komponente B in einem Zwei-Schritt-Bindungsmechanismus. (k_{obs} : Reaktionsgeschwindigkeit; c_B : Konzentration der Komponente B; k_1 : maximale Reaktionsgeschwindigkeit; k_{-1} : Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante; K_1 : Affinitätskonstante K_1 des vorgelagerten Gleichgewichtes)

Verschiedene Fluoreszenzsignale wurden, abhängig von den verwendeten Komponenten, verwendet: Tryptophanfluoreszenz (Anregung bei 295nm, Emission 340nm *cut-off*-Filter) für nukleotidfreie Komplexe MSS4:Rab8 und Sec2:Sec4 mit Nukleotiden, FRET-Signal (Anregung bei 295nm, Emission 420nm *cut-off*-Filter) für Mant-Nukleotide mit nukleotidfreiem Komplexen oder nukleotidfreien RabGTPasen, direkte Mant-Fluoreszenzänderung (Anregung bei 348nm, Emission 400nm *cut-off*-Filter) für den Sec2- und MSS4-katalysierten an Sec4:MantGDP bzw. Rab8:MantGTP, FRET-Signal (Anregung bei 295nm, Emission 420nm *cut-off*-Filter) für Interaktion von Dansyl-MSS4 mit nukleotidfreiem Rab8.

6.5. Strukturelle Methoden: Röntgenkristallographie

Die molekulare Struktur des MSS4:Rab8-Komplexes wurde mittels Röntgenkristallographie bestimmt, bzw. die Struktur von Sec2, Sec4:Sec2 und Rab8:GDP zu bestimmen versucht. Auf den umfangreichen theoretischen Hintergrund dieser Methode wird an dieser Stelle nicht eingegangen, sondern lediglich die experimentellen Bedingungen zur Bestimmung der Struktur in Kürze beschrieben.

6.5.1. Kristallisation

Die gereinigten Proteine Sec2, Sec4:Sec2, Rab8:GDP und MSS4:Rab8 wurden zur Kristallisation eingesetzt. Dazu wurden die Proteine in einem Hochdurchsatzverfahren zunächst mit dem Kristallisationsscreen PEG/Ion (Hampton Research, Laguna Niguel, CA, USA) auf ihr Fällungsverhalten überprüft und gegebenenfalls weiter aufkonzentriert oder verdünnt. Als Ergebnis dieser Analyse wurden die Proteine in den folgenden Konzentrationen für weitere Kristallisationsuntersuchungen eingesetzt: 5.5mg/ml

MATERIAL UND METHODEN

MSS4:Rab8, 11mg/ml Rab8, 20mg/ml Sec2, 10mg/ml Sec2:Sec4. Die initialen Kristallisationsexperimente fanden im *sitting-drop*-Verfahren mit 96-well Kristallisationsplatten (Greiner) bei 20°C statt; 100nl Proteinlösung wurden mit 100nl Reservoirlösung gemischt und gegen 75µl Reservoirlösung inkubiert. Die Kristallisation von sowohl Sec2, als auch Sec2:Sec4, als auch Rab8 war erfolglos; der MSS4:Rab8-Komplex hingegen konnte kristallisiert und seine atomare Struktur über Röntgenstrukturanalyse bestimmt werden.

6.5.1.1. MSS4:Rab8-Komplex

Initiale Bündel an Kristallen wurden nach zwei Tagen bei 20°C in Bedingung 36 des PEG/Ion Screens (Hampton Research, Laguna Niguel, CA, USA) gefunden (0.2M di-Natriumtartrat, 20% (w/v) PEG3350). Die Kristallqualität wurde durch Optimierung der Kristallisationsbedingungen im *hanging-drop*-Verfahren (1µl Proteinlösung + 1µl Reservoirlösung, 500µl Reservoirvolumen) und durch Gebrauch von 0.15% (w/v) 1,2,3-Heptantriol (Hampton Research) in Kombination mit Animpfen der Kristallansätze verbessert. Initiale Bündel nadelartiger Kristalle wurden mittels einer Metallnadel zum Animpfen (*streak-seeding*) des frisch angesetzten Tropfens verwendet. Diese Prozedur wurde iterativ wiederholt, bis vereinzelt wachsende plattenartige Kristalle beobachtet werden konnten. Finale Pufferbedingungen waren: 20% (w/v) PEG3350, 50mM Tris-HCl pH9.0, 0.2M Magnesiumacetat, 0.15 (w/v) 1,2,3-Heptantriol. Die Konzentration von PEG3350 wurde durch Zugabe von 500µl 50% (w/v) PEG3350 zu Reservoirlösung auf 35% (w/v) erhöht. Nach wenigen Tagen wurden Einzelkristalle mittels 50-100µm Kryoschleifen (Hampton Research) geerntet und in flüssigem Stickstoff schockgefroren und gelagert.

6.5.1.2. Sec2:Sec4-Komplex

Ähnlich dem MSS4:Rab8-Komplex wurde die Kristallisation von Sec2:Sec4 (10mg/ml) versucht. Hierzu wurden in dem beschriebenen Hochdurchsatzverfahren mit der *sitting-drop*-Methode die folgenden Kristallisationsscreens verwendet: CrystalScreen, CrystalScreen Lite, PEG/Ion SaltRX, IndexHT, Grid NaCl, Grid PEG/LiCl (Hampton Research, Laguna Niguel, CA, USA), MBClass I, MBClass II, PEGs, AmSO₄, Cations, Anions, pHClear (Nextal, Montreal, Quebec, Kanada). Die besten Bedingungen mit kristallähnlichem Wachstum fanden sich für den Screen MBClass I, Bedingungen 6 (0.1M ADA pH6.5, 1M Ammoniumsulfat) und 7 (0.1M Tris-HCl pH8.5, 1.2M Ammoniumsulfat). Trotz zahlreicher Optimierungsversuche (Animpfen, Variation des pH-Wertes, Variation der Temperatur, Einsatz von Additiven, Konzentrationsvariation von Präzipitationsmittel und Protein) konnten keine Kristalle erhalten werden.

Um die Wahrscheinlichkeit einer Kristallisation zu erhöhen, wurden die heterologen Komplexe Sec2:Rab3A und Sec2:Rab8 gereinigt und in einer Konzentration von 5.5mg/ml

bzw. 10mg/ml mit den gleichen Screens getestet, wie bereits für Sec2:Sec4 geschehen war. Diese Versuche waren erfolglos.

6.5.2. Röntgenkristallographie

Die optisch besten Kristalle wurden auf ihr Streuvermögen und *twinning* im Röntgenstrahl (Wellenlänge 1.54Å; Röntgenquelle: ENRAF Nonius FR591 (Bruker AXS, Karlsruhe, Deutschland); CCD-Detektor: mar345 (mar research, Norderstedt, Deutschland)) bei T=100K getestet. Kristalle mit hohem Streuvermögen (besser als 2.5Å) wurden mit Hilfe eines Synchrotrons untersucht. Mit der Strahlenquelle ID14-2 des Synchrotrons ESRF (Grenoble), ausgestattet mit einem ADSC Q4 CCD Detektor und Oxford *Cryostream*, wurden Daten über einen Kristallrotationswinkel von 190° aufgenommen (Oszillationsbereich 0.7°, Aufnahmezeit je 2s, drei Durchgänge pro Aufnahme, Kristall-Detektor-Distanz 190mm, Wellenlänge 0.934Å). Die Daten eines MSS4:Rab8-Komplekxkristalls mit Abmessungen 50x15x5µm wurden bei einer Temperatur von 100K aufgenommen und wurden mit der Software-sammlung XDS²¹¹ bis zu einer Auflösung von 2.0Å prozessiert.

Die Kristalle gehören zu der Raumgruppe P1, mit den Einheitszellenparametern a=40.92Å, b=49.85Å, c=83.48Å, $\alpha=102.88^\circ$, $\beta=97.46^\circ$, $\gamma=90.12^\circ$. Die Statistik der Datenaufnahme und der Prozessierung bis 2.0Å ist in der folgenden Tabelle zusammengefasst:

Tabelle 8: Kristalldaten und Datenaufnahmestatistik des MSS4:Rab8-Komplekxkristalls. Angaben in Klammern stehen für den Bereich der höchsten Auflösung. ^a $R_{\text{sym}} = \sum |I_j - \langle I_j \rangle| / \sum I_j$, mit $\langle I_j \rangle$ als mittlerer Intensität der Reflektionen j mit ihren Symmetrieäquivalenten. ^b Vollständigkeit, R_{sym} und $\langle I/\sigma(I) \rangle$ sind in allen Fällen für die höchste Auflösungsschale (2.05-2.00Å). ^c $R_{\text{work}} = \sum |F_{\text{obs}}| - k |F_{\text{calc}}| / \sum |F_{\text{obs}}|$; 5% zufällig gewählter Reflektionen wurde für die Berechnung von R_{free} verwendet.

Datenaufnahme	
Raumgruppe	P1
Einheitszellenparameter	a=40.92Å, b=49.85Å, c=83.48Å $\alpha=102.88^\circ$, $\beta=97.46^\circ$, $\gamma=90.12^\circ$
Röntgenquelle	ESRF ID14-2
Wellenlänge	0.934Å
Auflösung	19.17Å -2.0Å (2.05Å -2.00Å)
R_{sym} ^{a, b}	4.9 (29.1)
Totale Beobachtungen	85632
Einzigartige Beobachtungen	40780
Vollständigkeit der Daten ^b	94.5 (74.5)
$\langle I/\sigma(I) \rangle$	11.6 (2.9)
Modellverfeinerung	
Auflösung	19.17Å -2.0Å
$R_{\text{work}}/R_{\text{free}}$ ^c	0.196 (0.226) / 0.252 (0.296)
Inhalt des Modells	MSS4 (Molekül A): Q7-A50, D61-E123 Rab8 (Molekül D): K3-S17, A32-K122, D127-T150, A154-W177 MSS4 (Molekül B): Q7-A50, D61-E123 Rab8 (Molekül C): K3-V19, A36-T64, T74-K122, V125-T152, A156-W177 Zwei Zinkionen Zwei Moleküle β -Mercaptoethanol 300 Wassermoleküle
RMSD der Bindungen/ Winkel (Å ²)	0.011Å / 1.19° MSS4: 28.6; Rab8: 55.2; Wasser: 45.8
Ramachandran Auftragung	Begünstigte: 91.1%, erlaubte: 8.7%, generell erlaubte: 0.2%

Der Matthews Koeffizient V_M^{212} wurde zu $2.51\text{Å}^3\text{Da}^{-1}$ für einen Komplex von 33kDa berechnet, was die Anwesenheit von zwei Komplexen pro asymmetrischer Einheit vermuten ließ. Dieser V_M -Wert korrespondiert mit einem Lösungsmittelinhalt von ungefähr 51.1%. Die Strukturbestimmung wurde mittels molekularen Ersatzes unter Verwendung des Programms CNS²¹³ durchgeführt, wobei die MSS4-Kristallstruktur (PDB-Zugangsnummer 1HXR) als Suchmodell benutzt wurde. Zwei MSS4-Moleküle (Molekül A und B) den zwei Komplexen entsprechend wurden in der asymmetrischen Einheit des Kristalls positioniert. Die initialen Lösungen wurden mit Hilfe des Programms REFMAC5²¹⁴ verfeinert, gefolgt von repetitiven Zyklen manueller Modellentwicklung von Rab8 (Molekül C und D); das vollständige Modell der MSS4:Rab8-Komplexstruktur wurde mit $2F_o - F_c$ und $F_o - F_c$ Elektronendichtekarten im Programm O²¹⁵ gebaut, gefolgt von nachfolgenden Verfeinerungszyklen durch das Programm REFMAC5. Die Qualität der Daten, der Verfeinerungsstatistiken und die Modellgeometrie sind in Tabelle 8 angegeben. Die Atomkoordinaten und Beugungsdaten

wurden in der Protein Data Bank unter der PDB-Zugangsnummer 2FU5 veröffentlicht. Die beiden Komplexe in der asymmetrischen Einheit sind einander sehr ähnlich. Es wird nur einer der beiden Komplexe, bestehend aus Molekül A (MSS4) und Molekül D (Rab8), beschrieben. Abbildungen der MSS4:Rab8-Kristallstruktur und Kristallstrukturen anderer Proteine zwecks Vergleich und Analyse wurden mit dem Programm PyMol²¹⁶ angefertigt.

6.6. Molekularbiologische Methoden

6.6.1. Plasmide und bakterielle Stämme

6.6.1.1. Plasmide

Aller verwendeten Plasmide entstammen dem Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie (Dortmund), Abteilung für Physikalische Biochemie.

Tabelle 9: Liste der in dieser Arbeit verwendeten Plasmide. Der Vektor pET30a wurde von Novagen (Darmstadt, Deutschland) bezogen; der Vektor pET19mod basiert auf dem Vektor pET19 von Novagen (Darmstadt, Deutschland), ist aber modifiziert mit einer TEV-Proteaseerkennungssequenz zwischen dem N-terminalen Hexahistidinaffinitätsanker und der Insertionsregion für das zu exprimierende Protein. N-terminale (ΔxN) oder C-terminale (ΔxC) der exprimierten Proteine sind angegeben.

Plasmidname	Exprimierte Komponente	Selektionsmarker
651 Mss4 D9n pET19mod	Humanes MSS4, $\Delta 9N$	Ampicillin
1287 Mss4 F75A pET19mod	Humanes MSS4, $\Delta 9N$, F75A	Ampicillin
658 Rab8 D23c pET30a	Maus Rab8, $\Delta 23C$	Kanamycin
1210 pET30a Rab8 D23 E30A	Maus Rab8, $\Delta 23C$, E30A	Kanamycin
1163 pET30a Rab8 D23c D31A	Maus Rab8, $\Delta 23C$, D31A	Kanamycin
1209 pET30a Rab8 D23 Q60G	Maus Rab8, $\Delta 23C$, Q60G	Kanamycin
1145 pET19mod Sec4 19-186	Hefe Sec4 19-186	Ampicillin
685 Rab3A D13n D35c pET19mod	Rab3A $\Delta 13N$, $\Delta 35C$	Ampicillin
1153 pET19mod Sec2 1-165	Hefe Sec2, 1-165	Ampicillin

6.6.1.2. Bakterienstämme

XL1-Blue (Stratagene)	recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac [F', proAB, lacI ^q Z Δ M15 Tn10 (Tet ^r)]
BL21(DE3) (Novagen)	F ⁻ , ompT, hsdS (r _B ⁻ m _B ⁻), dcm, Tet ^r , gal, λ (DE3)
BL21(DE3) Codon Plus RIL (Stratagene)	F ⁻ , ompT, hsdS (r _B ⁻ m _B ⁻), dcm, Tet ^r , gal, λ (DE3), endA, Hte [argU ileY leuW Cam ^r]

6.6.2. Präparation und Transformation kompetenter Zellen

Der Vorgang der Übertragung genetischen Materials in Form von Plasmiden in kompetente Bakterienzellen zwecks Vervielfältigung oder Expression der codierten Information wird als Transformation bezeichnet.

MATERIAL UND METHODEN

Ein Volumen von 1L LB-Medium wurde mit 1ml einer Übernachtskultur des gewünschten *E.coli*-Stamms angeimpft. Antibiotische Resistenzmarker besitzende Zellen (z.B. BL21(DE3) Codon Plus RIL) wurden in Gegenwart des entsprechenden Antibiotikums hochgezogen. Die Kultur wurde bei 37°C im Schüttelinkubator bis zum Erreichen einer optischen Dichte von $OD_{600nm}=0.5$ inkubiert, dann 20min bei 4°C heruntergekühlt, transferiert in sterile Zentrifugenbecher und für 10min bei 4°C und 2000g zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und verworfen. Die Zellen wurden dann gemäß den nachfolgend beschriebenen Techniken (Variante A oder B) weiterverarbeitet.

6.6.2.1. Variante A: Transformation durch Elektroschock

Destabilisierung der Zellmembranen von *E.coli* durch elektrische Ladung führt zur Bildung transienter Membranporen, durch welche Plasmide aufgenommen werden können.

Das bakterielle Pellet (siehe vorheriger Abschnitt 6.6.2) wird behutsam in 5ml eiskaltem, sterilem GYT (0.125% (w/v) Hefeextrakt, 0.25% (w/v) Trypton, 10% (v/v) Glycerin) resuspendiert und zentrifugiert (10min, 4°C, 2000g). Zellen wurden in 1ml GYT resuspendiert, in aliquotierten Volumina (50µl) in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Zur Transformation wurde ca. 1-100ng DNA zu der aufgetauten Bakteriensuspension gegeben in eine gekühlte Elektroporationsküvette gegeben. Elektrotransformation wurde mit einem kurzen Puls hoher Spannung mit einem *E.Coli* Pulser der Firma BioRad durchgeführt (Geräteeinstellungen: 25µF, 200Ω, 2.5kV). Zu den Bakterien wurde 1ml LB-Medium gegeben und für 30min bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Die transformierten Zellen wurden auf LB-Agarplatten durch das entsprechende Antibiotikum bei 37°C selektiert.

6.6.2.2. Variante B: Transformation durch Hitzeschock

Bakterielle Zellen können durch Behandlung mit Calciumchlorid für die Aufnahme von Plasmiden kompetent gemacht werden, welche durch einen kurzen Hitzeschock der Bakterien in Gegenwart der Plasmide erreicht wird.

Das bakterielle Pellet (siehe vorheriger Abschnitt 6.6.2) wurde behutsam in 20ml eiskalter Calciumchloridlösung (100mM) resuspendiert und für 30min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden 5min bei 2000g und 4°C zentrifugiert und daraufhin in 1-5ml TFBII-Puffer (10mM MOPS pH7.0, 75mM Calciumchlorid, 10mM Natriumchlorid, 15% Glycerin) resuspendiert. Die Bakteriensuspension wurde in aliquotierten Volumina (50µl) in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Zur Transformation wurden die Bakterien zügig aufgetaut und mit 1-100ng Plasmid-DNA versetzt. Nach dreißigminütiger Inkubation auf Eis wurden die Zellen einem Hitzeschock für 75s bei 42°C ausgesetzt. Nachdem die Zellen für 2min auf Eis inkubiert worden sind, wurde der Suspension 1ml LB-Medium zugesetzt und die Kultur für 30min bei 37°C unter Schütteln

inkubiert. Die transformierten Zellen wurden auf LB-Agarplatten durch das entsprechende Antibiotikum bei 37°C selektiert.

6.6.3. Reinigung von DNA

6.6.3.1. DNA-Fragmente

DNA-Fragmente, produziert durch Verdau von Plasmiden oder PCR-Amplifikation, wurden durch präparative Agarosegelelektrophorese gereinigt. Die im Gel sichtbare, gewünschte DNA-Bande wurde ausgeschnitten und mit Hilfe des Gelextraktionskits (peQLab, Erlangen, Deutschland) gemäß den Herstellerangaben gereinigt.

6.6.3.2. Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese dient der Auftrennung der negativ geladenen DNA nach Größe der Fragmente, wobei das Gel sich als dreidimensionales, siebartiges Netzwerk dem Wanderungsbestreben der Moleküle entgegensetzt.

Abhängig von der Größe der DNA/ des DNA-Fragmentes wurde Agarose in einer Konzentration von 0.8 bis 1.2 % (w/v) angesetzt. Die erforderliche Menge an Agarose wurde in TAE-Puffer durch kurzes Aufkochen der Suspension gelöst und zur Markierung der DNA 0.01% (w/v) Ethidiumbromid zugesetzt. Das Gel wurde in eine Gelkammer ausgegossen und durch Abkühlen polymerisiert. Die DNA-Proben wurden durch Zugabe der entsprechenden Menge DNA-Ladepuffer vorbereitet und in die Taschen des Gels geladen. Zum Größenvergleich wurde ebenso ein Molekulargewichtsstandard separat beigefügt (1kb DNA-Leiter, GibcoBRL, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) Die Elektrophorese wurde horizontal bei ca. 10V/cm Gel in TAE-Puffer bis zur vollständigen Trennung der Fragmente durchgeführt. Die DNA-Banden werden durch das im Gel vorhandene Ethidiumbromid markiert und können im UV-Licht sichtbar gemacht werden.

6.6.3.3. Präparation von Plasmid-DNA

Präparative Mengen an Plasmid-DNA wurden durch Vervielfältigung in dem Bakterienstamm XL1Blue, gefolgt von Reinigung durch den Plasmid MiniPrep Kit (peQLab, Erlangen, Deutschland) erreicht. Eine einzelne Bakterienkolonie wurde nach Transformation mit dem entsprechenden Plasmid von einer LB-Agarplatte in ca. 2-5ml LB-Medium als Übernachtskultur bei 37°C unter Schütteln vermehrt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (3000g, 5min) geerntet und die Plasmid-DNA durch alkalische Lyse in Gegenwart des Detergenz SDS gemäß den Herstellerangaben des Plasmid MiniPrep Kit freigesetzt. Die präzipitierten Komponenten (chromosomale DNA, Lipide, Proteine) wurden durch Zentrifugation entfernt und die Plasmid-DNA an mitgelieferte Säulen selektiv gebunden. Nach Waschen der Säule

MATERIAL UND METHODEN

wurde die DNA mit TE-Puffer (10mM Tris-HCl pH7.5, 1mM EDTA) eluiert und bei -20°C gelagert.

6.6.3.4. Ethanolfällung

Zur Fällung von DNA wurde die Salzkonzentration der DNA-Probe auf 250-300nM Natriumacetat pH5.5 eingestellt und die DNA durch Zugabe von Ethanol zu einer finalen Konzentration von ca. 70% (v/v) präzipitiert. Nach Inkubation (30min, Raumtemperatur) wurde die gefällte DNA durch Zentrifugation (10000g, 10min) pelletiert, der Überstand verworfen und das Pellet mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen. Nach Trocknen der DNA bei Raumtemperatur kann die DNA durch Zugabe von TE-Puffer (10mM Tris-HCl pH7.5, 1mM EDTA) wieder in Lösung gebracht werden.

6.6.4. PCR

Die Polymerasekettenreaktion ist eine Methode zur analytischen und präparativen Vervielfältigung von DNA. Ein PTC-200 Thermocycler (MJResearch, Waterland, USA) wurde zur Temperaturkontrolle der PCR-Reaktionen verwendet.

6.6.4.1. Präparative PCR

Für präparative PCR wurden gewöhnlich 50µl Reaktionsmischung angesetzt, die 1-5ng der zu vervielfältigenden DNA-Vorlage enthielt. Weiterhin für die Reaktion notwendig waren: 0.5-1.0µM der komplementären 5'- und 3'-desoxy-Oligonukleotide, jeweils 200µM dATP, dGTP, dTTP, dCTP, sowie 2-3 Einheiten hitzestabile DNA-Polymerase (*Expand High Fidelity Polymerase*, Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) mit dem entsprechenden Salzgehalt (nach Herstellerangaben). Denaturierung der DNA-Stränge fand für 1min bei 96°C statt, gefolgt von Paarung der Oligonukleotide mit der DNA-Vorlage bei 50-62°C für 1min. Die anschließende DNA-Polymerisation fand bei 72°C statt, die Dauer betrug 1min pro 1000 Basenpaare entstehender DNA. Zur präparativen Vervielfältigung der DNA-Vorlage wurden 25 dieser Zyklen aus DNA-Denaturierung, Paarung der Oligonukleotide und DNA-Polymerisation benötigt. Die DNA-Produkte wurden mit Agarosegelelektrophorese gereinigt und zur Verifizierung der DNA-Sequenz durch DNA-Sequenzierung analysiert.

6.6.4.2. Analytische PCR (Kolonie PCR)

Zur Überprüfung korrekter Ligation von DNA-Fragmenten zur Herstellung funktioneller Expressionsplasmide wurde analytische PCR angewendet. Nach Transformation von Ligationsansätzen wurden entsprechende bakterielle Einzelkolonien von der LB-Agarplatte in 20µl entionisiertes Wasser zur hypotonischen Lyse überführt. Von dieser Lösung wurden 1µl mit 10µl PCR-Mischung (0.5 Einheiten RedTaq DNA-Polymerase (Sigma, Taufkirchen, Deutschland), 10pmol spezifische 5'- und 3'-Oligonukleotide, 1nmol dNTPs, RedTaq-

Reaktionspuffer) vermengt. Die PCR wurde unter den folgenden Bedingungen durchgeführt: Denaturierung der DNA bei 96°C für 1min, Paarung der DNA-Vorlage mit den komplementären Oligonukleotiden bei 50-62°C, DNA-Polymerisation bei 72°C für 1min pro 1000 Basenpaare DNA-Vorlage. Zur Vervielfältigung der DNA wurden 25 dieser Zyklen benötigt. Die DNA-Produkte wurden mit Agarosegelelektrophorese analysiert.

6.6.4.3. DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung diente der Überprüfung gewünschter DNA-Sequenzen. Zur DNA-Sequenzierung der klonierten DNA-Konstrukte wurde der *BigDyeDesoxy terminator cycle sequencing Kit* und ein ABI Prism 373XL Gerät (Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland) verwendet. Die Sequenzierungsreaktion enthält 150-300ng der entsprechenden Plasmid-DNA, 3.2pmol des korrespondierenden Oligonukleotids und 4µl des *BigDyeDesoxy terminator* Gemisches in einem finalen Volumen von 10µl. Zur DNA-Polymerisation wurde das folgende Programm verwendet: Denaturierung der DNA bei 96°C für 1min, Paarung der DNA-Vorlage mit dem komplementären Oligonukleotid bei 50°C, DNA-Polymerisation bei 60°C für 4min. Die DNA wurde durch Ethanol-fällung präzipitiert, zweifach mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen, getrocknet und durch die Sequenzierungseinrichtung des Max-Planck-Institutes für molekulare Physiologie sequenziert.

6.6.5. Restriktionsverdau von DNA

Der Restriktionsverdau dient der definierten und spezifischen Fragmentierung von DNA mit Hilfe von Restriktionsenzymen (Restriktionsendonukleasen) und bereitet die Ligation zweier DNA-Fragmente vor. Für den Restriktionsverdau wurde nach Bedarf 0.2-2µg DNA eingesetzt. Die DNA wurde mit einer Einheit der entsprechenden Restriktionsenzyme, sowie Reaktionspuffer gemäß Herstellerangaben, versetzt (NdeI, XhoI; NEB, Ipswich, MA, USA) und mindestens 1h bei 37°C inkubiert. Die Reaktionsprodukte wurden über Agarosegelelektrophorese getrennt, analysiert und gegebenenfalls gereinigt.

6.6.6. DNA-Ligation

Die DNA-Ligation dient der kovalenten Verknüpfung zweier nach Restriktionsverdau entstandener DNA-Fragmente zur Herstellung funktioneller, zirkulärer Plasmide; dabei müssen die zu ligierenden Fragmente miteinander kompatibel sein. Zur Ligation werden 1-10fmol linearer Plasmid-DNA mit einem 3-10fachen molaren Überschuss des gewünschten DNA-Fragments gemischt. Die Ligation wurde in T4-DNA Ligasepuffer in einem Volumen von 12.5µl mit 0.2 Einheiten T4-DNA Ligase (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) bei 16°C für 1h durchgeführt. Die Hälfte des Ansatzes wurde in Bakterien XL1Blue nach der Calciumchloridmethode transformiert und die ausplattierten Kolonien mit Hilfe analytischer PCR nach positiven Ligationsergebnissen untersucht.

7. LITERATURNACHWEISE

1. IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature . A One-Letter Notation for Amino Acid Sequences . Tentative Rules. *Journal of Biological Chemistry* **243**, 3557-& (1968).
2. Bainton,D.F. The discovery of lysosomes. *J. Cell Biol.* **91**, 66s-76s (1981).
3. Masters,C. & Crane,D. Recent developments in peroxisome biology. *Endeavour* **20**, 68-73 (1996).
4. Palade,G. Intracellular aspects of the process of protein synthesis. *Science* **189**, 347-358 (1975).
5. Subramani,S. Components involved in peroxisome import, biogenesis, proliferation, turnover, and movement. *Physiol Rev.* **78**, 171-188 (1998).
6. Bennett,M.K. & Scheller,R.H. The Molecular Machinery for Secretion Is Conserved from Yeast to Neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**, 2559-2563 (1993).
7. Pastan,I. & Willingham,M.C. Receptor-Mediated Endocytosis - Coated Pits, Receptosomes and the Golgi. *Trends in Biochemical Sciences* **8**, 250-254 (1983).
8. Mellman,I. & Warren,G. The road taken: Past and future foundations of membrane traffic. *Cell* **100**, 99-112 (2000).
9. Pryer,N.K., Wuestehube,L.J. & Schekman,R. Vesicle-Mediated Protein Sorting. *Annual Review of Biochemistry* **61**, 471-516 (1992).
10. Rothman,J.E. & Wieland,F.T. Protein sorting by transport vesicles. *Science* **272**, 227-234 (1996).
11. Martinez,O. & Goud,B. Rab proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **1404**, 101-112 (1998).
12. Novick,P. & Zerial,M. The diversity of Rab proteins in vesicle transport. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**, 496-504 (1997).
13. Nuoffer,C. & Balch,W.E. Gtpases - Multifunctional Molecular Switches Regulating Vesicular Traffic. *Annual Review of Biochemistry* **63**, 949-990 (1994).
14. Olkkonen,V.M. & Stenmark,H. Role of Rab GTPases in membrane traffic. *Int. Rev. Cytol.* **176**, 1-85 (1997).
15. Schimmoller,F., Simon,I. & Pfeffer,S.R. Rab GTPases, directors of vesicle docking. *J. Biol. Chem.* **273**, 22161-22164 (1998).
16. Takai,Y., Sasaki,T. & Matozaki,T. Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev.* **81**, 153-208 (2001).
17. Hall,A. The Cellular Functions of Small Gtp-Binding Proteins. *Science* **249**, 635-640 (1990).
18. Valencia,A., Chardin,P., Wittinghofer,A. & Sander,C. The Ras Protein Family - Evolutionary Tree and Role of Conserved Amino-Acids. *Biochemistry* **30**, 4637-4648 (1991).
19. Colicelli,J. Human RAS superfamily proteins and related GTPases. *Sci. STKE.* **2004**, RE13 (2004).
20. Zerial,M. & McBride,H. Rab proteins as membrane organizers. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 107-117 (2001).
21. Lazar,T., Gotte,M. & Gallwitz,D. Vesicular transport: how many Ypt/Rab-GTPases make a eukaryotic cell? *Trends Biochem. Sci.* **22**, 468-472 (1997).
22. Farnsworth,C.C. *et al.* C Terminus of the Small Gtp-Binding Protein Smg P25A Contains 2 Geranylgeranylated Cysteine Residues and A Methyl-Ester. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**, 6196-6200 (1991).
23. Smeland,T.E., Seabra,M.C., Goldstein,J.L. & Brown,M.S. Geranylgeranylated Rab proteins terminating in Cys-Ala-Cys, but not Cys-Cys, are carboxyl-methylated by bovine brain membranes in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **91**, 10712-10716 (1994).
24. Glomset,J.A. & Farnsworth,C.C. Role of Protein Modification Reactions in Programming Interactions Between Ras-Related Gtpases and Cell-Membranes. *Annual Review of Cell Biology* **10**, 181-205 (1994).

25. Magee, A.I. *et al.* Lipid Modifications and Function of the Ras Superfamily of Proteins. *Biochemical Society Transactions* **20**, 497-499 (1992).
26. Khosravi-Far, R. *et al.* Isoprenoid modification of rab proteins terminating in CC or CXC motifs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **88**, 6264-6268 (1991).
27. Casey, P.J. & Seabra, M.C. Protein prenyltransferases. *J. Biol. Chem.* **271**, 5289-5292 (1996).
28. Alexandrov, K., Horiuchi, H., Steele-Mortimer, O., Seabra, M.C. & Zerial, M. Rab escort protein-1 is a multifunctional protein that accompanies newly prenylated rab proteins to their target membranes. *EMBO J.* **13**, 5262-5273 (1994).
29. Seabra, M.C., Brown, M.S., Slaughter, C.A., Sudhof, T.C. & Goldstein, J.L. Purification of component A of Rab geranylgeranyl transferase: possible identity with the choroideremia gene product. *Cell* **70**, 1049-1057 (1992).
30. Shen, F. & Seabra, M.C. Mechanism of digeranylgeranylation of Rab proteins. Formation of a complex between monogeranylgeranyl-Rab and Rab escort protein. *J. Biol. Chem.* **271**, 3692-3698 (1996).
31. Soldati, T., Shapiro, A.D., Svejstrup, A.B. & Pfeffer, S.R. Membrane targeting of the small GTPase Rab9 is accompanied by nucleotide exchange. *Nature* **369**, 76-78 (1994).
32. Ullrich, O., Horiuchi, H., Bucci, C. & Zerial, M. Membrane association of Rab5 mediated by GDP-dissociation inhibitor and accompanied by GDP/GTP exchange. *Nature* **368**, 157-160 (1994).
33. Dirac-Svejstrup, A.B., Sumizawa, T. & Pfeffer, S.R. Identification of a GDI displacement factor that releases endosomal Rab GTPases from Rab-GDI. *EMBO J.* **16**, 465-472 (1997).
34. Bourne, H.R., Sanders, D.A. & McCormick, F. The Gtpase Superfamily - A Conserved Switch for Diverse Cell Functions. *Nature* **348**, 125-132 (1990).
35. Constantinescu, A.T. *et al.* Rab-subfamily-specific regions of Ypt7p are structurally different from other RabGTPases. *Structure. (Camb.)* **10**, 569-579 (2002).
36. Pasqualato, S. *et al.* The structural GDP/GTP cycle of Rab11 reveals a novel interface involved in the dynamics of recycling endosomes. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 11480-11488 (2004).
37. Stroupe, C. & Brunger, A.T. Crystal structures of a Rab protein in its inactive and active conformations. *J. Mol. Biol.* **304**, 585-598 (2000).
38. Bergbrede, T., Pylypenko, E., Rak, A. & Alexandrov, K. Structure of the extremely slow GTPase Rab6A in the GTP bound form at 1.8 angstrom resolution. *Journal of Structural Biology* **152**, 235-238 (2005).
39. Simon, I., Zerial, M. & Goody, R.S. Kinetics of interaction of Rab5 and Rab7 with nucleotides and magnesium ions. *J. Biol. Chem.* **271**, 20470-20478 (1996).
40. Bernardis, A. GAPs galore! A survey of putative Ras superfamily GTPase activating proteins in man and Drosophila. *Biochim. Biophys. Acta* **1603**, 47-82 (2003).
41. Burstein, E.S. & Macara, I.G. Characterization of A Guanine Nucleotide-Releasing Factor and A Gtpase-Activating Protein That Are Specific for the Ras-Related Protein P25Rab3A. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**, 1154-1158 (1992).
42. Strom, M., Vollmer, P., Tan, T.J. & Gallwitz, D. A yeast GTPase-activating protein that interacts specifically with a member of the Ypt/Rab family. *Nature* **361**, 736-739 (1993).
43. Grosshans, B.L., Ortiz, D. & Novick, P. Rabs and their effectors: Achieving specificity in membrane traffic. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 11821-11827 (2006).
44. Zerial, M., Parton, R., Chavrier, P. & Frank, R. Localization of Rab family members in animal cells. *Methods Enzymol.* **219**, 398-407 (1992).
45. Segev, N. Ypt and Rab GTPases: insight into functions through novel interactions. *Curr. Opin. Cell Biol.* **13**, 500-511 (2001).
46. Christoforidis, S., McBride, H.M., Burgoyne, R.D. & Zerial, M. The Rab5 effector EEA1 is a core component of endosome docking. *Nature* **397**, 621-625 (1999).
47. Amor, J.C., Harrison, D.H., Kahn, R.A. & Ringe, D. Structure of the Human Adp-Ribosylation Factor-1 Complexed with Gdp. *Nature* **372**, 704-708 (1994).
48. Coleman, D.E. *et al.* Structures of Active Conformations of G(I-Alpha-1) and the Mechanism of Gtp Hydrolysis. *Science* **265**, 1405-1412 (1994).

49. Greasley, S.E. *et al.* The Structure of Rat Adp-Ribosylation-Factor-I (Arf-1) Complexed to Gdp Determined from 2 Different Crystal Forms. *Nature Structural Biology* **2**, 797-806 (1995).
50. Hirshberg, M., Stockley, R.W., Dodson, G. & Webb, M.R. The crystal structure of human rac1, a member of the rho-family complexed with a GTP analogue. *Nature Structural Biology* **4**, 147-152 (1997).
51. Ihara, K. *et al.* Crystal structure of human RhoA in a dominantly active form complexed with a GTP analogue. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 9656-9666 (1998).
52. Jurnak, F. Structure of the Gdp Domain of Ef-Tu and Location of the Amino-Acids Homologous to Ras Oncogene Proteins. *Science* **230**, 32-36 (1985).
53. Noel, J.P., Hamm, H.E. & Sigler, P.B. The 2.2 Å crystal structure of transducin- α complexed with GTP γ S. *Nature* **366**, 654-663 (1993).
54. Pai, E.F. *et al.* Refined crystal structure of the triphosphate conformation of H-ras p21 at 1.35 Å resolution: implications for the mechanism of GTP hydrolysis. *EMBO J.* **9**, 2351-2359 (1990).
55. Scheffzek, K., Klebe, C., Fritzwolf, K., Kabsch, W. & Wittinghofer, A. Crystal-Structure of the Nuclear Ras-Related Protein Ran in Its Gdp-Bound Form. *Nature* **374**, 378-381 (1995).
56. Sprang, S.R. G protein mechanisms: Insights from structural analysis. *Annual Review of Biochemistry* **66**, 639-678 (1997).
57. Dumas, J.J., Zhu, Z., Connolly, J.L. & Lambright, D.G. Structural basis of activation and GTP hydrolysis in Rab proteins. *Structure. Fold. Des* **7**, 413-423 (1999).
58. Esters, H., Alexandrov, K., Constantinescu, A.T., Goody, R.S. & Scheidig, A.J. High-resolution crystal structure of *S. cerevisiae* Ypt51(DeltaC15)-GppNHp, a small GTP-binding protein involved in regulation of endocytosis. *J. Mol. Biol.* **298**, 111-121 (2000).
59. Chavrier, P. *et al.* Hypervariable C-terminal domain of rab proteins acts as a targeting signal. *Nature* **353**, 769-772 (1991).
60. Steele-Mortimer, O. *et al.* The N-terminal domain of a rab protein is involved in membrane-membrane recognition and/or fusion. *EMBO J.* **13**, 34-41 (1994).
61. Pereira-Leal, J.B. & Seabra, M.C. The mammalian Rab family of small GTPases: definition of family and subfamily sequence motifs suggests a mechanism for functional specificity in the Ras superfamily. *J. Mol. Biol.* **301**, 1077-1087 (2000).
62. Wang, J. & , T.W.S.Y.S.L.A.C.E.A.S.M.W.J.B.A.P.H. Crystal structure of human RAB1A in complex with GDP. 31-1-2006.
63. Huber, S.K. & Scheidig, A.J. High resolution crystal structures of human Rab4a in its active and inactive conformations. *Febs Letters* **579**, 2821-2829 (2005).
64. Hong, B. & Shen, L.W.J.T.W.L.R.A.C.H.E.A.M.S.M.W.J.B.A.P.H. Crystal structure of human RAB5B in complex with GDP. 2006.
65. Rak, A. *et al.* Structure of the Rab7 : REP-1 complex: Insights into the mechanism of rab prenylation and choroideremia disease. *Cell* **117**, 749-760 (2004).
66. Eathiraj, S., Pan, X.J., Ritacco, C. & Lambright, D.G. Structural basis of family-wide Rab GTPase recognition by rabenosyn-5. *Nature* **436**, 415-419 (2005).
67. Rudolph, M.G., Wittinghofer, A. & Vetter, I.R. Nucleotide binding to the G12V-mutant of Cdc42 investigated by x-ray diffraction and fluorescence spectroscopy: Two different nucleotide states in one crystal. *Protein Science* **8**, 778-787 (1999).
68. Vetter, I.R., Nowak, C., Nishimoto, T., Kuhlmann, J. & Wittinghofer, A. Structure of a Ran-binding domain complexed with Ran bound to a GTP analogue: implications for nuclear transport. *Nature* **398**, 39-46 (1999).
69. Renault, L., Guibert, B. & Cherfils, J. Structural snapshots of the mechanism and inhibition of a guanine nucleotide exchange factor. *Nature* **426**, 525-530 (2003).
70. Zhu, Z.Y., Delprato, A., Merithew, E. & Lambright, D.G. Determinants of the broad recognition of exocytic Rab GTPases by Mss4. *Biochemistry* **40**, 15699-15706 (2001).
71. Saraste, M., Sibbald, P.R. & Wittinghofer, A. The P-Loop - A Common Motif in Atp-Binding and Gtp-Binding Proteins. *Trends in Biochemical Sciences* **15**, 430-434 (1990).
72. Pereira-Leal, J.B. & Seabra, M.C. Evolution of the Rab family of small GTP-binding proteins. *J. Mol. Biol.* **313**, 889-901 (2001).

73. Pereira-Leal,J.B., Strom,M., Godfrey,R.F. & Seabra,M.C. Structural determinants of Rab and Rab Escort Protein interaction: Rab family motifs define a conserved binding surface. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **301**, 92-97 (2003).
74. Rak,A. *et al.* Structure of Rab GDP-dissociation inhibitor in complex with prenylated YPT1 GTPase. *Science* **302**, 646-650 (2003).
75. Ostermeier,C. & Brunger,A.T. Structural basis of Rab effector specificity: crystal structure of the small G protein Rab3A complexed with the effector domain of rabphilin-3A. *Cell* **96**, 363-374 (1999).
76. Wu,M., Wang,T., Loh,E., Hong,W. & Song,H. Structural basis for recruitment of RILP by small GTPase Rab7. *EMBO J.* **24**, 1491-1501 (2005).
77. Zhu,G.Y. *et al.* Structural basis of Rab5-Rabaptin5 interaction in endocytosis. *Nature Structural & Molecular Biology* **11**, 975-983 (2004).
78. Stenmark,H. *et al.* Distinct structural elements of rab5 define its functional specificity. *EMBO J.* **13**, 575-583 (1994).
79. Brennwald,P. & Novick,P. Interactions of three domains distinguishing the Ras-related GTP-binding proteins Ypt1 and Sec4. *Nature* **362**, 560-563 (1993).
80. Ayad,N., Hull,M. & Mellman,I. Mitotic phosphorylation of rab4 prevents binding to a specific receptor on endosome membranes. *Embo Journal* **16**, 4497-4507 (1997).
81. van der,S.P. *et al.* Reversible phosphorylation--dephosphorylation determines the localization of rab4 during the cell cycle. *EMBO J.* **11**, 4379-4389 (1992).
82. Kinsella,B.T. & Maltese,W.A. rab GTP-binding proteins implicated in vesicular transport are isoprenylated in vitro at cysteines within a novel carboxyl-terminal motif. *J. Biol. Chem.* **266**, 8540-8544 (1991).
83. Newman,C.M. *et al.* Post-translational processing of *Schizosaccharomyces pombe* YPT proteins. *J. Biol. Chem.* **267**, 11329-11336 (1992).
84. Rink,J., Ghigo,E., Kalaidzidis,Y. & Zerial,M. Rab conversion as a mechanism of progression from early to late endosomes. *Cell* **122**, 735-749 (2005).
85. Gilman,A.G. G-Proteins - Transducers of Receptor-Generated Signals. *Annual Review of Biochemistry* **56**, 615-649 (1987).
86. Hamm,H.E. & Gilchrist,A. Heterotrimeric G proteins. *Current Opinion in Cell Biology* **8**, 189-196 (1996).
87. Egan,S.E. *et al.* Association of Sos Ras Exchange Protein with Grb2 Is Implicated in Tyrosine Kinase Signal Transduction and Transformation. *Nature* **363**, 45-51 (1993).
88. Vandyke,K. *et al.* Analysis of Nucleotides and Catecholamines in Bovine Medullary Granules by Anion-Exchange High-Pressure Liquid-Chromatography and Fluorescence - Evidence That Most of Catecholamines in Chromaffin Granules Are Stored Without Associated Atp. *Pharmacology* **15**, 377-391 (1977).
89. Trahey,M. & McCormick,F. A Cytoplasmic Protein Stimulates Normal N-Ras P21 Gtpase, But Does Not Affect Oncogenic Mutants. *Science* **238**, 542-545 (1987).
90. Esters,H. *et al.* Vps9, Rabex-5 and DSS4: proteins with weak but distinct nucleotide-exchange activities for Rab proteins. *J. Mol. Biol.* **310**, 141-156 (2001).
91. Gromadski,K.B., Wieden,H.J. & Rodnina,M.V. Kinetic mechanism of elongation factor Ts-catalyzed nucleotide exchange in elongation factor Tu. *Biochemistry* **41**, 162-169 (2002).
92. Klebe,C., Prinz,H., Wittinghofer,A. & Goody,R.S. The Kinetic Mechanism of Ran - Nucleotide Exchange Catalyzed by Rcc1. *Biochemistry* **34**, 12543-12552 (1995).
93. Lenzen,C., Cool,R.H., Prinz,H., Kuhlmann,J. & Wittinghofer,A. Kinetic analysis by fluorescence of the interaction between Ras and the catalytic domain of the guanine nucleotide exchange factor Cdc25(Mm). *Biochemistry* **37**, 7420-7430 (1998).
94. Wagner,A., Simon,I., Sprinzl,M. & Goody,R.S. Interaction of Guanosine Nucleotides and Their Analogs with Elongation-Factor Tu from *Thermus-Thermophilus*. *Biochemistry* **34**, 12535-12542 (1995).
95. Klebe,C., Bischoff,F.R., Ponstingl,H. & Wittinghofer,A. Interaction of the Nuclear Gtp-Binding Protein Ran with Its Regulatory Proteins Rcc1 and Rangap1. *Biochemistry* **34**, 639-647 (1995).
96. Hutchinson,J.P. & Eccleston,J.F. Mechanism of nucleotide release from Rho by the GDP dissociation stimulator protein. *Biochemistry* **39**, 11348-11359 (2000).

LITERATURNACHWEISE

97. Haeusler,L.C., Blumenstein,L., Stege,P., Dvorsky,R. & Ahmadian,M.R. Comparative functional analysis of the Rac GTPases. *FEBS Lett.* **555**, 556-560 (2003).
98. Arai,K., Arai,N., Nakamura,S., Oshima,T. & Kaziro,Y. Studies on polypeptide-chain-elongation factors from an extreme thermophile, *Thermus thermophilus* HB8. 2. Catalytic properties. *Eur. J. Biochem.* **92**, 521-531 (1978).
99. Hammes,G.G. Principles of Chemical Kinetics. Academic Press Inc.(London), (1978).
100. Kawashima,T., BerthetColominas,C., Wulff,M., Cusack,S. & Leberman,R. The structure of the *Escherichia coli* EF-Tu center dot EF-Ts complex at 2.5 angstrom resolution. *Nature* **379**, 511-518 (1996).
101. Wang,Y., Jiang,Y.X., MeyeringVoss,M., Sprinzl,M. & Sigler,P.B. Crystal structure of the EF-Tu center dot EF-Ts complex from *Thermus thermophilus*. *Nature Structural Biology* **4**, 650-656 (1997).
102. Boriack-Sjodin,P.A., Margarit,S.M., Bar-Sagi,D. & Kuriyan,J. The structural basis of the activation of Ras by Sos. *Nature* **394**, 337-343 (1998).
103. Mossessova,E., Gulbis,J.M. & Goldberg,J. Structure of the guanine nucleotide exchange factor Sec7 domain of human Arno and analysis of the interaction with ARF GTPase. *Cell* **92**, 415-423 (1998).
104. Snyder,J.T. *et al.* Structural basis for the selective activation of Rho GTPases by Dbl exchange factors. *Nature Structural Biology* **9**, 468-475 (2002).
105. Rossman,K.L. *et al.* A crystallographic view of interactions between Dbs and Cdc42: PH domain-assisted guanine nucleotide exchange. *Embo Journal* **21**, 1315-1326 (2002).
106. Renault,L., Kuhlmann,J., Henkel,A. & Wittinghofer,A. Structural basis for guanine nucleotide exchange on Ran by the regulator of chromosome condensation (RCC1). *Cell* **105**, 245-255 (2001).
107. WorthyLake,D.K., Rossman,K.L. & Sondek,J. Crystal structure of Rac1 in complex with the guanine nucleotide exchange region of Tiam1. *Nature* **408**, 682-688 (2000).
108. John,J. *et al.* Kinetic and Structural-Analysis of the Mg²⁺-Binding Site of the Guanine Nucleotide-Binding Protein P21(H-Ras). *Journal of Biological Chemistry* **268**, 923-929 (1993).
109. Shutes,A., Phillips,R.A., Corrie,J.E.T. & Webb,M.R. Role of magnesium in nucleotide exchange on the small G protein rac investigated using novel fluorescent guanine nucleotide analogues. *Biochemistry* **41**, 3828-3835 (2002).
110. Hall,A. & Self,A.J. The Effect of Mg-2+ on the Guanine-Nucleotide Exchange-Rate of P21N-Ras. *Journal of Biological Chemistry* **261**, 963-965 (1986).
111. Feuerstein,J., Kalbitzer,H.R., John,J., Goody,R.S. & Wittinghofer,A. Characterization of the Metal-Ion - Gdp Complex at the Active-Sites of Transforming and Nontransforming P21 Proteins by Observation of the (O-Mn)-O-17 Superhyperfine Coupling and by Kinetic Methods. *European Journal of Biochemistry* **162**, 49-55 (1987).
112. John,J., Frech,M. & Wittinghofer,A. Biochemical-Properties of Ha-Ras Encoded P21-Mutants and Mechanism of the Autophosphorylation Reaction. *Journal of Biological Chemistry* **263**, 11792-11799 (1988).
113. Higashijima,T. *et al.* The Effect of Activating Ligands on the Intrinsic Fluorescence of Guanine Nucleotide-Binding Regulatory Proteins. *Journal of Biological Chemistry* **262**, 752-756 (1987).
114. Higashijima,T., Ferguson,K.M., Sternweis,P.C., Smigel,M.D. & Gilman,A.G. Effects of Mg-2+ and the Beta-Gamma-Subunit Complex on the Interactions of Guanine-Nucleotides with G-Proteins. *Journal of Biological Chemistry* **262**, 762-766 (1987).
115. Panniers,R., Rowlands,A.G. & Henshaw,E.C. The Effect of Mg+2 and Guanine-Nucleotide Exchange Factor on the Binding of Guanine-Nucleotides to Eukaryotic Initiation Factor-li. *Journal of Biological Chemistry* **263**, 5519-5525 (1988).
116. Pan,J.Y., Sanford,J.C. & WesslingResnick,M. Influence of Mg²⁺ on the structure and function of Rab5. *Journal of Biological Chemistry* **271**, 1322-1328 (1996).
117. Deweer,P. & Lowe,A.G. Myokinase Equilibrium - Enzymatic Method for Determination of Stability-Constants of Magnesium Complexes with Adenosine-Triphosphate, Adenosine-Diphosphate, and Adenosine-Monophosphate in Media of High Ionic-Strength. *Journal of Biological Chemistry* **248**, 2829-2835 (1973).

118. Tong,L., Devos,A.M., Milburn,M.V. & Kim,S.H. Crystal-Structures at 2.2 A Resolution of the Catalytic Domains of Normal Ras Protein and An Oncogenic Mutant Complexed with Gdp. *Journal of Molecular Biology* **217**, 503-516 (1991).
119. John,J. *et al.* Kinetics of Interaction of Nucleotides with Nucleotide-Free H-Ras P21. *Biochemistry* **29**, 6058-6065 (1990).
120. Kraulis,P.J., Domaille,P.J., Campbellburk,S.L., Vanaken,T. & Laue,E.D. Solution Structure and Dynamics of Ras P21-Center-Dot-Gdp Determined by Heteronuclear 3-Dimensional and 4-Dimensional Nmr-Spectroscopy. *Biochemistry* **33**, 3515-3531 (1994).
121. Barbacid,M. Ras Genes. *Annual Review of Biochemistry* **56**, 779-827 (1987).
122. Krengel,U. *et al.* 3-Dimensional Structures of H-Ras P21 Mutants - Molecular-Basis for Their Inability to Function As Signal Switch Molecules. *Cell* **62**, 539-548 (1990).
123. Franken,S.M. *et al.* 3-Dimensional Structures and Properties of A Transforming and A Nontransforming Glycine-12 Mutant of P21(H-Ras). *Biochemistry* **32**, 8411-8420 (1993).
124. Prive,G.G. *et al.* X-Ray Crystal-Structures of Transforming P21 Ras Mutants Suggest A Transition-State Stabilization Mechanism for Gtp Hydrolysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**, 3649-3653 (1992).
125. Czworkowski,J., Wang,J., Steitz,T.A. & Moore,P.B. The Crystal-Structure of Elongation-Factor-G Complexed with Gdp, at 2.7-Angstrom Resolution. *Embo Journal* **13**, 3661-3668 (1994).
126. Rensland,H. *et al.* Substrate and Product Structural Requirements for Binding of Nucleotides to H-Ras P21 - the Mechanism of Discrimination Between Guanosine and Adenosine Nucleotides. *Biochemistry* **34**, 593-599 (1995).
127. Laskowski,R.A., Chistyakov,V.V. & Thornton,J.M. PDBsum more: new summaries and analyses of the known 3D structures of proteins and nucleic acids. *Nucleic Acids Research* **33**, D266-D268 (2005).
128. Berman,H., Henrick,K. & Nakamura,H. Announcing the worldwide Protein Data Bank. *Nat. Struct. Biol.* **10**, 980 (2003).
129. Goldberg,J. Structural basis for activation of ARF GTPase: Mechanisms of guanine nucleotide exchange and GTP-myristoyl switching. *Cell* **95**, 237-248 (1998).
130. Rao,Y. *et al.* An open conformation of switch I revealed by Sar1-GDP crystal structure at low Mg(2+). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2006).
131. Shimizu,T. *et al.* An open conformation of switch I revealed by the crystal structure of a Mg2+-free form of RHOA complexed with GDP - Implications for the GDP/GTP exchange mechanism. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 18311-18317 (2000).
132. Buchwald,G. *et al.* Structural basis for the reversible activation of a Rho protein by the bacterial toxin SopE. *Embo Journal* **21**, 3286-3295 (2002).
133. Mori,K., Hata,M., Neya,S. & Hoshino,T. Common semiopen conformations of Mg2+-free Ras, Rho, Rab, Arf, and Ran proteins combined with GDP and their similarity with GEF-bound forms. *Journal of the American Chemical Society* **127**, 15127-15137 (2005).
134. Jones,S., Newman,C., Liu,F. & Segev,N. The TRAPP complex is a nucleotide exchanger for Ypt1 and Ypt31/32. *Mol. Biol. Cell* **11**, 4403-4411 (2000).
135. Wurmser,A.E., Sato,T.K. & Emr,S.D. New component of the vacuolar class C-Vps complex couples nucleotide exchange on the Ypt7 GTPase to SNARE-dependent docking and fusion. *J. Cell Biol.* **151**, 551-562 (2000).
136. Lippe,R., Miaczynska,M., Rybin,V., Runge,A. & Zerial,M. Functional synergy between Rab5 effector Rabaptin-5 and exchange factor Rabex-5 when physically associated in a complex. *Mol. Biol. Cell* **12**, 2219-2228 (2001).
137. Siniosoglou,S., Peak-Chew,S.Y. & Pelham,H.R.B. Ric1p and Rgp1p form a complex that catalyses nucleotide exchange on Ypt6p. *Embo Journal* **19**, 4885-4894 (2000).
138. Burd,C.G., Mustol,P.A., Schu,P.V. & Emr,S.D. A yeast protein related to a mammalian Ras-binding protein, Vps9p, is required for localization of vacuolar proteins. *Mol. Cell Biol.* **16**, 2369-2377 (1996).
139. Delprato,A., Merithew,E. & Lambright,D.G. Structure, exchange determinants, and family-wide rab specificity of the tandem helical bundle and Vps9 domains of Rabex-5. *Cell* **118**, 607-617 (2004).

LITERATURNACHWEISE

140. Hama,H., Tall,G.G. & Horazdovsky,B.F. Vps9p is a guanine nucleotide exchange factor involved in vesicle-mediated vacuolar protein transport. *J. Biol. Chem.* **274**, 15284-15291 (1999).
141. Walch-Solimena,C., Collins,R.N. & Novick,P.J. Sec2p mediates nucleotide exchange on Sec4p and is involved in polarized delivery of post-Golgi vesicles. *J. Cell Biol.* **137**, 1495-1509 (1997).
142. Hattula,K., Furuholm,J., Arffman,A. & Peranen,J. A Rab8-specific GDP/GTP exchange factor is involved in actin remodeling and polarized membrane transport. *Mol. Biol. Cell* **13**, 3268-3280 (2002).
143. Brondyk,W.H. *et al.* Interaction Cloning of Rabin3, A Novel Protein That Associates with the Ras-Like Gtpase Rab3A. *Molecular and Cellular Biology* **15**, 1137-1143 (1995).
144. Wada,M. *et al.* Isolation and characterization of a GDP/GTP exchange protein specific for the Rab3 subfamily small G proteins. *J. Biol. Chem.* **272**, 3875-3878 (1997).
145. Burton,J., Roberts,D., Montaldi,M., Novick,P. & De Camilli,P. A mammalian guanine-nucleotide-releasing protein enhances function of yeast secretory protein Sec4. *Nature* **361**, 464-467 (1993).
146. Burton,J. & De Camilli,P. A novel mammalian guanine nucleotide exchange factor (GEF) specific for rab proteins. *Adv. Second Messenger Phosphoprotein Res.* **29**, 109-119 (1994).
147. Burton,J.L., Slepnev,V. & De Camilli,P.V. An evolutionarily conserved domain in a subfamily of Rabs is crucial for the interaction with the guanyl nucleotide exchange factor Mss4. *J. Biol. Chem.* **272**, 3663-3668 (1997).
148. Moya,M., Roberts,D. & Novick,P. DSS4-1 is a dominant suppressor of sec4-8 that encodes a nucleotide exchange protein that aids Sec4p function. *Nature* **361**, 460-463 (1993).
149. Burton,J.L., Burns,M.E., Gatti,E., Augustine,G.J. & De Camilli,P. Specific interactions of Mss4 with members of the Rab GTPase subfamily. *EMBO J.* **13**, 5547-5558 (1994).
150. Coppola,T. *et al.* Disruption of Rab3-calmodulin interaction, but not other effector interactions, prevents Rab3 inhibition of exocytosis. *EMBO J.* **18**, 5885-5891 (1999).
151. Collins,R.N., Brennwald,P., Garrett,M., Lauring,A. & Novick,P. Interactions of nucleotide release factor Dss4p with Sec4p in the post-Golgi secretory pathway of yeast. *J. Biol. Chem.* **272**, 18281-18289 (1997).
152. Nuoffer,C., Wu,S.K., Dascher,C. & Balch,W.E. Mss4 does not function as an exchange factor for Rab in endoplasmic reticulum to Golgi transport. *Mol. Biol. Cell* **8**, 1305-1316 (1997).
153. Muller-Pillasch,F. *et al.* Cloning of novel transcripts of the human guanine-nucleotide-exchange factor Mss4: in situ chromosomal mapping and expression in pancreatic cancer. *Genomics* **46**, 389-396 (1997).
154. Andriamampandry,C. *et al.* Mss4 gene is up-regulated in rat brain after chronic treatment with antidepressant and down-regulated when rats are anhedonic. *Mol. Pharmacol.* **62**, 1332-1338 (2002).
155. Zhu,Z.Y., Dumas,J.J., Lietzke,S.E. & Lambright,D.G. A helical turn motif in Mss4 is a critical determinant of Rab binding and nucleotide release. *Biochemistry* **40**, 3027-3036 (2001).
156. Strick,D.J., Francescutti,D.M., Zhao,Y. & Elferink,L.A. Mammalian suppressor of Sec4 modulates the inhibitory effect of Rab15 during early endocytosis. *J. Biol. Chem.* **277**, 32722-32729 (2002).
157. Yu,H. & Schreiber,S.L. Structure of guanine-nucleotide-exchange factor human Mss4 and identification of its Rab-interacting surface. *Nature* **376**, 788-791 (1995).
158. Day,G.J., Mosteller,R.D. & Broek,D. Distinct subclasses of small GTPases interact with guanine nucleotide exchange factors in a similar manner. *Mol. Cell Biol.* **18**, 7444-7454 (1998).
159. Karpova,T.S. *et al.* Role of actin and Myo2p in polarized secretion and growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell* **11**, 1727-1737 (2000).
160. Novick,P. & Botstein,D. Phenotypic Analysis of Temperature-Sensitive Yeast Actin Mutants. *Cell* **40**, 405-416 (1985).
161. Pruyne,D.W., Schott,D.H. & Bretscher,A. Tropomyosin-containing actin cables direct the Myo2p-dependent polarized delivery of secretory vesicles in budding yeast. *J. Cell Biol.* **143**, 1931-1945 (1998).

162. Schott,D., Ho,J., Pruyne,D. & Bretscher,A. The COOH-terminal domain of Myo2p, a yeast myosin V, has a direct role in secretory vesicle targeting. *J. Cell Biol.* **147**, 791-808 (1999).
163. Salminen,A. & Novick,P.J. A Ras-Like Protein Is Required for A Post-Golgi Event in Yeast Secretion. *Cell* **49**, 527-538 (1987).
164. Goud,B., Salminen,A., Walworth,N.C. & Novick,P.J. A Gtp-Binding Protein Required for Secretion Rapidly Associates with Secretory Vesicles and the Plasma-Membrane in Yeast. *Cell* **53**, 753-768 (1988).
165. Walworth,N.C., Goud,B., Kabcenell,A.K. & Novick,P.J. Mutational Analysis of Sec4 Suggests A Cyclical Mechanism for the Regulation of Vesicular Traffic. *Embo Journal* **8**, 1685-1693 (1989).
166. Nair,J., Muller,H., Peterson,M. & Novick,P. Sec2 Protein Contains A Coiled-Coil Domain Essential for Vesicular Transport and A Dispensable Carboxy Terminal Domain. *Journal of Cell Biology* **110**, 1897-1909 (1990).
167. Elkind,N.B., Walch-Solimena,C. & Novick,P.J. The role of the COOH terminus of Sec2p in the transport of post-Golgi vesicles. *J. Cell Biol.* **149**, 95-110 (2000).
168. Ortiz,D., Medkova,M., Walch-Solimena,C. & Novick,P. Ypt32 recruits the Sec4p guanine nucleotide exchange factor, Sec2p, to secretory vesicles; evidence for a Rab cascade in yeast. *J. Cell Biol.* **157**, 1005-1015 (2002).
169. Jedd,G., Mulholland,J. & Segev,N. Two new Ypt GTPases are required for exit from the yeast trans-Golgi compartment. *J. Cell Biol.* **137**, 563-580 (1997).
170. Chen,S.H. *et al.* Ypt31/32 GTPases and their novel F-box effector protein Rcy1 regulate protein recycling. *Molecular Biology of the Cell* **16**, 178-192 (2005).
171. Finger,F.P., Hughes,T.E. & Novick,P. Sec3p is a spatial landmark for polarized secretion in budding yeast. *Cell* **92**, 559-571 (1998).
172. Guo,W., Roth,D., Walch-Solimena,C. & Novick,P. The exocyst is an effector for Sec4p, targeting secretory vesicles to sites of exocytosis. *EMBO J.* **18**, 1071-1080 (1999).
173. TerBush,D.R., Maurice,T., Roth,D. & Novick,P. The Exocyst is a multiprotein complex required for exocytosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* **15**, 6483-6494 (1996).
174. Medkova,M., France,Y.E., Coleman,J. & Novick,P. The rab exchange factor Sec2p reversibly associates with the exocyst. *Molecular Biology of the Cell* **17**, 2757-2769 (2006).
175. Yun,M. *et al.* Rotation of the stalk/neck and one head in a new crystal structure of the kinesin motor protein, Ncd. *Embo Journal* **22**, 5382-5389 (2003).
176. Crick,F.H.C. Is Alpha-Keratin A Coiled Coil. *Nature* **170**, 882-883 (1952).
177. Kavinsky,C.J. *et al.* Analysis of Cloned Messenger-Rna Sequences Encoding Subfragment-2 and Part of Subfragment 1 of Alpha-Myosin and Beta-Myosin Heavy-Chains of Rabbit Heart. *Journal of Biological Chemistry* **259**, 2775-2781 (1984).
178. Mason,J.M. & Arndt,K.M. Coiled coil domains: Stability, specificity, and biological implications. *ChemBiochem* **5**, 170-176 (2004).
179. Berger,B. *et al.* Predicting Coiled Coils by Use Sf Pairwise Residue Correlations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**, 8259-8263 (1995).
180. Wolf,E., Kim,P.S. & Berger,B. MultiCoil: A program for predicting two- and three-stranded coiled coils. *Protein Science* **6**, 1179-1189 (1997).
181. Burton,J.L. & Decamilli,P. Expression, Purification, and Functional Assay of Mss4. *Small Gtpases and Their Regulators, Pt C* **257**, 93-98 (1995).
182. Feuerstein,J., Goody,R.S. & Wittinghofer,A. Preparation and Characterization of Nucleotide-Free and Metal Ion-Free P21 Apoprotein. *Journal of Biological Chemistry* **262**, 8455-8458 (1987).
183. Goody,R.S., Frech,M. & Wittinghofer,A. Affinity of Guanine-Nucleotide Binding-Proteins for Their Ligands - Facts and Artifacts. *Trends in Biochemical Sciences* **16**, 327-328 (1991).
184. Eccleston,J.F., Kanagasabai,T.F., Molloy,D.P., Neal,S.E. & Webb,M.R. Guanine nucleotide binding proteins: common structural and functional approaches. Plenum, New York (1989).
185. Paduch,M., Jelen,F. & Otlewski,J. Structure of small G proteins and their regulators. *Acta Biochim. Pol.* **48**, 829-850 (2001).

LITERATURNACHWEISE

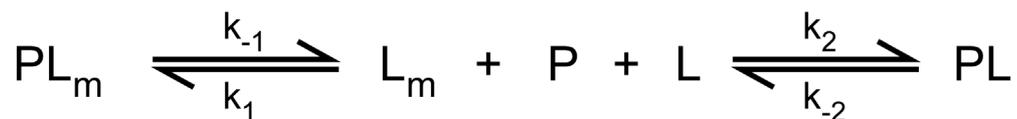
186. Andersen,G.R., Valente,L., Pedersen,L., Kinzy,T.G. & Nyborg,J. Crystal structures of nucleotide exchange intermediates in the eEF1A-eEF1B alpha complex. *Nature Structural Biology* **8**, 531-534 (2001).
187. Yu,H. & Schreiber,S.L. Cloning, Zn²⁺ binding, and structural characterization of the guanine nucleotide exchange factor human Mss4. *Biochemistry* **34**, 9103-9110 (1995).
188. Merithew,E. *et al.* Structural plasticity of an invariant hydrophobic triad in the switch regions of Rab GTPases is a determinant of effector recognition. *J. Biol. Chem.* **276**, 13982-13988 (2001).
189. Huber,L.A. *et al.* Rab8, a small GTPase involved in vesicular traffic between the TGN and the basolateral plasma membrane. *J. Cell Biol.* **123**, 35-45 (1993).
190. Fischer,v.M., Stahl,B., Li,C., Sudhof,T.C. & Jahn,R. Rab proteins in regulated exocytosis. *Trends Biochem. Sci.* **19**, 164-168 (1994).
191. Guo,Z., Ahmadian,M.R. & Goody,R.S. Guanine nucleotide exchange factors operate by a simple allosteric competitive mechanism. *Biochemistry* **44**, 15423-15429 (2005).
192. Ertel,R., Redfield,B., Brot,N. & WEISSBAC.H. Role of Gtp in Protein Synthesis - Interaction of Gtp with Soluble Transfer Factors from e Coli. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **128**, 331-& (1968).
193. LUCASLEN.J & Lipmann,F. Separation of 3 Microbial Amino Acid Polymerization Factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **55**, 1562-& (1966).
194. Ohtsubo,M. *et al.* Isolation and Characterization of the Active Cdna of the Human Cell-Cycle Gene (Rcc1) Involved in the Regulation of Onset of Chromosome Condensation. *Genes & Development* **1**, 585-593 (1987).
195. Nimnual,A. & Bar-Sagi,D. The two hats of SOS. *Sci. STKE.* **2002**, E36 (2002).
196. Stam,J.C. *et al.* Targeting of Tiam1 to the plasma membrane requires the cooperative function of the N-terminal pleckstrin homology domain and an adjacent protein interaction domain. *Journal of Biological Chemistry* **272**, 28447-28454 (1997).
197. Zhao,L.Y. *et al.* Direct and GTP-dependent interaction of ADP ribosylation factor 1 with coatamer subunit beta. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 4418-4423 (1997).
198. Whitehead,I.P. *et al.* Expression cloning of lsc, a novel oncogene with structural similarities to the Dbl family of guanine nucleotide exchange factors. *Journal of Biological Chemistry* **271**, 18643-18650 (1996).
199. Whitehead,I.P. *et al.* Dependence of Dbl and Dbs transformation on MEK and NF-kappaB activation. *Mol. Cell Biol.* **19**, 7759-7770 (1999).
200. Haeusler,L.C. *et al.* Purification and biochemical properties of Rac1, 2, 3 and the splice variant Rac1b. *Methods Enzymol.* **406**, 1-11 (2006).
201. Weide,T., Koster,M. & Barnekow,A. Inactive and active mutants of rab1b are not tightly integrated into target membranes. *Int. J. Oncol.* **15**, 727-736 (1999).
202. Brondyk,W.H., Mckiernan,C.J., Burstein,E.S. & Macara,I.G. Mutants of Rab3A Analogous to Oncogenic Ras Mutants - Sensitivity to Rab3A-Gtpase Activating Protein and Rab3A-Guanine Nucleotide Releasing-Factor. *Journal of Biological Chemistry* **268**, 9410-9415 (1993).
203. Powers,S., Oneill,K. & Wigler,M. Dominant Yeast and Mammalian Ras Mutants That Interfere with the Cdc25-Dependent Activation of Wild-Type Ras in Saccharomyces-Cerevisiae. *Molecular and Cellular Biology* **9**, 390-395 (1989).
204. Rybin,V. *et al.* GTPase activity of Rab5 acts as a timer for endocytic membrane fusion. *Nature* **383**, 266-269 (1996).
205. Hwang,Y.W., Mccabe,P.G., Innis,M.A. & Miller,D.L. Site-Directed Mutagenesis of the Gdp Binding Domain of Bacterial Elongation Factor-Tu. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **274**, 394-403 (1989).
206. Haney,S.A. & Broach,J.R. Cdc25P, the Guanine-Nucleotide Exchange Factor for the Ras Proteins of Saccharomyces-Cerevisiae, Promotes Exchange by Stabilizing Ras in A Nucleotide-Free State. *Journal of Biological Chemistry* **269**, 16541-16548 (1994).
207. Hwang,Y.W., Zhong,J.M., Pouillet,P. & Parmeggiani,A. Inhibition of Sdc25-C-Domain-Induced Guanine-Nucleotide Exchange by Guanine Ring Binding Domain Mutants of V-H-Ras. *Journal of Biological Chemistry* **268**, 24692-24698 (1993).

208. Wixler, V. *et al.* Identification of novel interaction partners for the conserved membrane proximal region of alpha-integrin cytoplasmic domains. *Febs Letters* **445**, 351-355 (1999).
209. BoyMarcotte, E., Ikononi, P. & Jacquet, M. SDC25, a dispensable ras guanine nucleotide exchange factor of *Saccharomyces cerevisiae* differs from CDC25 by its regulation. *Molecular Biology of the Cell* **7**, 529-539 (1996).
210. Gasteiger E. *et al.* The Proteomics Protocols Handbook. John M. Walker (ed.), pp. 571-607 (Humana Press, 2005).
211. Kabsch, W. Automatic Processing of Rotation Diffraction Data from Crystals of Initially Unknown Symmetry and Cell Constants. *Journal of Applied Crystallography* **26**, 795-800 (1993).
212. Matthews, B.W. Solvent Content of Protein Crystals. *Journal of Molecular Biology* **33**, 491-& (1968).
213. Brunger, A.T. *et al.* Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* **54**, 905-921 (1998).
214. Murshudov, G.N., Vagin, A.A. & Dodson, E.J. Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* **53**, 240-255 (1997).
215. Jones, T.A., Zou, J.Y., Cowan, S.W. & Kjeldgaard, M. Improved Methods for Building Protein Models in Electron-Density Maps and the Location of Errors in These Models. *Acta Crystallographica Section A* **47**, 110-119 (1991).
216. Delano, W.L. The PyMOL Molecular Graphics System. 2002. San Carlos, CA, USA, DeLano Scientific.
217. Bagshaw, C.R. *et al.* Magnesium Ion-Dependent Adenosine-Triphosphatase of Myosin - 2-Step Processes of Adenosine-Triphosphate Association and Adenosine-Diphosphate Dissociation. *Biochemical Journal* **141**, 351-364 (1974).

8. ANHANG

8.1. Herleitung Bestimmung der Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten

Die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{-1} kann durch Verdrängung eines markierten Liganden L_m aus einem Protein-Liganden-Komplex PL_m mit einem Überschuss unmarkierten Liganden bestimmt werden. Die Reaktion gehorcht dem folgenden Modell:



Die Geschwindigkeit der Verdrängung von L_m aus dem Protein-Liganden-Komplex PL_m kann durch die folgende Differentialgleichung beschrieben werden:

$$\frac{d[PL_m]}{dt} = k_1[L_m][P] - k_{-1}[PL_m]$$

Im Falle eines Überschusses an unmarkiertem Liganden L gegenüber dem Protein-Liganden-Komplex PL_m wird der markierte Ligand L_m nach Dissoziation aus dem Komplex sofort durch den überschüssigen unmarkierten Liganden L ersetzt und die Dissoziation von L_m wird quasi irreversibel. Unter diesen Bedingungen wird die Konzentration von freiem Protein P sehr gering ($[P] \rightarrow 0$) und der Term $k_1[L_m][P]$ ist vernachlässigbar. Daraus folgt

$$\frac{d[PL_m]}{dt} = -k_{-1}[PL_m]$$

Aus Integration in den Grenzen PL_m bei $t=0$ bis PL_m zum Zeitpunkt t

$$\int_{PL_m, t=0}^{PL_m} \frac{d[PL_m]}{[PL_m]} = \int_{t=0}^t -k_{-1} dt$$

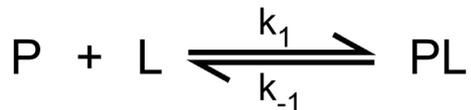
folgt

$$[PL_m] = [PL_m]_{t=0} e^{-k_{-1}t}$$

Die exponentielle Zeitkonstante k_{-1} ergibt somit die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante des Zerfalls des Komplexes PL_m .

8.2. Herleitung Bestimmung der Assoziationsgeschwindigkeitskonstanten (1-Schritt-Mechanismus)

Eine Assoziationsreaktion zweiter Ordnung kann durch das folgende Modell beschrieben werden:



Die Änderung der Konzentration der Komponenten mit der Zeit wird durch die folgende Differentialgleichung angegeben:

$$\frac{d[PL]}{dt} = -\frac{d[P]}{dt} = -\frac{d[L]}{dt} = k_1[L][P] - k_{-1}[PL]$$

Die Konzentration an Komplex PL ergibt sich aus der Differenz der eingesetzten Proteinkonzentration $[P_0]$ und der freien Konzentration des Proteins $[P]$ ($[PL]=[P_0]-[P]$), und damit

$$-\frac{d[P]}{dt} = k_1[L][P] - k_{-1}([P_0] - [P])$$

Da mit einem Überschuss an Liganden L gearbeitet wird, wird nur ein kleiner Teil von L im Protein-Liganden-Komplex PL gebunden; damit ist die freie Ligandenkonzentration L ungefähr gleich der eingesetzten Konzentration L_0 des Liganden ($[L] \sim [L_0]$). Daraus folgt

$$-\frac{d[P]}{dt} = [P](k_1[L_0] - k_{-1}) + k_{-1}[P_0]$$

Der Term $k_{-1}[P_0]$ stellt eine Konstante dar und die Geschwindigkeit der Reaktion unter den gewählten Bedingungen ist proportional zu dem Term $(k_1[L_0] - k_{-1})$. Letzterer Term stellt die beobachtete Geschwindigkeitskonstante k_{obs} pseudo-erster-Ordnung der Reaktion dar. Daher erhält man aus einer Auftragung der beobachteten Geschwindigkeitskonstanten k_{obs} gegen die eingesetzte Ligandenkonzentration L_0 die Assoziationsgeschwindigkeitskonstante k_1 als Steigung der Ausgleichsgeraden und die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{-1} als Ordinatenabschnitt der Ausgleichsgeraden:

$$k_{obs} = k_1[L_0] + k_{-1}$$

8.3. Herleitung Bestimmung der Assoziationsgeschwindigkeitskonstanten (2-Schritt-Mechanismus)

Einige Assoziationsreaktionen folgen nicht einem einfachen Reaktionsschema wie in Abschnitt 8.2 geschildert, sondern die Bindung zweier Komponenten umfasst mehrere unterscheidbare Schritte. In der vorliegenden Arbeit wurden Assoziationsreaktionen untersucht, die der folgenden Reaktionsgleichung gehorchen:



In einem ersten Schritt assoziieren Protein P und Ligand L zu einem Komplex PL schwacher Affinität, welcher sich in einem schnellen Gleichgewicht mit seinen Komponenten befindet. In einem zweiten quasi irreversiblen Schritt findet eine Isomerisierungsreaktion statt, in welcher der Komplex PL in einen stabilen Komplex PL* übergeht, wobei dieser Schritt geschwindigkeitsbestimmend für die Gesamtreaktion ist. Die Reaktionsgeschwindigkeit einer solchen Reaktion gehorcht den folgenden Differentialgleichungen:

$$\frac{d[P]}{dt} = k_{-1}[PL] - k_1[P][L] \quad \text{und} \quad \frac{d[PL^*]}{dt} = k_2[PL]$$

Unter den Bedingungen, dass die Konzentration des Liganden L sehr viel größer als die Ausgangskonzentration des Proteins P ist ($[L] \gg [P]_0$), die Rückreaktion k_{-1} wesentlich schneller ist als die Bildung des Komplexes PL* ($k_2 \ll k_{-1}$) und die Reaktion irreversibel ist ($k_{-2} = 0$) lässt sich zeigen, dass die beobachtete Geschwindigkeitskonstante k_{obs} eine hyperbole Abhängigkeit von der Ausgangskonzentration des Liganden L zeigt^{119,217}. Die beobachtete Geschwindigkeitskonstante gehorcht dann folgender Gleichung:

$$k_{obs} = \frac{k_2}{1 + \frac{k_{-1}}{k_1[L]_0}} = \frac{k_2}{1 + \frac{1}{K_1[L]_0}} \quad \text{mit } K_1 = k_1/k_{-1}.$$

Nichtlineare Kurvenanpassung einer Auftragung der beobachteten Geschwindigkeitskonstante k_{obs} gegen die eingesetzte Ligandenkonzentration $[L]_0$ ergibt die Affinitätskonstante K_1 des schwachen initialen Gleichgewichtes, sowie die maximale Geschwindigkeitskonstante k_2 der Assoziationsreaktion. Die Assoziationsgeschwindigkeitskonstante der Gesamtreaktion berechnet sich aus dem Produkt von K_1 und k_2 .

8.4. Endpunkttitration: Eingabeskript zur Kurvenanpassung

Für die Analyse Endpunkttitration von Sec4:MantGDP mit steigenden Konzentrationen von Sec2 wurde das folgende Skript in Verbindung mit der Software Scientist (MicroMath, Saint Louis, Missouri, USA) verwendet:

```
// Sec4:MantGDP, Sec2 Endpunkttitration
IndVars: C
DepVars: A, B, AB, AC, ABC, Cf, F
Params: K1, K2, K3, Yb, Yab, ATOT, BTOT
//Gleichgewichtsbedingungen
AB=A*B/K1
AC=A*Cf/K2
ABC=AB*C/K3
ABC=AC*B*K2/(K1*K3)
//Massenerhaltung
ATOT=A+AB+AC+ABC
BTOT=B+AB+ABC
C=Cf+AC+ABC
//Signal
F=Yb*B+Yab*AB+Yab*ABC
//Einschränkungen
0<A<ATOT
0<B<BTOT
0<Cf<C
// Parameterwerte
K1=0.6
K2=9
K3=70000
Yb=0.037
Yab=0.1
ATOT=5000
BTOT=500
// Anfangsbedingungen
C=0
***
```

9. DANKSAGUNG

Mein Dank gilt:

Prof. Dr. Roger S. Goody (Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie, Abteilung Physikalische Biochemie) für die freundliche Aufnahme in seine Abteilung, zahlreiche anregende und lehrreiche Diskussionen, uneingeschränkte Unterstützung und ein starkes und andauerndes Interesse an meiner Arbeit.

Prof. Dr. Roland Winter (Universität Dortmund, Institut für Physikalische Chemie I) für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Dr. Alexey Rak für seine motivierende Art, kompetente Hilfestellung und Unterrichtung der Kristallisation von Proteinen. Seine freundliche Betreuung und fortwährende Unterstützung in Verbindung mit den zur Verfügung gestellten wissenschaftlichen Freiräumen waren die Grundlage zum Gelingen meiner Projekte.

Dr. Olena Pylypenko für die freundliche, interessante und detaillierte Einführung in die Methoden der Kristallographie sowie für die geduldige Hilfe in der Erlernung strukturbio-logischer Techniken.

Dr. Kirill Alexandrov für stimulierende und herausfordernde Diskussionen und für die Initiierung des MSS4-Projektes.

Dr. Wulf Blankenfeldt für anschauliche Lehrstunden am Synchrotron, für die Aufnahme kristallographischer Daten und für konstruktive Kritik an der vorliegenden Arbeit.

Natalie Bleimling, Petra Herde und Georg Holtermann für außergewöhnlich freundliche und qualifizierte technische Unterstützung in der täglichen Laborarbeit.

Meinen Arbeitskollegen, insbesondere Tim Bergbrede, für eine Arbeitsatmosphäre, die das Leben im Institut gleichermaßen produktiv und herausfordernd wie fröhlich gemacht hat.

Meiner Familie, deren Rückhalt und verständnisvolle Unterstützung die Grundlage für das Gelingen meiner Arbeit sind und deren liebevolle Art mein Leben prägt.

10. EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe.

Dortmund, den

Aymelt Itzen